

idation of laying hens in high ambient temperatures. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 107, 199-202.

**Peebles, E. D., M. R. Burnham, R. L. Walzem, S. L. Branton, P. D. Gerard (2004):** Effects of fasting on serum lipids and lipoproteins profiles in the egg-laying hen (*Gallus domesticus*). Comp. Biochem. Physiol. 138, 305-311.

**Placer, Z. A., L.L. Cushman, B. Connor Johnson (1966):** Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. Anal. Biochem. 16, 359-364.

**Sales, J. (1998):** Fatty acid composition and cholesterol content of different ostrich muscle. Meat Sci. 49, 489-492.

**Sato, K., Y. Akiba, M. Horiguchi (1997):** Species differences between chickens and rats in chemical properties of adipose tissue lipoprotein lipase. Comp. Biochem. Physiol. 118A, 855-858.

**Sävendahl, L., L. E. Underwood (1999):** Fasting Increases Serum Total Cholesterol, LDL Cholesterol and Apolipoprotein B in Healthy, Nonobese Humans. J. Nutr. 129, 2005-2008.

**Sugden, M. C., M. J. Holness, R. M. Howard (1993):** Changes of lipoprotein lipase activities in adipose tissue, heart and skeletal muscle during continuous or interrupted feeding. Biochem. J. 292, 113-119.

**Swaner, J. C., W. E. Connor (1975):** Hypercholesterolemia of total starvation: its mechanism via tissue mobilization of cholesterol. Am. J. Physiol. 229, 365-369.

**Tan, M. H., T. Sata, R. J. Havel (1977):** The significance of lipoprotein lipase in rat skeletal muscle. J. Lipid Res. 18, 363-370.

**Trotta, R. J., S.G. Sullivan, A. Stern (1982):** Lipid peroxidation

and hemoglobin degeneration in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. Biochem. J. 204, 405-415.

**Tsopanakis, C., C. Tesserommatis (1990):** Cold Swimming Stress: Effects on Serum Lipids, Lipoproteins and LCAT Activity in Male and Female Rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 38, 813-816.

**Yasuhara, M., T. Ohara, N. Matsuki, H. Saito, J. Shiga, K. Inoue, K. Kurokawa, T. Teramoto (1991):** Induction of fatty liver by fasting in suncus. J. Lipid Res. 32, 887-891

\*Rad je prezentiran na VII. znanstveno-stručnom simpoziju PERADARSKI DANI 2007. s međunarodnim sudjelovanjem, Poreč 07. – 10. svibnja 2007.

\*\*Izrada ovog rada je odobrena od Uprave za veterinarstvo Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva RH rješenjem klasa: UP/I 322-01/04-01/119, ur. br. 525-06-04-02 LJ.Z. od 25. listopada 2004.

Istraživanja su financirana od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH projekt broj 053-0531854-1866.

#### Zahvala

Autori se zahvaljuju Jasni Sačer na velikoj pomoći tijekom tehničke izvedbe pokusa.

Prispjelo / Received: 1.6.2007.

Prihvaćeno / Accepted: 15.6.2007. ■

# POSTUPCI DOKAZIVANJA VRSTE ANIMALNIH BJELANČEVINA

Smajlović<sup>1</sup> M., A. Kratina<sup>2</sup>, A. Smajlović<sup>3</sup>, F. Čaklovića<sup>1</sup>, D. Alagić<sup>1</sup>, K. Čaklovića<sup>1</sup>, E. Članjak, E. Kratina<sup>4</sup>

## SAŽETAK

Identifikacija vrste mesa odnosno vrste animalnih bjelančevina vrši se u mnogim zemljama iz različitih razloga, kako ekonomskih tako i religijskih i zdravstvenih. Cilj te identifikacije je sprečavanje zamjene odgovarajućeg

mesa, namijenjenog za ljudsku upotrebu, s neodgovarajućim ili manje vrijednim.

Identifikaciju vrste mesa često otežava termička obrada mesa i proizvoda od mesa jer tijekom ovih procesa dolazi do promjene svojstava i sastava mesa, što se naročito

<sup>1</sup> Dr. sc. Muhamed Smajlović, viši asistent; dr. sc. Faruk Čaklovića, redoviti profesor; mr.sc. Alagić Davor, viši asistent, Kenan Čaklovića dr.vet.med., asistent, Enida Članjak, dr.vet.med., stručni saradnik; Zavod za higijenu i tehnologiju namirnica, Veterinarski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Bosna i Hercegovina

<sup>2</sup> Mr.sc. Ahmed Smajlović, viši asistent, Zavod za farmakologiju i toksikologiju, Veterinarski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Bosna i Hercegovina

<sup>3</sup> Spec. Alma Kratina, dr.vet.med., Zenica

<sup>4</sup> Mr.sc. Emir Kratina, Federalna sanitarna inspekcija, Ministarstvo zdravstva Federacije BiH

odnosi na bjelančevine i masti.

*Kvalitativna identifikacija vrste mesa je uvijek na prvom mjestu. Analitička identifikacija vrste je zasnovana na izdvajanju njenih specifičnih dijelova i svojstava, koje su genetski određene. Na osnovi primijenjenog principa detekcije moguće je razlikovati određene skupine metoda kao što su fizikalno-kemijske, serološke i molekularno-biološke metode.*

**Ključne riječi:** metode, vrsta mesa

## UVOD

Kao i kroz povijest, danas se poklanja posebna pažnja higijenskoj ispravnosti i sljedivosti naročito namirnica animalnog porijekla. U međunarodnoj trgovini proizvodima životinjskog porijekla, traže se dokazi o porijeklu i sastavnim dijelovima određene namirnice, certifikat o fizikalno-kemijskoj kvaliteti i mikrobiološkoj ispravnosti, potvrda o nepostojanju ili postojanju definiranih tolerantnih količina različitih rezidua kemijskog porijekla u hrani, vrsti bjelančevina i masti u namirnicama itd. Sve ovo se radi u cilju sprečavanja širenja različitih zaraznih bolesti i trovanja ljudi i životinja koje su u vezi s hranom ili iz kulturnih, vjerskih ili gastronomskih navika. U zadnjih nekoliko godina je naročito aktualan slučaj bovine spongiformne encefalopatije (BSE), što obavezuje na kontrolu animalnih bjelančevina u stočnoj hrani.

Identifikacija vrste mesa odnosno animalnih bjelančevina je važna kontrolna mjera koja služi u sprