

# Utjecaj dimljenja na proteolitičke procese i oksidaciju proteina u suhoj šunki

---

**Križanović, Romana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:159:635550>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017

Romana Križanović  
757/PI

**UTJECAJ DIMLJENJA NA  
PROTEOLITIČKE PROCESE I  
OKSIDACIJU PROTEINA U  
SUHOJ ŠUNKI**

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 dr.sc. Nives Marušić Radovčić.

*Hvala mentorici prof. dr. sc. Helgi Medić na ukazanoj podršci i povjerenju što mi je omogućeno da u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe izradim Diplomski rad. Posebno hvala višoj asistentici dr. sc. Nives Marušić Radovčić na podršci i mnogobrojnim savjetima koji su pomogli u izradi ovog Diplomskog rada.*

## 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 DIMLJENJA NA PROTEOLITIČKE PROCESE I OKSIDACIJU PROTEINA U SUHOJ ŠUNKI

*Romana Križanović, 757/PI*

**Sažetak:** Glavni cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj dimljenja na proteolitičke procese i oksidaciju proteina u suhoj šunki. Uzorci su bili pripremljeni prema jednakoj tehnologiji prerade, razlika je u 50 %-tnoj redukciji aplikacije dima u dimnoj komori. Ispitivanje se sastojalo od određivanja udjela proteinskog, neproteinskog i hlapivog dušika, udjela proteina te indeksa proteolize. Uz pomoć DNPH metode dobivene su vrijednosti ukupne količine karbonila. Faza dimljenja nije utjecala na indeks proteolize. U kontrolnim uzorcima vrijednosti indeksa proteolize se kretao u rasponu od 12,81 do 19,83 %. U manje dimljenim uzorcima kretao se u rasponu od 14,98 do 18,42 %. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da redukcija dima nije utjecala na ispitivane parametre.

**Glavne riječi:** suha šunka, dimljenje, proteoliza, karbonili, oksidacija

**Rad sadrži:** 42 stranice, 10 slika, 9 tablica, 71 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:** Dr.sc. Nives Marušić Radovčić, viša asistentica

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv.prof.dr.sc. Sandra Balbino
2. Prof.dr.sc. Helga Medić
3. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković
4. Izv.prof.dr.sc. Sanja Vidaček (zamjena)

**Datum obrane:** 28. rujana 2017.

## 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

### INFLUENCE OF SMOKING ON PROTEOLYTIC PROCESSES AND PROTEIN OXIDATION IN DRY-CURED HAM

*Romana Križanović 757/PI*

**Abstract:** The aim of this paper was to investigate the effect of smoking on proteolytic processes and the oxidation of protein in a dry cured-ham. The samples were prepared according to the same processing technology, the difference was in the 50% reduction in the smoke application. The study included the determination of the protein, nonprotein and volatile nitrogen, protein share and proteolysis index. The smoking phase did not affect the proteolysis index. In control samples the value of the proteolytic index ranged from 12.81 to 19.83%. In less smoked samples ranged from 14.98 to 18, 42%. Using the DNPH method the values of the total amount of carbonyl were obtained. From the obtained results it is apparent that the smoke reduction did not affect the parameters being tested.

**Keywords:** dry-cured ham, smoking, proteolysis, carbonyls, protein oxidation

**Thesis contains:** 42 pages, 10 figures, 9 tables, 71 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 profesor*

**Technical support and assistance:** PhD. Nives Marušić Radovčić, *senior assistant*

**Reviewers:**

1. PhD. *Sandra Balbino*, Associate professor
2. PhD. *Helga Medić*, Full professor
3. PhD. *Ksenija Marković*, Associate professor
4. PhD. *Sanja Vidaček*, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** 28 September 2017

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD .....                                                                   | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO .....                                                          | 2  |
| 2.1. ŠUNKA .....                                                                | 2  |
| 2.1.1. Pojam i značenje suhe šunke .....                                        | 2  |
| 2.2. KARAKTERISTIKE SVINJSKOG MESA.....                                         | 5  |
| 2.2.1. Nutritivna svojstva svinjskog mesa.....                                  | 5  |
| 2.2.2. Pasmine svinja za proizvodnju šunki .....                                | 6  |
| 2.2.3. Boja i određivanje boje svinjskog mesa .....                             | 8  |
| 2.4. OKSIDACIJA PROTEINA.....                                                   | 10 |
| 2.4.1. Oksidacija proteinske okosnice .....                                     | 11 |
| 2.4.2. DNPH metoda .....                                                        | 11 |
| 2.4.3. Oksidacija proteina i kakvoća mesa .....                                 | 12 |
| 2.4.4. Oksidacija proteina izazvana zračenjem i kakvoća mesa.....               | 12 |
| 2.4.5. Oksidacija proteina i funkcija proteina u mesu i mesnim proizvodima..... | 13 |
| 2.4.6. Pojam proteinskih karbonila .....                                        | 14 |
| 2.4.7. Povezanost između oksidacije proteina i lipida .....                     | 17 |
| 2.5. KONZERVIRANJE ŠUNKE DIMLJENJEM .....                                       | 19 |
| 2.5.1. Pojam dimljenja i konzerviranje šunke dimljenjem.....                    | 19 |
| 2.4.2. Sastav dima .....                                                        | 20 |
| 2.4.3. Postupci dimljenja.....                                                  | 21 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....                                                     | 23 |
| 3.1. MATERIJAL.....                                                             | 23 |
| 3.2. METODE .....                                                               | 24 |
| 3.2.1. Određivanje ukupnih proteina .....                                       | 24 |
| 3.2.2. Određivanje neproteinskog dušika .....                                   | 26 |
| 3.2.3. Određivanje ukupnih karbonila .....                                      | 26 |
| 3.2.4. Indeks proteolize .....                                                  | 27 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....                                                   | 30 |
| 5. ZAKLJUČCI .....                                                              | 34 |
| 6. LITERATURA.....                                                              | 35 |



# 1.UVOD

Da bismo govorili o utjecaju procesa dimljenja na oksidaciju proteina i proteolitičkih procesa na šunku, prvo moramo objasniti samo pojam šunke. Šunka je trajni suhomesnati proizvod koji se proizvodi od obrađenog svinjskog buta soljenjem i salamurenjem, sušenjem (sa ili bez dimljenja) te dugotrajnim zrenjem. Proizvodnja šunke je veoma dugotrajan i kompliciran proces. Taj proces se sastoji iz nekoliko koraka, počevši od odabira svinja za sirove butove, pa do procesa soljenja, dimljenja, zrenja. Tek nakon svih ovih koraka dobijemo gotovu šunku. Oksidacija proteina je jedan od glavnih uzoraka za pogoršanje kvalitete tijekom prerade i skladištenja prehrambenog proizvoda. Oksidacija proteina rezultira proizvodnjom raznih oksidacija derivata.

Indeks proteolize predstavlja odnos neproteinskog i ukupnog dušika

Najveći proizvođač šunki :

- 1) Španjolska – 40 milijuna šunki. Najpoznatiji tipovi španjolskih šunki su: *jamón ibérico* i *jamón serrano*.
- 2) Italija, gdje su najzastupljenije: *Prosciutto di Parma* i *Prosciutto di San Daniele*, i nešto manje *Prosciutto Toscano*.
- 3) Francuska, gdje je najzastupljenija *Jambon de Bayonne*.
- 4) Portugal – gdje su zastupljenije različite vrste šunki „*dry-cured ham*“

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj dima na oksidaciju proteina u trajnom suhomesnatom proizvodu odnosno suhoj šunki. Na unaprijed pripremljenim uzorcima, uz korištenje odgovarajućih metoda, provedeno je određivanje udjela proteinskog, neproteinskog i hlapivog dušika, udjela proteina te indeksa proteolize.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ŠUNKA

#### 2.1.1. Pojam i značenje suhe šunke

Suha šunka je trajni suhomesnati proizvod koji se proizvodi od obrađenog svinjskog buta soljenjem i salamurenjem, sušenjem (sa ili bez dimljenja) te dugotrajnim zrenjem. U znanstvenoj i stručnoj literaturi na engleskom jeziku za šunke se koristi naziv „dry –cured ham“. „Cured“ i „dry“ u nazivu upućuju na činjenicu da dehidracija, odnosno uklanjanje vode iz buta i nije provedeno samo soljenjem ili samo sušenjem, već sinergijom obje tehnološke operacije, odnosno metode konzerviranja.



**Slika1.**Dimljena šunka (Anonymous 1, 2017)

Dimljenje je specifično za sjeverne krajeve europskog kontinenta gdje ne postoje optimalni uvjeti za sušenje. Slavonska šunka, kao i Dalmatinski te Drniški pršut, se konzervira i dimljenjem što je rezultat tradicije i različitih kulturnih utjecaja.

Šunke se mogu razlikovati prema:

- a) načinu obrade buta,
- b) tehnologiji prerade –odnosno vrsti i trajanju pojedinih tehnoloških operacija, te tehnoloških parametara u koje spadaju: temperatura, relativna vlažnost, brzina strujanja zraka i dima

- c) sirovini – kvaliteta mesa
- d) pasmini, načinu uzgoja, hranidbi, dobi, spolu i tjelesnoj masi svinja
- e) dodatcima: soli, salamure, začini i dr.
- f) klimatskim uvjetima proizvodnog područja.

Proizvodnja šunki tradicionalno je vezana za mediteranske zemlje, posebno Španjolsku, Italiju, Francusku, Portugal i Hrvatsku, odakle potječe najveći broj različitih vrsta šunki.

Najveći proizvođač šunki :

- 1) Španjolska – 40 milijuna šunki. Najpoznatiji tipovi španjolskih šunki su: *jamón ibérico* i *jamón serrano*.



**Slika 2.** Španjolska šunka *Jamon Iberico* (Anonymous 2, 2017)



**Slika 3.** Španjolska šunka *Jamon Serrano* (Anonymous 3, 2017)

- 2) Italija, gdje su najzastupljenije: *Prosciutto di Parma* i *Prosciutto di San Daniele*, i nešto manje *Prosciutto Toscano*.



**Slika 4.** Pršut *di Parma*(Anonymous 4, 2017)



**Slika 5.** Pršut *San Daniele*(Anonymous 5, 2017)

3) Francuska, gdje je najzastupljenija *Jambon de Bayonne*.



**Slika 6.** Francuska šunka *Jambon de Bayonne*(Anonymous 6, 2017)

4) Portugal – gdje su zastupljenije različite vrste šunki „*dry-cured ham*“

Tradicionalno, područja u blizini planina sa nižim temperaturama i relativnom vlažnošću zraka te suhim vjetrovima koji pušu tokom cijele godine pogoduju sušenju i zrenju šunki. Nekad prije proizvodnja šunke se vršila u seoskim domaćinstvima, gdje se također obavljalo i klanje svinja iz domaćeg uzgoja te kompletna proizvodnja, uglavnom za vlastite potrebe, a tek sporadično za tržište. U zadnjih 30-ak godina zahvaljujući znanstvenim istraživanjima

posebice u području zrenja te biokemijskih mehanizama lipolize i proteolize koji uz odabir sirovine imaju presudan utjecaj na oblikovanje specifičnih mirisa, okusa i teksture šunki te primjenom najnovijih tehnoloških dostignuća posebice u području optimiranja procesa znatno je unaprijeđena tehnologija proizvodnje, povećani su proizvodni kapaciteti te kvaliteta i sigurnost finalnih proizvoda.

Iako Kinezi tvrde da su prvi proizveli šunku, najveći broj autora smatra da je proizvodnja šunki soljenjem, sušenjem i zrenjem svinjskog buta započela u antičkom Rimu, nekoliko stoljeća prije Krista. Prvi pisani podaci o načinu sušenja svinjskog mesa radi čuvanja za kasniju uporabu potječu iz ranog rimskog doba, tadašnje Norcie u središnjoj Italiji. U antičkom Rimu razlikovale su se jače usoljene i dimljene šunke ("perna fumosa") i blaže usoljene i na zraku sušene šunke ("petaso"). Iz Rimskog Carstva vještina proizvodnje pršuta proširila se europskim kontinentom, a u 15. stoljeću na američki kontinent prenio ju je Christopher Columbus (Krvavica i Đugum, 2006).

## **2.2. KARAKTERISTIKE SVINJSKOG MESA**

### 2.2.1. Nutritivna svojstva svinjskog mesa

Specifičnosti kemijskog sastava svinjskog mesa u odnosu na druge vrste mesa su:

- 1) Meso je bogato proteinima i esencijalnim aminokiselinama, a posebno je dobar odnos:
  - a) aminokiselina triptofana (T) – proteini mišićnog tkiva
  - b) oksiprolina (O)- proteini vezivnog tkivaOn iznosi  $T/O=7,2$  ; za goveđe  $T/O=6,5$ , ovčjeg  $T/O=5.2$  i mesa peradi  $T/O = 6,7$ . svinjsko meso sadrži sve esencijalne i uvjetno esencijalne aminokiseline.
- 2) Ima mali maseni udio vode, ali značajan udio masti. Zbog toga, uz pačje i guščje, svinjsko meso ima najveću energetska vrijednost.
- 3) Svinjska mast sadrži znatne količine nezasićenih esencijalnih masnih kiselina (linolnu, linolensku i arahidonsku) i ima dobar omjer zasićenih, nezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina u odnosu na druge vrste mesa (Calkins i Hodgen, 2007). Sastav masnih kiselina triacilglicerola ovisi o pasmini svinja, načinu uzgoja i držanja, hranidbi, spolu, dobi, fiziološkom stanju i dr.

- 4) Bogato je vitaminima B kompleksa koji su termorezistentni i topljivi u vodi, a posebice tiaminom (B1) kojeg može sadržavati 5 - 10 puta više nego ostale vrste mesa. Nešto manje su, u odnosu na druge vrste životinja za klanje, zastupljeni vitamini topljivi u mastima (A, E, D i K).
- 5) Svinjsko meso sadrži manje kolesterola od goveđeg mesa i crvenog mesa peradi. Veći udio kolesterola sadrže iznutrice te mesni proizvodi koji se pripremaju od jetre.
- 6) Bogato je cinkom koji je odgovoran za rast i razvoj, imunološki odgovor, neurološku funkciju i reprodukciju te je uključen u imunološki sustav. Bogat je i željezom koje gradi različite enzime te hem u Hb-u i Mb-u.

### 2.2.2. Pasmine svinja za proizvodnju šunki

Uvjeti za korištenja mesa pasmine svinja u proizvodnji šunki su:

- a) ne smiju biti sklone stresu-odnosno stvaranju blijedog, mekanog i vodnjikavog mesa (BMV), crveno-ružičastog, mekanog i vodnjikavog mesa (CMV), tamnog, čvrstog i suhog mesa (TČS mesa) ili blijedog, čvrstog i suhog mesa (BČS)
- b) treba da imaju izraženu mramoriranost, odnosno veću količinu intramuskularne masti koja gotovom proizvodu daje sočnost i nježnost, doprinosi poželjnoj aromi te smanjuje proizvodni kalo. Optimalni sadržaj intramuskularne masti za proizvodnju šunki je veća od 5%.
- c) starije (zrelije) i svinje veće tjelesne mase koje daju butove većeg volumena i mase s većim udjelom Mb-a s većim udjelom masnog tkiva (doprinosi boljim senzorskim svojstvima arome i teksture) u čijem sastavu je veća zastupljenost zasićenih masnih kiselina čime se smanjuje sklonost užeglosti i cijedenju masti po površini šunke tijekom zrenja.

Najkvalitetnije šunke u svijetu, poput španjolske šunke ili talijanske dobivaju se od svinja koje zbog svoje autohtone genetike, načinu uzgoja ili hranidbe predstavljaju vrhunsku sirovinu za proizvodnju šunki specifičnih i jedinstvenih senzorskih svojstava.

Današnji uzgoj svinja u Europi uglavnom se bazira na selekciji ili odabiranju, odnosno povratnom križanju te industrijskom tro- i četveropasminskom križanju koje je uglavnom usmjereno na povećanje dnevnog prirasta i mesnatosti, a što je rezultiralo smanjenjem kvalitete mesa i pojavom BMV mesa. Isto tako istraživanja su pokazala da je veći maseni

udio nemasnog mesa u trupu u negativnoj korelaciji sa senzorskim svojstvima šunki (Jiménez-Colmenero, 2010). Zbog mesnatosti i tržišne vrijednosti komercijalnih trupova i polovica kao terminalna pasmina koriste se nerastovi mesnatih pasmina ili posljednjih godina, nerastovi duroka čije križance odlikuje otpornost, visok prirast, snažnija konstitucija i meso povećanog sadržaja I.M.F.-a (izražena mramoriranost), s time da povećani udio masti nema negativan utjecaj na stupanj primarne oksidacije slobodnih masnih kiselina, odnosno na povećanje peroksidnog broja zbog čega su križanci s durokom posebice važni u tehnologiji trajnih suhomesnatih proizvoda od svinjskog mesa (Jiménez-Colmenero, 2010)

Nadalje, križanci s durokom kao terminalnom pasminom (M) rastu brže i imaju bolju konverziju hrane. Kod talijanskih križanaca s različitim postotkom duroka i velikog jorkšira, uočena je pozitivna korelacija između mase svježe obrađenog buta te udjela vode, mramoriranosti i čvrstoće mišićnog tkiva u zrelom pršutu. Crna iberijska pasmina svinja ili njezini križanci s durokom (povećana mesnatost i konformacija) s minimalno 75%-tnim udjelom krvi iberijske svinje daju meso vrhunske kvalitete i koriste se za proizvodnju jamón ibérico (Toldrá, 2002; Virgili i sur., 2003; Jiménez-Colmenero, 2010).

Križanci s durokom daju dobre rezultate kod ocjene konformacije trupa i kakvoće mesa. Usporedbom sastava mišićnih enzima iberijske svinje i križanaca velikog jorkšira (veliki jorkšir x landras x durok) uočeno je da iberijska svinja ima visok sadržaj katepsina D, dipeptidilpeptidaze III i alanil aminopeptidaze. Križanci velikog jorkšira imaju veći sadržaj kalpaina i katepsina B, B+L i H, dipeptidilpeptidaze II i IV, aminopeptidaze B, leucil i piroglutamilaminopeptidaze, kisele lipaze i neutralne esteraze.

Belgijski landras i pietren osjetljivi su na stres što rezultira čestom pojavom BMV mesa, a u šunkamapronađena je i visoka razina neproteinskog dušika (engl.: non protein nitrogen (NPN)); slobodne aminokiseline, peptidi i dr.) i aminokiseline tirozina, zatim veći stupanj pastuočnosti te pokazuju niže rezultate prilikom senzorskog ocjenjivanja zbog čega nisu pogodni za proizvodnju šunki. Kompromisnu kombinaciju dobre konformacije trupa i kvalitetnog mesa predstavljaju križanci belgijskog landrasa s križancima drugih landrasa kod kojih je uočeno povećanje sadržaja I.M.F.-a, ali je sadržaj hlapljivih tvari pršuta i dalje nizak.

Aroma pršuta je lošija, osim arome koja potječe od povećanog sadržaja intramuskularne masti. Meso križanaca belgijskog landrasa ima nisku razinu aktivnosti egzopeptidaza (aminopeptidaza, karboksipeptidaza, dipeptidaza, tripeptidilpeptidaza i dipeptidilpeptidaza) i

nije sklono stvaranju prekursora karakterističnog okusa i mirisa. Križanci s belgijskim landrasom imaju veći udio butova, plečki i karea u polovicama, a križanci s durokom veći udio butova i plečki, a niži udio karea u polovicama. Nadalje, s porastom mase trupa smanjuje se udio mesnatih dijelova, a povećava se udio leđne slanine (Oliver i sur., 1994; Guerrero i sur., 1996; navedeno u Krvavica i sur., 2013).

U proizvodnji šunki (pršuta) prednost imaju autohtone pasmine svinja (npr. iberijska crna svinja, slavonska crna svinja, korzikanska i dr.) i pasmine koje su nastale križanjem autohtonih pasmina te švedskog landrasa, velikog jorkšira te posebice duroka.

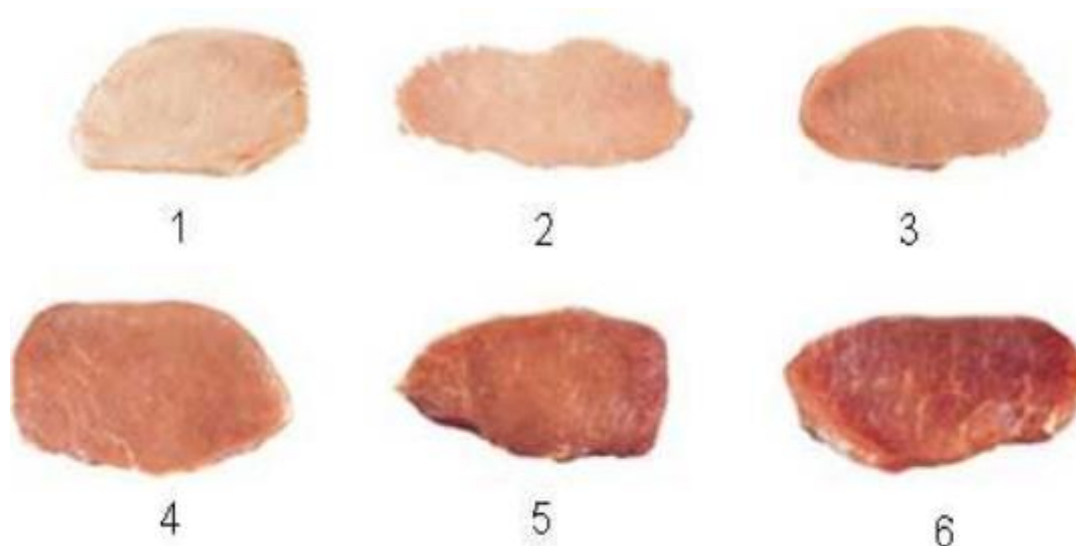
### 2.2.3. Boja i određivanje boje svinjskog mesa

Boja mesa ima važnu marketinšku ulogu i jedan je od najvažnijih senzorskih pokazatelja tržišne kvalitete mesa i mesnih proizvoda. Osnovni nositelji boje mesa jesu netoksični spojevi: mioglobin (Mb), zatim hemoglobin (Hb) te drugi spojevi kao što su flavini, kobalamin, citokromi itd. Mioglobin koji ima ulogu reverzibilnog oksido-redukcijskog vezanja i transport kisika u mišićnoj stanici je ključni nositelj crvene boje mesa, dok je utjecaj hemoglobina koji ima ulogu reverzibilnog oksidoredukcijskog vezanja kisika i transport krvlju do stanica i ostalih spojeva na postmortalnu boju mesa gotovo zanemariv.

**Tablica 1.** Senzorsko ocjenjivanje boje svinjskog mesa

| Ocjena | NPPC standard za boju (2000)     |
|--------|----------------------------------|
| 1      | Blijedo-ružičasto-siva do bijela |
| 2      | Sivo ružičasta                   |
| 3      | Crveno ružičasta                 |
| 4      | Tamno crveno ružičasta           |
| 5      | Purpurno crvena                  |
| 6      | Tamno purpurno crvena            |





**Slika 7.** Boja svinjskog mesa ( NPCC standard za boju, 2000 )

Na boju mesa (slika 7, tablica 1) utječe: vrsta životinje za klanje, spol, dob, anatomska lokacija, način uzgoja i korištenja životinja. Količina Mb-a, odnosno intenzitet boje mesa proporcionalan je s aktivnošću mišića (aktivniji mišići trebaju više energije, troše više O<sub>2</sub>, imaju veći maseni udio Mb-a i tamniji su, zbog čega npr. meso crnih slavonskih svinja iz otvorenog sustava uzgoja ima intenzivnu crvenu boju, odnosno veću vrijednost. Isto tako, meso starijih svinja ima veću količinu Mb-a. Čimbenici koji pozitivno utječu na promjene boje mesa: veći parcijalni tlak O<sub>2</sub>, niža pH vrijednost, niža T, salamurenje, askorbinska kiselina, a negativno ic-svjetlo i uv-svjetlo, NaCl, dehidracija mesa te aerobni mikroorganizmi troše O<sub>2</sub> i smanjuju njegov parcijalni tlak u okolnom mediju. Maseni udio Mb u mesu životinja za klanje kreće se od 0,04% (najmanje u svinjskom) do 0,7% (najviše u konjskom).

Boju mesa određujemo senzorski i pomoću mjernih uređaja 24 sata post mortem kada se stabilizira SpVV (sposobnost vezivanja vode), odnosno kada se više ne gubi Mb s eksudatom.

Senzorsko ocjenjivanje boje mesa provodi se uspoređivanjem boje mesa s referentnim skalama kao što je npr. američka skala za boju NPPC-skala iz 2000. godine (National Pork Producers Council), u kojima se boja uzorka mesa kreće u rasponu od 1 do 6, odnosno od blijedo-ružičaste do tamno-purpurno-crvene boje. Optimalna boja je između ocjene 3 i 4.

Za instrumentalno mjerenje boje mesa koriste se različiti uređaji koji rade po principu kolorimetrije, odnosno spektrofotometrije. Svaki instrument nudi niz mogućnosti koji

omogućuje istraživačima da biraju između nekoliko sustava za mjerenje (npr. CIE-L\*a\*b\* sustav koji boju definira pomoću tri vrijednosti:

L\* koordinate boje (svjetlina (engl.: lightness): 0 (crna) - 100 (bijela)),

a\* koordinate boje (engl.: redness: ± crveno - zeleno) i

b\* koordinate boje (engl.: yellowness: ± žuto - plavo).

Optimalne vrijednosti L\* m. longissimus dorsi (M.L.D.) iznosi 43 - 50. Vrijednosti veće od 50 ukazuju na pojavu BMV (blijedo, mekano i vodnjikavo) mesa, a ispod 43 na TČS (tamno, čvrsto i suho) meso (Joo i sur., 1999). Veće L\* vrijednosti također mogu biti rezultat većeg udjela intramuskularne masti u mesu. Boja je funkcija anatomske lokacije mesa u trupu svinje i zato se mjerenje uobičajeno provodi s M.L.D. koji je prethodno pohranjen jedan sat na +4 oC radi cvjetanja boje tijekom kojeg Mb oksidira i oksigenizira (Joo i sur., 1999; Senčić i sur., 2016).

## **2.4. 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).

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 O<sub>2</sub>) i neradikale (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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, ditionrozin 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.

#### 2.4.1. Oksidacija proteinske okosnice

Reakcija između neradikalnih oksidanata i okosnice proteina je veoma spora. Veći dio oštećenja na okosnici je proizvedena sa radikalnim oksidantima. Reakcije na mjestu a ugljika aminokiselinskih ostataka i oblika stabiliziranih radikala usmjerenih na ugljik koji reagira sa  $O_2$  da bi se proizveo alkilperoksilni radikal. Ti peroksilni radikali ili reagiraju sa  $HO_2$  kako bi stvorili hiperokside ili se eliminiraju da dobiju imini.

Hidroliza imina može rezultirati fragmentacijom okosnice, dok dekompozicija hiperoksida može cijepati peptidne veze kroz reakcije posredovane alkosil-radikalima. (Davies, 2005).

Posljednje reakcije mogu rezultirati generiranjem amida na C-terminalnoj strani N-terminalnog dijela proteina i A- keto acil ostataka na N-terminalnoj strani C-terminalog dijela proteina. Osim toga, fragmentacija proteina može se formirati prilikom cijepanja jedne okosnice oksidacijom glutamilnih, aspartilnih i prolilnih bočnih lanaca.

#### 2.4.2 DNPH metoda

Iako karbonilni spojevi nisu proizvodi oksidacije nekih amino kiselinskih ostataka kao što su histidin, fenilalanin i triptofan, DNPH metoda derivatizacije koja otkriva karbonilne spojeve razvijena je kao pogodna i pravilna metoda za kvantifikaciju nivoa oksidacije proteina u sistemu hrane (Oliver i sur., 1987; Levine i sur., 1994). 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 apsorbancije od 22.000  $M^{-1}cm^{-1}$  (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 (Mercier i sur., 1998; Haak i sur., 2006; Estevez i sur., 2007; Lund i sur., 2007, 2008; Zhang i sur., 2011).

### 2.4.3 Oksidacija proteina i kakvoća mesa

Oksidacija proteina je veoma važan čimbenik za kakvoću mesa. Tijekom skladištenja, mišići imaju smanjenu sposobnost održavanja antioksidacijskog obrambenog sustava. To može uzrokovati povećanu razinu oksidacije proteina, koji mogu modificirati strukturu i funkciju proteina uključujući enzimske aktivnosti. Ove promjene mogu obuhvatiti pretvaranje mišića u meso i time reguliraju kakvoću mesa.

Oksidacija proteina može se pojaviti prirodnim putem tijekom starenja mesa i skladištenja u hladnjačama. Upotrebom fluorescentne mikroskopije za otkrivanje sadržaja karbonila u mišićnim stanicama, locira se oksidacija proteina sa tri različita postupka:

- a) kemijska oksidacija –reagensi  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$
- b) skladištenjem u hladnjačama na temperaturi  $4^\circ\text{C}$
- c) kuhanjem na  $100^\circ\text{C}$

Svi ovi postupci izazovu oksidaciju proteina na vanjskom dijelu i unutar mišićnih stanica. Količina proteina karbonila je četiri puta veća tokom skladištenja u hladnjačama. Odnosno, oksidacija proteina desetog dana hlađenja je slična razini oksidacije inducirane 1mM oksidansa. Oksidacija proteina nije jednako raspoređena u mišićnim stanicama. Periferno područje koje odgovara staničnoj membrani i regiji u bliskom kontaktu sa staničnom membranom pokazalo je veći obujam oksidacije proteina u usporedbi sa unutrašnjim područjem koje sadrži miofibrile i sarkoplazmatske proteine. Lipofilni reagensi kao što je vitamin E mogu biti snažni reagensi za ograničavanje pogoršanja oksidacijom proteina.

### 2.4.4 Oksidacija proteina izazvana zračenjem i kakvoća mesa

Zračenje je vrlo učinkovito u kontroli patogenog mikroorganizma u mesu i time produžuje rok trajanja mesa. Međutim, zračenje može proizvesti slobodne radikale uključujući OH i  $\text{O}_2$ , što

potencijalno povećava oksidaciju proteina i lipida u mesnim proizvodima. (Jo i Ahn, 2000). Oksidacija mioglobina je odigrala veoma važnu ulogu u obezvređivanju ozračenih govedih odrezaka. Karbonilni sadržaj miofibrilnih i sarkoplazmatičnih proteina je povezan sa osjetljivošću mesa na 3, 7 dana nakon smrti.

Vitamin E je učinkovit u smanjenju količine i opsega oksidacije sarkoplazmatičnih proteina. Određeni su učinci oksidacije inducirane zračenjem na degradaciju proteina i aktivnosti kalpaina u govedini (Rowe, 2004b).

U usporedbi sa neozračenim govedim odrescima, ozračeni uzorci su imali više netaknutih i manje degradiranih proizvoda 3, 7 i 14 dana nakon skladištenja u hladnjačama. Smanjena proteoliza je sigurno posljedica inhibicije aktivnosti  $\gamma$ -kalpaina zračenjem (Rowe i sur., 2004b). U uzorcima koji nisu ozračeni, odresci životinja kojima je davat vitamin E pokazali su bržu degradaciju od onih koje nisu bile podvrgnute korištenju vitamina E.

#### 2.4.5. Oksidacija proteina i funkcija proteina u mesu i mesnim proizvodima

Strukturna modifikacija inducirana oksidacijom proteina može promijeniti njihovu funkcionalnost i tako utjecati na kvalitetu proizvoda. Tijekom prerade mesnih proizvoda mehanička čvrstoća može uništiti integralnu strukturu stanica i uništiti antioksidirane obrambene sustave koji rezultiraju visokom osjetljivošću na oksidaciju proteina. Bijele mišiće nakon inkubacije sa oksidansima (željezni klorid ili klorid bakra), jakost gela formirana iz miofibrilnih proteina smanjena je sa 0,74 na 0,05 i 0,08. Kapacitet zadržavanja vode gelova smanjila se za 23 i 10%. (Decker i sur. 1993)

Liu i suradnici (2010) su pokazali da je mišić svinje pokazao manji kapacitet zadržavanja vode nakon inkubacije sa  $\text{FeCl}_3$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  pri  $4^\circ\text{C}$ . Promjene u kapacitetu zadržavanja vode bile su u skladu s povećanjem sadržaja proteina karbonila i unakrsnim povezivanjem između miofibrilnih i sarkoplazmatskih proteina. Smanjeni kapacitet vode mogao bi se objasniti povećanim izvanstaničnim prostorom između susjednih vlakana u oksidiranim uzorcima mišića (Liu i sur., 2010). Učinci oksidacije proteina na njihova funkcionalna svojstva također su proučavani inkubiranjem mišića sa antioksidansom.

U mljevenom srčanom mišiću, miofibrilni proteini pokazali su povećan stres i viskoznost nakon što su bili isprani kombiniranim antioksidansima koji su sadržavali 0,02% propil galata, 0,2% natrijevog askorbata i 0,2% natrijevog tripolifosfata. Ispiranje antioksidansima poboljšalo je ostale funkcionalnosti miofibrilnih proteina uključujući veću pohranu, manje

modula na 50 i 60°C i jače gelove. Međutim, oksidacija proteina nije uvijek povezana sa štetnim učincima na funkcionalnost proteina. Pri izlaganju mljevenog mišića bakalara u tri različita oksidacijska sustava, uključujući kalirano željezo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i askorbat, pokazani su poboljšanje karakteristika geliranja i emulgiranja.

Povećana sposobnost stvaranja gela zbog oksidacije proteina može se povezati sa stvaranjem poprečnog vezanja između polipeptida i proteina. Ove kružne veze mogu smanjiti gel mreže i stabilizirati druge nekovalentne veze unutar gelske matrice. Oksidacija proteina može potaknuti polimerizaciju proteina i agregaciju, te tako promijeniti njihovu probavljivost, što negativno utječe na nutritivne vrijednosti mišićne hrane.

Oksidacija proteina može promijeniti intermolekularne i intramolekularne interakcije unutar proteina i time utjecati na njihovu konformaciju. Ove promjene mogu povećati površinsku hidrofobnost proteina zbog promjena u tercijarnoj strukturi.

Visoke razine oksidacije mogu rezultirati denaturacijom proteina i taloženjem što je povezano s smanjenom topivosti proteina. Nakon inkubacije s hidroperoksidima tijekom dva i po sata, topivost miofibrilnog proteina može se smanjiti za 90% zbog smanjene ekstrakcije (Jarenback i Lijemark, 1975). Topljivost miofibrilnih proteina iz bijelog mišića purana se smanjila za 32 i 36% kada su proteini dodani u oksidacijskom sustavu koji sadrži željezo, bakar i askorbat (Decker, 1993).

Sarkoplazmatski proteini su osjetljivi na oksidacijske modifikacije (Rowe, 2004b). Ustanovljeno je da je ozračivanje govedina kod 6,4 kGy induciralo oksidaciju proteina u sarkoplazmatskim proteinima i rezultiralo smanjenjem ekstrakcije proteina nakon 4 i 14 dana skladištenja u hladnjačama. Visoke temperature rezultirale su višim razinama proteinaskog karbonilnog sadržaja i nižim sadržajima tritopana i tirozina.

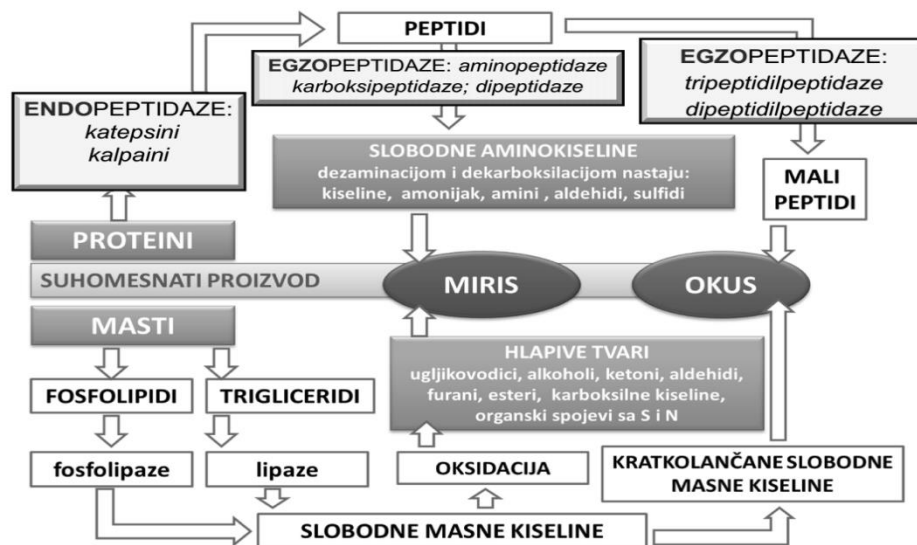
#### 2.4.6. Pojam proteinskih karbonila

Proteinski karbonili su reaktivni i rezultatima istraživanja Esteveza i suradnika (2011) utvrđeno je da su specifični karbonili  $\alpha$ -amino adipinski polualdehid (AAS) i  $\gamma$ -glutaminske kiseline (GGS) potpomogli degradaciju leucina i izoleucina te su nastali aldehidi 3-metilbutanal i 2-metilbutanal. Ti hlapivi spojevi su uobičajena komponenta 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).

Sadržaj proteina karbonila i polualdehida (AAS i GGS) raznih proizvoda svinjetine procijenjeni su istodobno sa lipidnom oksidacijom. AAS i GGS su formirani od lizina i arginina ili proteina koji sadrži prolin ( Armenteros i sur., 2009).

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). Karbonilacija proteina se može dogoditi u odsutnosti lipida, ali prateća pojava oksidacije proteina i lipida u mesu sugerira interakciju između te dvije reakcije (Estevez i sur., 2008). Stoga je važno odrediti i oksidaciju lipida tijekom istraživanja oksidacije proteina.



**Slika 8.** Shematski prikaz proteolitičkih i oksidacijskih procesa u pršutu

(Anonymous 6, 2017)

Na oksidaciju proteina i amino kiselina utječu i brojni tehnološki čimbenici, uključujući temperaturu, aktivitet vode i pH vrijednost (Estevez i Heinonen, 2010). Hidrolitička razgradnja proteina tijekom proizvodnje suhomesnatih proizvoda igra važnu ulogu u

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

Malo se zna o utjecaju pojedinih faza proizvodnje na početak i intenzitet oksidacije mišićnih proteina. Svega nekoliko istraživanja bavilo se utjecajem soli na nastanak proteinskih karbonila, ali bez konkretnih rezultata (Montenero i sur., 2005; Shimizu i sur., 2009). Dodatak soli ima utjecaj na ionsku jakost okoline što dovodi do veće izloženost miofibrilarnih proteina prooksidansima i stoga utječe na njihovu sklonost oksidaciji (Montero i sur., 2005). Oksidacija proteina je istraživana i u proizvodima od usitnjenog mesa i ustanovljeno je da je prerada utjecala na formiranje karbonila (Estevez i sur., 2007; Sun i sur., 2010).

Lund i suradnici (2011) izvijestili su o štetnim učincima oksidacije proteina na teksturu i nutritivnu vrijednost proizvoda od mesa. Veza između oksidacije proteina i narušene kvalitete proizvoda bazira se na korelaciji između proteinskih karbonila određenih DNPH metodom i procijenjene kvalitete (Chan i sur., 2011; Zakrys i sur., 2009). Parametri teksture kao mekoća, sočnost i tvrdoća mogu biti promijenjeni oksidacijom proteina uslijed inaktivacije proteolitičkih enzima i uključenih u mekšanje mesa i oksidativnih promjena miofibrilarnih proteina i posljedično, njihove smanjene podložnosti proteolizi (Huff-Lonergan i sur., 2010). Nutritivna vrijednost proizvoda s oksidiranim proteinima je smanjena uslijed promjene profila amino kiselina, budući da formiranje proteinskih karbonila uključuje ireverzibilnu oksidativnu modifikaciju esencijalnih amino kiselina kao što su lizin, arginin i treonin, stoga je proteinska karbonilacija mjera štetnog utjecaja oksidacije proteina na nutritivnu vrijednost proteina hrane (Estevez, 2011).

Već je spomenuto da tehnološki procesi utječu na oksidaciju proteina, a utječu i na proteolitičke reakcije.

Proteolitički procesi su pod utjecajem dodatka NaCl zbog smanjene aktivnosti proteolitičkih enzima kao rezultata inhibitornog djelovanja soli. Također je primijećeno da zrenje pršuta na povišenim temperaturama dovodi do pojačanog formiranja neproteinskih dušikovih spojeva i stoga utječe na tijek proteolize (Harkoussi sur., 2015). Anatomsko mjesto mišića unutar šunke također igra važnu ulogu u vremenskom tijeku proteolize tijekom proizvodnje šunke, zbog različite kinetike prijenosa soli i vode u svakom mišiću. Nedavno su Harkoussi i suradnici



(2014) kvantificirali proteolizu kroz indeks proteolize, u pet različitih svinjskih mišića, kao funkciju temperature i udjela vode te soli. Dobro je poznato da proteoliza utječe na konačnu teksturu šunke, te se smatra ključnim parametrom za dobivanje pozitivnih senzorskih svojstva na kraju procesa. Dakle, bolje razumijevanje i kontrola brzine proteolize pogoduju optimiziranoj teksturi pršuta.

Paralelno s tim, oksidacija lipida, koja je važan biokemijski proces u hrani tijekom prerade i skladištenja, utječe negativno, ali i pozitivno na njenu kvalitetu (Jin i sur., 2012.). Oksidacija lipida je također bitan faktor i ima pozitivan učinak na razvoj tipične arome pršuta. Brojna istraživanja okarakterizirala su oksidaciju lipida u prehrambenim proizvodima ili ispitala učinak NaCl i temperature na njen tijek (Harkous i sur., 2015).

#### 2.4.7 . Povezanost između oksidacije proteina i lipida

Oksidacija oksimioglobina u metmioglobin rezultira diskoloracijom mesa, dok oksidacija lipida dovodi do proizvodnje neugodnih mirisa i smanjenja nutritivnih vrijednosti mesa i mesnih proizvoda. Mehanizmi i kontrola interakcije između mioglobina i lipidne oksidacije pregledani su od strane Baronai Andersena (2002), a nedavno i od strane Faustmana i suradnika (2010). Aminokiseline su osjetljivije na oštećenje sekundarnim proizvodima oksidacije lipida kao što su aldehidi u usporedbi s primarnim proizvodima lipidne oksidacije kao što su hidroperoksidi. Sekundarni proizvodi dobiveni oksidacijom lipida mogu djelovati u interakciji s aminokiselinskim ostatcima proteina koji reguliraju njihovu strukturu i funkciju. Na primjer, hidroperoksidi i aldehidi dobiveni oksidacijom lipida mogu reagirati s ostacima lizina da bi doveli do stvaranja derivata pirola (Hidalgo i sur., 1998). Derivati interakcije između produkata oksidacije lipida i aminokiselinskih ostataka mogu uzrokovati stvaranje poprečnog vezanja između proteina. Reakcija između 4,5-epoksi-2-alkena i aminokiselina rezultira formiranjem N-supstituiranih pirola (II), koji mogu brzo polimerizirati i dovesti do razvoja smeđe boje (Zamora i sur., 2000). Lizinski ostaci proteina mogu reagirati s  $\gamma$ -hidroksi-a,  $\beta$ -nezasićenim epoksidima dobivenim od oksidacije lipida i tvore neke spojeve, uključujući 4- (propilamino) -trans-2-heksen-1,5-diol i N2-acetil-N6- (1,5-dihidroksi-trans-2-

heksen-4-il) -l-lizin 4-metil Kumar-7-ilamida u modelu s trans-4,5-epoksi-trans-2-heksen-1- (EH) i propilamin (Lederer, 1996). Nakon inkubacije hrane s goveđim i svinjskim oksimoglobinom s HNE, dva histidina ostataka svinjskog mioglobina dok su četiri histidina ostataka govedine mioglobina bili povezani s HNE putem Michaelovog dodatka (Suman i sur., 2006). Adukcija HNE-a u oksimoglobin promijenila je terciarnu strukturu i potaknula njegovu osjetljivost na oksidaciju (Maheswarappa i sur., 2009). Oksidacija lipida kao promotora oksidacije proteina može se dokazati hranjenjem životinja s različitim statusom nezasićenih masnih kiselina (Nute i sur., 2007). Zhang i suradnici (2011) izvijestili su da je potrošnja oksidiranog ulja bila povezana s povećanom razinom proteina karbonila i smanjenom kvalitetom mesa, uključujući oksidaciju lipida i gubitak kapljica u dojci mesa pilića broilera.

Neki proteini u hrani mišića, posebno mioglobin, mogu djelovati kao pro-oksidansi koji iniciraju i ubrzavaju oksidaciju lipida (Baron i Anderson, 2002). Povećane razine kisika u sustavima pakiranja bifteka bile su povezane s povećanom oksidacijom lipida i smanjenom stabilnošću boje (Zakrys i sur., 2008). Utvrđene su jake negativne korelacije između sadržaja reaktivnih tvari 2-tiobarbiturine kiseline (TBARS) i koncentracije oxymyoglobina posebno u skupinama s visokim sadržajem kisika (Zakrys i sur., 2008). U sustavu mioglobin-liposoma, vrijednosti TBARS povećane su za 12,5, 17,1 i 19,0 puta, jer su koncentracije oxymyoglobina porasle sa 0,25 na 0,625 i 2,5 mg / ml nakon 1 satne inkubacije na 37 ° C (Chan i sur., 1997). Chan i suradnici (1997) također su izvijestili da je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umjesto O<sub>2</sub> - bio izravno uključen u reguliranje interakcije oksidacije oksimioglobina i lipida. Zaključno, promjene izazvane oksidacijom bjelančevina mogu utjecati na kvalitetu svježeg mesa tijekom starenja poslije smrti i kasnije proteinske funkcionalnosti mesnih proizvoda. Dodavanje antioksidansa kao što je vitamin E u prehrani i drugim tehnološkim strategijama može biti učinkovito za ograničavanje pogoršanja učinaka oksidacije lipida i proteina u mišićnoj hrani, kao što je nedavno pregledao Lund i suradnici (2010).

## 2.5. KONZERVIRANJE ŠUNKE DIMLJENJEM

### 2.5.1. Pojam dimljenja i konzerviranja šunke dimljenjem

Dimljenje predstavlja jednu od metoda konzerviranja u tehnologiji proizvodnji šunki, a uglavnom se koristi u proizvodnji šunki u sjevernim krajevima Europe gdje ne postoje optimalnu uvjeti za sušenje, međutim zbog tradicije koja je rezultat različitih kulturnih utjecaja, dimljenje se primjenjuje i u proizvodnji Dalmatinskog i Drniškog pršuta koji pripadaju mediteranskom tipu šunki.



**Slika 9.** Dimljenje šunke (Anonymous 7, 2017)

Konzervirajuće djelovanje dimljenja zasniva se na (Živković, 1986; Vuković, 2012):

- a) antioksidativnom djelovanju dima koje je posljedica aktivnosti fenola i njihova vezanja za slobodne radikale, pri čemu poništavaju njihovu oksidativnu aktivnost te manjim dijelom kiselina,
- b) baktericidnom i fungicidnom djelovanju dima, za što su odgovorni sljedeći spojevi u sastavu dima: formaldehidi, smole, masne kiseline, ugljikovodici, amonijak, octena i mravlja kiselina, alkoholi itd.,
- c) sušenju koje je funkcija temperature i brzine strujanja strujanja zraka i dima

Iz razloga što sam postupak dimljenja nema dovoljan konzervirajući učinak kombinira se sa drugim metoda, uglavnom soljenjem i sušenjem (Vuković, 2012). Glavna uloga dimljenja je dobivanje specifičnog, ugodnog mirisa i okusa mesa po dimu te zlatnosmeđe do smeđe boje šunki (Kovačević, 2014). Različite vrste dima različito djeluju na boju mesnih proizvoda, tako npr. hrast i joha daju žuto-smeđu, bukva i javor zlatnosmeđu, mahagonij crvenosmeđu, a četinari čađavocrnu boju. Na boju najviše utječu fenoli i karbonilni spojevi. Oblikovanje specifičnih svojstava dimljenih proizvoda i konzervirajući učinak posljedica je taloženja dima na površini i njegove penetracije u dubinu proizvoda koja se nastavlja i nakon dimljenja. Dim koji se koristi u industriji mesa nastaje sagorijevanjem usitnjenog drveta, najčešće strugotina bukve, grab, javor ili drugih tvrdih drva kao npr. mahagonija.

Četinari, zbog zastupljenosti eteričnih smola nisu pogodni za dimljenje, jer razvijaju čađ i daju proizvodu miris terpentina. Međutim, u nekim regijama (Tirol, Schwarzwald) tradicionalno se koriste četinari. Npr. Schwarzwaldska šunka (njem.: Schwarzwälder Schinken) se dimi izgaranjem strugotine ili piljevine drveta jele i/ili smreke (hladno dimljenje  $T < 25\text{ °C}$ ) što joj daje karakterističan snažan miris i tipičnu tamno-smeđu boju (DOOR, 2017)

Drvo za dimljenje ne smije biti obrađivano, bojeno, lakirano, impregnirano i sl. Dim se proizvodi tijekom sagorijevanja drveta koje se sastoji od otprilike 50% celuloze, 25% hemiceluloze i 25% lignina. Potpunim sagorijevanjem drveta nastaje  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  i pepeo, ali ne i aktivne komponente dima. Zato se u praksi koristi postupak nepotpunog sagorijevanja tzv. tinjanja, pri čemu ne nastaje pepeo već drveni ugljen,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  te dim (oko 70%) koji sadrži aktivne komponente dima (Prändl i sur., 1988). Temperatura sagorijevanja drveta u klasičnim pušnicama s otvorenim ložištima je viša od  $500\text{ °C}$  (potpuno izgaranje), pri čemu nastaje ugljikov monoksid (CO) i kancerogeni spojevi (katrani). Zbog toga se u industrijskim uvjetima nastoji postići T izgaranja do maksimalno  $350\text{ °C}$ . Hlapljivi sastojci dima (fenoli, organske kiseline i karbonilni spojevi) koji su najodgovorniji za miris i okus dimljenih proizvoda, nastaju najviše pri temperaturama  $200 - 350\text{ °C}$ .

#### 2.4.2. Sastav dima

Dim je koloid - aerosol koji se sastoji od plinovite faze ( $w = 10\%$ ; poželjna i odgovorna za miris i okus) i dispergiranog krutog i tekućeg dijela ( $w = 90\%$ ) (Krvavica i sur., 2013). Iz

dima je izolirano preko 1.000 spojeva (aktivnih komponenti) koji pripadaju različitim kemijskim grupama spojeva (npr. alifatske kiseline, ketonske kiseline, aromatske kiseline, alifatski aldehidi, aromatski aldehidi, fenoli, aromatski ugljikovodici, heterociklički spojevi itd.) (Živković, 1986; Vuković, 2012) od kojih su sa zdravstvenog stajališta, kao kancerogeni i mutageni spojevi, najsporniji \*policiklički aromatski ugljikovodici (PAH-ovi). Količina im ovisi o različitim parametrima: vlažnost, temperature izgaranja i prisustvo kisika, a najviše nastaju pri temperaturama ispod 300 i iznad 500°C (Pöhlmann i sur., 2013.; Ledesma i sur., 2015). Istraživanja su pokazala da se 99% svih PAH-ova koji nastaju tijekom dimljenja zadržava na površini proizvoda koja čini 22% mase analiziranog proizvoda.

### 2.4.3. Postupci dimljenja

Dim se može proizvesti na klasičan način u otvorenim ložištima (dimljenje se vrši u istoj prostoriji gdje je i ložište) ili pomoću dimnih generatora (dim se proizvodi izvan komore za dimljenje). Korištenje dimnih generatora rezultat je zahtjeva za postizanjem optimalnih uvjeta sagorijevanja drveta (280 – 350°C). U praktičnoj su primjeni sljedeći tipovi dimnih generatora:

- a) generator sa zagrijanom pločom kod kojeg pilovina (strugotina drveta) pada i izgara na ploči zagrijanoj električnom strujom,
- b) frikcion generator kod kojeg dim nastaje trenjem nazubljene metalne ploče i komada drveta (koristi se za diskontinuirane procese zbog brze produkcije dima bez prethodnog zagrijavanja; problem predstavlja ekonomičnost postupka zbog visoke cijene debela drveta),
- c) generatori na bazi fluidizacije, gdje dim nastaje zbog razgradnje čestica strugotina drveta u struji pregrijanog zraka i pare bez pojave plamena pri T od oko 300 oC (prednost je u maloj emisiji dima i racionalnom korištenju drveta),
- d) elektrostatski (piljevina izgara u električnom polju između dvije elektrode) i
- e) generator s dimnom regeneracijom (atomizacijom), pri čemu se tekući dim ponovno pomoću komprimiranog zraka prevodi u plinovito stanje i struji komorom kao kod klasičnog načina dimljenja.

Također, koristi se i tekući dim (filtrirani dimni kondenzati) koji se proizvodi frakcijskom destilacijom osušenog drveta i primjenjuje namakanjem, raspršivanjem, injektiranjem ili dodavanjem kao dodatni sastojak (termički obrađeni proizvodi). Prednosti upotrebe tekućeg dima: jednostavna upotreba, nije potrebna investicija u pogon za dimljenje, dimljenje je tehnološki odvojeno od termičke obrade i nije kancerogen. Nedostatak upotrebe tekućeg dima: proizvodi tretirani tekućim dimom senzorski zaostaju za klasično dimljenim proizvodima. (Krvavica i sur., 2013.) Dim proizveden jednim od navedenih načina u generatorima se sustavom cijevi i pomoću ventilatora provodi u pušnicu. Pušnica i generator dima dio su uređaja tzv. dimnih komora. Na putu do generatora dim se može zagrijavati, hladiti i pročišćavati. Najčešće se za pročišćavanje dima koristi hladna voda koja u obliku spreja u početnom dijelu dimovoda ispire i pročišćava dim od nepoželjnih sastojaka čvrste dimne frakcije.

U industriji se koriste automatizirane komore i generatori za proizvodnju dima koji osiguravaju niske temperature tinjanja i stvaranja poželjnih aroma drveta, dok se u seoskim domaćinstvima koriste nekoliko metara visoke pušnice s proizvodnjom dima u pušnici ili su izgrađena vanjska ložišta. Vanjska ložišta su bolje tehničko rješenje, jer se lakše može osigurati temperatura hladnog dimljenja s obzirom na to da se proizvedeni dim iz ložišta pomoću cijevi dovodi u pušnicu i pritom njezina dužina može služiti za reguliranje temperature dima. Ukoliko je ložište unutar pušnice koriste se razni načini sprječavanja izravne izloženosti proizvoda toplom dimu ili plamenu, a najčešće postavljanjem perforirane barijere (metalnog perforiranog lima) između ložišta i šunki ovješene o „pritke“. Kalo pri hladnom dimljenju trajnih proizvoda s naknadnim sušenjem kreće se u rasponu od 24 do 40%, kalo pri toplom dimljenju obarenih kobasica u rasponu od 10 do 14%, a kalo pri toplom dimljenju polutrajnih kobasica između 6 - 12% (Živković, 1986; Vuković, 2012).

## 3.EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJAL

Za istraživanje su korišteni uzorci standardno proizvedenih (n=4) i manje dimljenih (n=4) turopoljskih šunki proizvedenih od svinja oba spola (nazimice i kastrati) autohtone turopoljske pasmine iz otvorenog uzgoja, hranjenih sa ili bez dodatka žira (tablica 2).

**Tablica 2.** Uzorci korišteni u istraživanju

| Hranidba         | Standardna smjesa |          | Uz dodatak žira |          |
|------------------|-------------------|----------|-----------------|----------|
|                  | kastrat           | nazimica | kastrat         | nazimica |
| Spol             |                   |          |                 |          |
| Tehnologija      |                   |          |                 |          |
| - manje dimljeno | 86A               | 88A      | 62A             | 31A      |
| - kontrola       | 87A               | 85A      | 69A             | 65A      |

Svinje su bile uzgojene u gateru pokušališta Agronomskog fakulteta iz Zagreba u Šiljakovačkoj Dubravi, na način da je jedna grupa tovljenika u završnoj hranidbi (1,5 mjesec prije klanja), uz standardnu krmnu smjesu za svinje u tovu (ST-2) bila prihranjivana i žirom hrasta lužnjaka (*Quercus robur*L.), koji se nekada tradicionalno koristio u hranidbi turopoljskih svinja, dok je druga grupa tovljenika tijekom istog perioda bila hranjena samo ST-2 krmnom smjesom. Prosječna dob i završna masa tovljenika prije klanja iznosila je  $18,15 \pm 1,4$  mjeseci i  $94,8 \pm 11,5$  kg. Klanje i klaoničke obrada tovljenika obje skupine obavljani su prema standardnoj proceduri u odobrenom objektu (Klaonica 32 d.o.o., Velika Mlaka), a rasijecanje polovica i prerada mesa u jednom mesno-prerađivačkom objektu u okolici Zagreba (IGO-MAT d.o.o., Otruševac). Za standardnu proizvodnju turopoljskih šunkiobrađeni butovi ručno su natrljani smjesom soli za salamurenje (do 2,5 % na ukupnu masu mesa,  $\text{NaNO}_2$  0,54-0,66%) i začina (crni papar, češnjak, začinska paprika), naslagani u velike PVC kace te ostavljeni na hladnom ( $T=4$  °C) da se sole kroz 5 tjedana. Nakon soljenja, butovi su hladno dimljeni u dimnoj komori ( $T=18$  °C, RVZ=80 %) dimom bukovog drveta ukupno 8 puta, nakon čega su premješteni u komoru na sušenje i zrenje u kontroliranim uvjetima ( $T=12$  °C, RVZ=75%). Kod manje dimljenih šunki razlika u odnosu na gore opisanu standardnu preradu sastojala se u 50%-tnoj redukciji aplikacije dima u dimnoj komori (5 umjesto 10 dimljenja).

Uzorkovanje za kemijske analize obavljeno je kada su šunke bile stare oko 15 mjeseci. Distribucija uzoraka šunki prema spolu i hranidbenoj skupini svinja bila je jednaka.

## 3.2. METODE

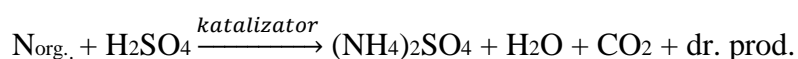
### 3.2.1. Određivanje ukupnih proteina

Postupak se zasniva na Kjeldahlovom principu, razvio ju je danski kemičar Johan Kjeldahl. Spomenuta metoda se koristi za kvantitativno određivanje dušika (proteina). Proteini sadrže prosječno 16 % dušika, pomoću kojeg se indirektno određuje količina ukupnih proteina. Postupak se sastoji od tri faze: vlažnog spaljivanja/oksidacije; destilacije i titracije.

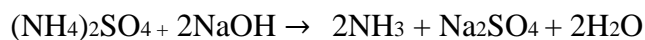
**Princip.** Uzorak je zagrijavan s koncentriranom sumpornom kiselinom uz dodatak katalizatora ( $\text{CuSO}_4$ ) i soli za povišenje vrelišta ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) prilikom čega je došlo do potpune oksidacije organske tvari ( $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ ), a dušik koji je pri tome oslobođen u obliku  $\text{NH}_3$  sa  $\text{H}_2\text{SO}_4$  daje  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . U drugoj fazi određivanja (destilacija) djelovanjem lužine na amonij-sulfat oslobođen je amonijak koji je predestiliran vodenom parom u tikvicu s kiselinom poznate koncentracije. Višak kiseline određen je titracijom.

#### Jednadžbe reakcija.

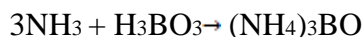
##### *Mineralizacija*



##### *Alkalizacija s NaOH u suvišku*



##### *Destilacija u bornu kiselinu u suvišku*



##### *Titracija amonijevog borata klorovodičnom kiselinom*





**Postupak u bloku za spaljivanje.** Epruvete bi trebale biti čiste i suhe. Uzorak je izvagan na listić aluminijske folije (2 g s točnošću  $\pm 0,01$  g), umotan se i ubačen u epruvetu. U svaku kivetu dodane su 2 tablete Kjeldahl katalizatora i 14 ml konc.  $H_2SO_4$  kiseline i 5 ml  $H_2O_2$  te je lagano mijšan dok se uzorak potpuno navlaži. Po završetku reakcije, stalak s epruvetama stavljen je u digestijsku jedinicu za mineralizaciju i uključen je sustav za odvod para. Prvih 10 minuta spaljivanje ide uz maksimalan protok vode (10 minuta) nakon čega se protok vode smanji na 50%. Mineralizacija je gotova nakon što je tekućina u epruvetama bistra i svjetlo zelene boje. Epruvete su zajedno sa stalkom uklonjene iz digestijske jedinice i ostavljene na hlađenje zajedno s poklopcem do sobne temperature. Zatim je u svaku epruvetu dodano 80 ml destilirane vode.

**Postupak destilacije.** Erlanmayerevu tikvicu, koja sadrži 25 ml borne kiseline, stavljen je na postolje u destilacijsku jedinicu. Tikvicu je postavljena u gornji položaj kako bi destilacijska cijevčica bila uronjena u otopinu. Kjeldahlova epruveta stavljen je na svoje mjesto i zatvore se sigurnosna vratašca. Dozirano je 50 ml 40% NaOH u Kjeldahlovu epruvetu. Destilacija se odvija 4 minute. Destilat je zelene boje što ukazuje na prisutnost amonijaka. Destilat bi trebao biti hladan da ne bi došlo do gubitka amonijaka.

**Titracija klorovodičnom kiselinom.** Bireta je napunjena s 0,2 N HCl te je titrirana direktno u prihvatnu tikvicu. Po završetku titracije boja otopine postaje svjetlo ružičasta.

**Izračun.** Udio dušika računa se prema formuli:

$$\%N = \frac{(T - B) * c(HCl) * 14,007 * 100}{m(uzorak)[mg]} \quad (3.1)$$

gdje je:

T - utrošeni ml 0,2 M otopine HCl za titraciju uzorka

B - utrošeni ml 0,2 M otopine HCl slijepe probe

$c(HCl) = 0,2$  mol/l

Iz dobivenog postotka dušika množenjem faktorom za meso dobije se ukupni postotak proteina u uzorku

$$\%proteina = \%N * 6,25 \quad (3.2)$$

Za metodu po Kjeldahlu karakteristična je visoka preciznost i točnost, a nedostatak joj je dugo trajanje.

### 3.2.2. Određivanje neproteinskog dušika

Neproteinski dušik ekstrahiranje iz homogeniziranog uzorka odvage  $2,5 \pm 0,05$  g upotrebom 25 ml deionizirane vode te se centrifugira. Zatim je dodano 10 ml 20%-tne trikloroctene kiseline (99% čistoće, Merck), miješa i ostavlja 60 minuta da se stabilizira na sobnoj temperaturi. Centrifugira se na 3500 okr/min tijekom 30 minuta, a supernatant se filtrira i 15 ml filtrata koristi se za određivanje dušika prema metodi za ukupni dušik ( HRN ISO 937:1999).

15 ml dobivenog filtrata stavi se u Kjeldahlovu epruvetu, dodane su 2 tablete katalizatora (4 ako su manje), 14 ml  $H_2SO_4$  i 5 ml  $H_2O_2$ . Spaljuje se 2 sata (polako pojačavajući-15 minuta na 1; 30 minuta na 3; 30 minuta na 5 te ostatak vremena na 10). Ohladi se, doda 80 ml redestilirane vode te destilira sa 50 ml NaOH s 25 ml borne kiseline. Nakon destilacije titrirano je s 0,1 M HCl-om (ako je jako mali utrošak može se staviti 0,02 M HCl).

**Izračun.** Maseni udio dušika u uzorku računa se prema formuli

$$w_n = \frac{1,4007(V_s - V_b) * c_s}{m} \quad (3.3)$$

gdje je:

$w_n$ - maseni udio dušika u uzorku (%)

$V_s$ - volumen, u mililitrima, 0,1 N klorovodične kiseline potreban za određivanje

$V_b$ - volumen, u mililitrima, 0,1 N klorovodične kiseline potreban za slijepu probu

$c_s$  - koncentracija klorovodične kiseline, 0,1 N

$m$  - masa, u gramima, testnog dijela uzorka

### 3.2.3. Određivanje ukupnih karbonila

Priprema uzorka za određivanje ukupnih karbonila provedena je prema postupku koji su opisali Armenteros i sur. (2009). Izvagano je 1 g uzorka u falconicu (u duplikatu) i homogenizirano s 10 ml pirofosfatnog pufera (pH 7,4; 2 mM  $Na_4P_2O_7$ ; 10 mM tris-maleato; 100 mM KCl, 2 mM  $MgCl_2$ , 2 mM EGTA) na Ultra Turrax 30 sekundi (staviti u led uzorke). 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 Vortexu i centrifugirano na 10000 rpm tijekom 5 min ( $2^\circ C$ ). Sljedeći korak je izbacivanje supernatantaitoza:

*Pellet 1* → kvantifikacija proteina: dodati 1 ml HCl 2N

*Pellet 2* → mjerenje karbonila: dodati 1 ml 0,2% DNPH u HCl 2N

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

*Pellet 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.

*Pellet 2* → mjerenje karbonila: mjeri se na 370nm, i izračunava koncentracija karbonila koristeći jednadžbu:

$$A = \xi * M * l \quad (3.4)$$

Rezultat se izražava kao nmol karbonila po mg proteina korištenjem adsorpcijskog koeficijenta za proteinske hidrazone  $\xi = 21,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **Priprema baždarne krivulje.**

Baždarna krivulja napravljena je s bovine serum albumin (BSA) 2mg/ml –otopljeno je 20 mg (0,02 g) u 10 ml fosfatnog pufera+guanidin hidroklorida. Napravljen baždarni pravac prema tablici 3:

**Tablica 3.** Priprema baždarne krivulje

| BSA (ml) | Fosfatni pufer + guanidin 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             |

### 3.2.4. Indeks proteolize

Proteolitički indeks je dobar pokazatelj intenziteta proteolize, a određuje se fluorometrijski (Harkous i sur., 2014). Njegove vrijednosti rastu tijekom tehnološkog procesa proizvodnje

šunke, a veće su u *biceps femoris* (BF) nego u *m. semimembranaceus* (SM) što se može objasniti većim udjelom vode u tom unutrašnjem mišiću pa tako i jačom proteolitičkom aktivnošću (Harkouss i sur., 2015).

Za određivanje proteolitičke aktivnosti u šunki razvit će se metoda za određivanje indeksa proteolize. Razvit će se fluorometrijska procedura na spektrofluorometru (CLARIOstar Omega, BMG Labtech) u svrhu određivanja N- terminalnih  $\alpha$ -amino-skupina peptida i aminokiselina koji će odražavati intenzitet proteolitičkih aktivnosti tijekom tehnološkog procesa proizvodnje.

Metoda će se bazirati na fluorescentnom označavanju N-terminalnih  $\alpha$ -amino-skupina prisutnih u ekstraktu šunke otopljenom u 10%-tnoj trikloroctenoj kiselini (TCA) dok će se za određivanje ukupnih proteinskih karbonila razviti DNPH metoda. Ukupni proteinski karbonili bit će kvantificirani u suspenzijama proteina. Proteini će precipitirati dodatkom 10% TCA. Jedan plet bit će tretiran sa 2M HCl-om (određivanje koncentracije proteina) dok će drugi biti tretiran sa 0,2% (w/v) DNPH u 2M HCl (određivanje koncentracije ukupnih proteinskih karbonila). Uzorci će zatim biti precipitirani sa 10%-tnom TCA za ukljanjanje viška DNPH. Koncentracija ukupnih proteinskih karbonila će biti izražena na miligram proteina koristeći koeficijent adsorpcije na 370 nm. Ukupni proteinski karbonili se određuju kao mjera oksidacije proteina. Mnoge su se studije usredotočile na interakciju između oksidacije proteina i lipida, a povećani dokazi podupiru ideju da oksidacijski proizvodi iz proteina i lipida mogu dodatno povećati oksidaciju na recipročan način (Faustman i sur., 2010).

Indeks proteolize predstavlja odnos neproteinskog i ukupnog dušika. Ukupni dušik određen je Kjeldahl metodom na homogeniziranim uzorcima mišića težine 0,75g, a rezultati su izraženi u miligramima po gramu sušene suhe tvari.

Neproteinski dušik se određuje na način koji je opisan u Monin i sur. (1997). Ukratko, dodana je destilirana voda u 5 g homogeniziranih uzoraka mišića (konačna težina, 50 g) i homogenizirana pomoću Ultraturax homogenizatora (Janke & Kunkel GmbH, IKA Labortechnik, Staufen, Njemačka). Zatim je homogenat centrifugiran (1000 rpm tijekom 10 minuta) i prikupljen je alikvot od 10 ml supernatanta i dodan u 10 ml 20% trikloroctene kiseline. Nakon miješanja, smjesa je ostavljena da odstoji tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi i ponovo centrifugira pod istim uvjetima. Supernatant je propušten kroz filter

papir (Schwarzband 5891; Schleicher-Schell GmbH, Dassel, Njemačka) i upotrijebljen za mjerenje dušika pomoću Kjeldahl metode. Nепroteinski dušik izražava se kao postotak ukupnog dušika.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 4 prikazuje udjele proteinskog dušika u kontrolnim uzorcima te u manje dimljenim uzorcima.

**Tablica 4.** Udjel proteinskog dušika u ispitivanim uzorcima

| Hranidba                                        | Standardna smjesa |          | Uz dodatak žira |          | AVG  | SD   | CV |
|-------------------------------------------------|-------------------|----------|-----------------|----------|------|------|----|
|                                                 | Kastrat           | Nazimica | Kastrat         | Nazimica |      |      |    |
| Proteinski dušik u kontrolnim uzorcima (%)      | 4,95              | 4,51     | 4,52            | 4,45     | 4,61 | 0,23 | 5  |
| Proteinski dušik u manje dimljenim uzorcima (%) | 4,68              | 5,34     | 4,56            | 5,2      | 4,94 | 0,38 | 8  |

Kod kontrolnih uzoraka vrijednosti proteinskog dušika kreću se u rasponu od 4,45 do 4,95 % gdje je prosječna vrijednost 4,61 %. Prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti iznosi  $\pm 0,23$  ili 5%. U manje dimljenim uzorcima udjel proteinskog dušika kreće se u rasponu od 4,56 do 5,34 % uz prosječnu vrijednost 4,94 %. Prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti iznosi  $\pm 0,38$  odnosno 16 %.

**Tablica 5.** Udjel ukupnih proteina u ispitivanim uzorcima

| Spol                                    | Standardna smjesa |          | Uz dodatak žira |          | AVG   | SD   | CV |
|-----------------------------------------|-------------------|----------|-----------------|----------|-------|------|----|
|                                         | Kastrat           | Nazimica | Kastrat         | Nazimica |       |      |    |
| Proteini u kontrolnim uzorcima (%)      | 30,94             | 28,19    | 28,24           | 27,78    | 28,79 | 1,45 | 5  |
| Proteini u manje dimljenim uzorcima (%) | 29,23             | 33,39    | 28,5            | 32,48    | 30,9  | 2,39 | 8  |

Ranijim istraživanjima (Armenteros i sur., 2009) utvrđen je udjel ukupnih proteina u suhoj šunki u iznosu od 32.88% uz prosječno odsutpanje od prosječne vrijednosti koje iznosi  $\pm 0.79$ . Nadalje, u istraživanju koje su proveli (Senčić, 2009; Kos i sur., 2015) udjel ukupnih proteina kreće se u rasponu od 25 do 30 %.

U ovom istraživanju (tablica 4) udjel ukupnih proteina u kontrolnim uzorcima kreće se od 27,78 do 30,94 %, gdje je prosječna vrijednost 28,79 %. Prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti iznosi  $\pm 1,45$  ili 5%. Udjel proteina u manje dimljenim uzorcima se kreće od 28,5 do 33,39 %, a prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti iznosi  $\pm 2,39$  ili 8 %. Prosječna vrijednost proteina u manje dimljenim uzorcima iznosi 30,9 %.

Tablica 6 prikazuje udjele neproteinskog dušika u ispitivanim uzorcima.

**Tablica 6.** Udjel neproteinskog dušika u ispitivanim uzorcima

| Hranidba                                          | Standardna smjesa |          | Uz dodatak žira |          | AVG  | SD    | CV |
|---------------------------------------------------|-------------------|----------|-----------------|----------|------|-------|----|
|                                                   | Kastrat           | Nazimica | Kastrat         | Nazimica |      |       |    |
| Neproteinski dušik u kontrolnim uzorcima (%)      | 0,91              | 0,84     | 0,72            | 0,57     | 0,76 | 0,15  | 20 |
| Neproteinski dušik u manje dimljenim uzorcima (%) | 0,78              | 0,80     | 0,84            | 0,81     | 0,81 | 0,025 | 3  |

Kod kontrolnih uzoraka udjel neproteinskog dušika kreće se u rasponu od 0,57 do 0,91 %, prosječna vrijednost iznosi 0,76 %. Prosječno odstupanje od prosjeka iznosi  $\pm 0,15$  ili 20 %. S druge strane, kod manje dimljenih uzoraka primjećuje se uži raspon izmjerenih vrijednosti neproteinskog dušika, a kreću se od 0,78 do 0,84 %. Posljedica užeg raspona izmjerenih vrijednosti je i malo prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti, koje iznosi  $\pm 0,025$  ili 3 %. Prosječna vrijednost neproteinskog dušika u manje dimljenim uzorcima iznosi 0,81 %.

Tablica 7 sadrži podatke o udjelu hlapivog dušika u ispitivanim uzorcima koji se kreće u rasponu od 0,15 do 0,35.

**Tablica 7.** Udjel hlapivog dušika u ispitivanim uzorcima

| Hranidba                                     | Standardna smjesa |          | Uz dodatak žira |          | AVG  | SD   | CV |
|----------------------------------------------|-------------------|----------|-----------------|----------|------|------|----|
|                                              | Kastrat           | Nazimica | Kastrat         | Nazimica |      |      |    |
| Hlapivi dušik u kontrolnim uzorcima (%)      | 0,28              | 0,15     | 0,15            | 0,16     | 0,19 | 0,06 | 34 |
| Hlapivi dušik u manje dimljenim uzorcima (%) | 0,30              | 0,35     | 0,17            | 0,14     | 0,24 | 0,10 | 42 |

Iz prosječne vrijednosti je vidljivo kako je udjel hlapivog dušika veći u manje dimljenim uzorcima u odnosu na kontrolne uzorke. Vrijednosti hlapivog dušika u kontrolnim uzorcima se kreću od 0,15 do 0,35 uz prosječno odstupanje od prosjeka koje iznosi  $\pm 0,06$  ili 34%, uz prosječnu vrijednost od 0,19 %. Udjel hlapivog dušika u manje dimljenim uzorcima se kreće u rasponu od 0,14 do 0,35 %. Prosječna vrijednost iznosi 0,24 %. Iz tablice je također vidljivo i veće prosječno odstupanje od prosjeka, a iznosi 0,10 ili 42 %.

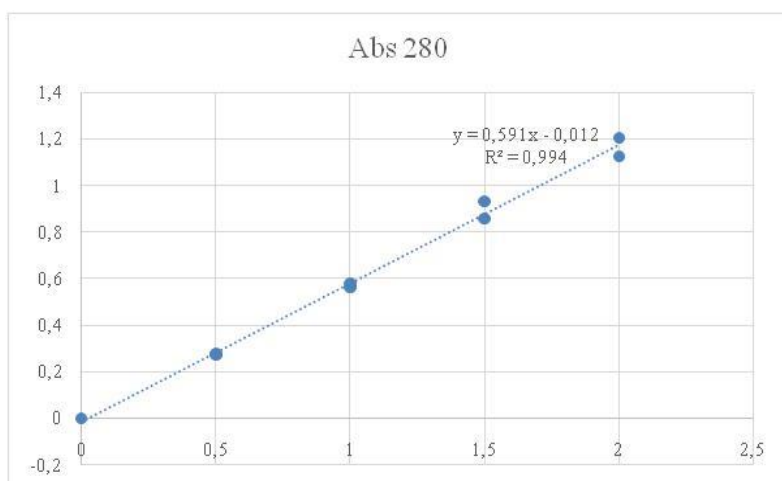
Tablica 8 prikazuje podatke vezane za indeks proteolize iz ispitivanih uzoraka.

**Tablica 8.** Indeks proteolize u ispitivanim uzorcima

| Hranidba                                         | Standardna smjesa |          | Uz dodatak žira |          | AVG   | SD   | CV  |
|--------------------------------------------------|-------------------|----------|-----------------|----------|-------|------|-----|
|                                                  | Kastrat           | Nazimica | Kastrat         | Nazimica |       |      |     |
| Spol                                             |                   |          |                 |          |       |      |     |
| Indeks proteolize u kontrolnim uzorcima (%)      | 19,83             | 18,63    | 15,93           | 12,81    | 16,80 | 3,12 | 19% |
| Indeks proteolize u manje dimljenim uzorcima (%) | 16,03             | 14,98    | 18,42           | 15,58    | 16,25 | 1,44 | 9%  |

Indeks proteolize u kontrolnim uzorcima se kreće u rasponu od 12,81 do 19,83 %, uz prosječnu vrijednost u iznosu od 16,80 %. Prosječno odstupanje od prosječne vrijednosti iznosi  $\pm 3,12$  ili 19 %. U manje dimljenim uzorcima indeks proteolize se kreće u vrijednosti od 14,98 do 18,42 %, prosječan indeks proteolize iznosi 16,25 %. Prosječno odstupanje od prosjeka iznosi 1,44 odnosno 9 %. Iz dobivenih podataka ispitivanih uzoraka može se primjetiti da nema velike razlike između prosječnih vrijednosti indeksa proteolize.

Sadržaj karbonila određen je spektrofotometrijski na 370 nm ( $\xi = 21,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), dok je sadržaj proteina određen mjerenjem apsorbancije uzorka na 280 nm. Koncentracija proteina u svakom uzorku izračunata je na temelju baždarnog pravca dobivenog mjerenjem apsorbancije niza razrjeđenja BSA (od  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  do  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Baždarnom pravcu BSA pridružena je odgovarajuća jednadžba pravca zatimje izračunat i koeficijent determinacije ( $R^2$ ) koji iznosi 0,994 (slika 9).



**Slika 10.** Baždarni pravac BSA

Koncentracija karbonila određena je prema formuli  $A = \xi * M * l$ , a rezultati su izraženi kao nmol karbonila po mg proteina korištenjem adsorpcijskog koeficijenta za proteinske hidrazone  $\xi = 21,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



**Tablica 9.** Koncentracija karbonila u ispitivanim uzorcima

| Hranidba                                                              | Standardna smjesa |          | Uz dodatak žira |          |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------|----------|-----------------|----------|
|                                                                       | Kastrat           | Nazimica | Kastrat         | Nazimica |
| Koncentracija u kontrolnim uzorcima (nmol karbonila/mg proteina)      | 26,96             | 27,10    | 22,24           | 26,33    |
| Koncentracija u manje dimljenim uzorcima (nmol karbonila/mg proteina) | 28,50             | 26,92    | 25,33           | 23,77    |

Tablica 9 sadrži podatke pomoću kojih se uspoređuju dobivene koncentracije karbonila u kontrolnim i manje dimljenim uzorcima. Prosječna koncentracija kontrolnih uzoraka je 25,66 nmol karbonila/mg proteina uz odstupanje  $\pm 2,30$  ili 9%. S druge strane, prosječna koncentracija karbonila manje dimljenih uzoraka je malo veća u odnosu na kontrolne uzorke, a iznosi 26,13 nmol karbonila  $\text{mg}^{-1}$  proteina, uz odstupanje  $\pm 2,04$  odnosno 8 %.

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja i dobivenih rezultata te rasprave može se zaključiti sljedeće :

1. Faza dimljenja nije imala utjecaj na proteinski, neproteinski te hlapivi dušik. Udio proteinskog dušika u kontrolnim uzorcima kretao se u rasponu od 27,78 do 30,94 %, dok se u manje dimljenim uzorcima kretao u rasponu od 28,5 do 33,39 %. Vrijednosti neproteinskog dušika u kontrolnim uzorcima kretale su se od 0,57 do 0,91 %, kod manje dimljenih uzoraka vrijednosti su se kretale u rasponu od 0,78 do 0,84 %. Za hlapivi dušik vrijednosti su se kretale kod kontrolnih uzoraka u rasponu od 0,15 do 0,28 %, kod manje dimljenih uzoraka vrijednosti od 0,14 do 0,35 %.
2. Također, faza dimljenja nije utjecala ni na indeks proteolize. U kontrolnim uzorcima vrijednosti indeksa proteolize su u rasponu od 12,81 do 19,83 %, a u manje dimljenim uzorcima od 14,98 do 18,42 %.
3. Uz pomoć DNPH metode određeni su udjeli karbonila, a njihov sadržaj kod kontrolnih uzoraka u prosjeku iznosio je 25,66 nmol karbonila/mg proteina. Koncentracija karbonila u manje dimljenim uzorcima iznosila je 26,13 nmol karbonila/mg proteina.
4. Iz dobivenih rezultata koncentracije karbonila u uzorcima, može se zaključiti kako ne postoji statistički značajna razlika između kontrolnih i manje dimljenih uzoraka te da faza dimljenja nije utjecala na ispitivane parametre.

## 6. LITERATURA

Anonymous 1 (2017) Dimljena šunka, <<http://igomat.hr/proizvodi/>>. Pristupljeno 30.08.2017.

Anonymous 2 (2017) Jamon Iberico, <<https://www.ibergour.co.uk/en>>. Pristupljeno 30.08.2017.

Anonymous 3 (2017) Jamon Serrano, <<https://www.eyeonspain.com/blogs/iwonderwhy/15864/the-history-of-jamonserrano.aspx>>. Pristupljeno 30.08.2017.

Anonymous 4 (2017) Pršutdi Parma, <<http://www.morgante.it/en>>. Pristupljeno 30.08.2017.

Anonymous 5 (2017) Pršut San Daniele, <<http://www.maison-gastellou-jambon-de-bayonne.com/>>. Pristupljeno 30.08.2017.

Anonymous 6 (2017) Jambon de Bayonne, <<http://studenti.ptfos.hr>>. Pristupljeno 30.08.2017.

Anonymous 7 (2017) Smoked dry-cured hams, <<http://visitculpeperva.com/listing/calhouns-country-hams.aspx>>. Pristupljeno 30.08.2017.

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

Baron, C. P., Anderson, H. J. (2002) Myoglobin-induced lipid oxidation. A review. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3887–3897.

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

Chan, W. K. M., Faustman, C., Yin, M. C., Decker, E. (1997) Lipid oxidation induced by oxymyoglobin and metmyoglobin with involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide anion. *Meat Sci.* **46**, 181–190.

Chan, J. T. Y., Omana, D. A., Betti, M. (2011) Effect of ultimate pH and freezing on the biochemical properties of proteins in turkey breast meat. *Food Chem.* **127**, 109–117.

Davies, M. J. A. (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochim. Biophys. Acta.* **1703**, 93–109.

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**, 186–189.

DOOR - Database of agricultural products and foods registered or awaiting possible registration as PDO (Protected Designations of Origin), PGI (Protected Geographical Indications) or TSG (Traditional SpecialitieGuaranteed)(2017a)Jabugo, <<http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/registeredName>>. Pristupljeno 09. 4. 2017.

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  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes from myofibrillar proteins oxidized by copper, iron and myoglobin. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4448–4455.

Estevez, M., Ventanas, S., Cava, R. (2007) Oxidation of lipids and proteins in frankfurters with different fatty acid compositions and tocopherol and phenolic contents. *Food Chem.* **100**, 55–63.

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

Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., Suman, S. P. (2010) Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Sci.* **86**, 86–94.

Haak, L., Raes, K., Smet, K., Claeys, E., Paelinck, H., de Smet, S. (2006) Effect of dietary antioxidant and fatty acid supply on the oxidative stability of fresh and cooked pork. *Meat Sci.* **74**, 476–486.

Harkouss, R., Safa, H., Gatellier, P., Lebert, A., Mirade, P.S. (2014) Building phenomenological models that relate proteolysis in pork muscles to temperature, water and salt content. *Food Chem.* **151**, 7–14

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.

Huff-Lonergan, E. (2010.): Chemistry and Biochemistry of Meat. U: Handbook of Meat Processing. Toldrá, F.(ur.), Wiley-Blackwell, Oxford, str. 125-142.

Jarenback, L., Liljemark, A. (1975) Ultrastructural changes during frozen storage of cod. III: Effects of linoleic acid and linoleic acid hydroperoxides on myofibrillar proteins. *Int. J. Food Sci. Tech.* **10**, 437–452.

Jin, G., He, L., Zhang, J., Yu, X., Wang, J., Huang, F. (2012) Effects of temperature and NaCl percentage on lipid oxidation in pork muscle and exploration of the controlling method using response surface methodology (RSM). *Food Chem.* **131**, 817–825.

Jo, C., Ahn, D. U. (2000) Production of volatile compounds from irradiated oil emulsion containing amino acids or proteins. *J. Food Sci.* **65**, 612–616.

Jiménez-Colmenero, F., Ventanas, J., Toldrá, F. (2010) Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. *Meat Sci.* **84**, 585-593.

Joo, S.T., Kaufmann, R.G., Kim, B.C., Pork, G.B. (1999) The relation ship of sarcoplasmic and myobrillar protein solubility to coulour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat Sci.* **52**,291-297.

Kovačević, D., Pleadin, J., Mastanjević, K., Frece, J. (2014) Opasnosti od površinske kontaminacije plijesnima u tradicionalnoj proizvodnji kulena. *Meso* **16** (2) 162-168.

Kos, I., Mandir, A., Toić, U. (2015). Dalmatinski pršut-Oznaka zemljopisnog podrijetla, Specifikacija, Udruga dalmatinski pršut, Trilj.

Krvavica, M., Đugum, J., Kegalj, A., Vrdoljak, M. (2013) Dimljenje - postupci i učinci na mesne proizvode. *Meso* **15** (3) 202-207.

Ledesma, E., Rendueles, M., Diaz, M. (2015) Spanish smoked meat products: Benzo(a)pyrene (BaP)contamination and moisture. *J. Food Comp. Anal.* **37**, 87-94.

Lederer, M. O. (1996) Reactivity of lysine moieties toward  $\gamma$  -Hydroxy- $\alpha,\beta$ -unsaturated Epoxides: A model study on protein–lipid oxidation product interaction. *J. Agric.Food Chem.* **44**, 2532–2537.

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

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.

Liu, Z., Xiong, Y. L., Chen, J. (2010) Protein oxidation enhances hydration but suppresses water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *J. Agric.Food Chem.* **58**, 10697–10704.

Lund, M. N., Hviid, M. S., Claudi-Magnussen, C., Skibsted, L. H. (2008) Effects of dietary soybean oil on lipid and protein oxidation in pork patties during chill storage. *Meat Sci.* **79**, 727–733.

Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., Estevez, M. (2010) Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 1–13.

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.

Lund, M. N., Lametsch, R., Hviid, M. S., Jensen, O. N., Skibsted, L. H. (2007) High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. *Meat Sci.* **77**, 295–303.

Maheswarappa, N. B., Faustman, C., Tatiyaborworntham, N., Yin, S., Ramanathan, R., Mancini, R. A. (2009) Mass spectrometric characterization and redox instability of turkey and chicken myoglobins as induced by unsaturated aldehydes. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 8668–8676.

Mercier, Y., Gatellier, P., Viau, M., Remignon, H., Renner, M. (1998) Effect of dietary fat and vitamin E on color stability and on lipid and protein oxidation in turkey meat during storage. *Meat Sci.* **48**, 301–318.

Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martin, J. F., Cornet, M., Lanore, D., Grasso, F. (1997) Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Sci.* **47**, 29–47.

Montero, P., Giménez, B., Pérez-Mateos, M., Gómez-Guillén, M. C. (2005) Oxidation stability of muscle with quercetin and rosemary during thermal and high-pressure gelation. *Food Chem.* **93**, 17–23.

Nute, G. R., Richardson, R. I., Wood, J. D., Hughes, S. I., Wilkinson, R. G., Cooper, S. L., Sinclair, L. A. (2007) Effect of dietary oil source on the flavor and the colour and lipid stability of lamb meat. *Meat Sci.* **77**, 547–555.

Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S., Stadtman, E. R. (1987) Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* **262**, 5488–5491.

Pöhlmann, M., Hitzel, A., Schwägele, F., Speer, K., Jira, W. (2013) Polycyclic aromatic hydrocarbons and phenolic substances in smoked Frankfurter-type sausages depending on type of casing and fat content. *Food Contr.* **31**, 136-144.

Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T. (1988) *Fleisch Technologie und Hygiene der Gewinnung und Verarbeitung*. Ulmer, E. (ur.). GmbH & Co., Stuttgart.

Rowe, L. J., Maddock, K. R., Lonergan, S. M., Huff-Lonergan, E. (2004b) Oxidation environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of  $\mu$ -calpain. *J. Anim. Sci.* **82**, 3254–3266.

Senčić, Đ. (2009) *Slavonska šunka – hrvatski autohtoni proizvod*. Osijek: Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

Senčić, Đ., Samac, D. (2016.) Nutritivna vrijednost svinjskog mesa - predrasude i stvarnost. *Meso.* **18** (3) 264-268.

Shimizu, Y., Kiriake, S., Ohtubo, S., Sakai, T. (2009) Effect of NaCl on protein and lipid oxidation in frozen yellowtail meat. *Bioscience, Biotechnol. Biochem.* **73**, 923–925.

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

Suman, S. P., Faustman, C., Stamer, S. L., Liebler, D. C. (2006) Redox in stability induced by 4-hydroxy-2-nonenal in porcine and bovine myoglobins, at pH 5.6, 4°C. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3402–3408.



Sun, W. Z., Cui, C., Zhao, M. M., Zhao, Q. Z., Yang, B. (2011) Effects of composition and oxidation of proteins on their solubility, aggregation and proteolytic susceptibility during processing of cantonese sausage. *Food Chem.* **124**, 336-341.

Toldrá, F. (2002) Dry-Cured Meat Products. Food & Nutrition Press, Trumbull, Connecticut.

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.

Virgili, R., Degni, M., Schivazappa, C., Faeti, V., Poletti, E., Marchetto, G., Pacchioli, M. T., Mordenti, A. (2003) Effect of age at slaughter on carcass traits and meat quality of Italian heavy pigs. *J. Anim. Sci.* **81**, 2448-2456.

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.

Vuković, K.I. (2012) Osnove tehnologije mesa. IV. izdanje. Veterinarska komora Srbije, Beograd.

Zakrys, P. I., Hogan, S. A., O'Sullivan, M. G., Allen, P. i Kerry, J. P. (2008) Effects of oxygen concentration on the sensory evaluation and quality indicators of beef muscle packed under modified atmosphere. *Meat Sci.* **79**, 648–655.

Zakrys, P. I., O'Sullivan, M. G., Allen, P., & Kerry, J. P. (2009) Consumer acceptability and physiochemical characteristics of modified atmosphere packed beef steaks. *Meat Sci.* **81**, 720–725.

Zamora, R., Alaiz, M., Hidalgo, F. J. (2000) Contribution of pyrrole formation and polymerization to the nonenzymatic browning produced by amino-carbonyl reactions. *J. Agric. Food Chem.* **8**, 3152–3158.

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.

Živković, J. (1986.) Higijena i tehnologija mesa. II. dio. GRO Tipografija, Đakovo i Veterinarija, Zagreb.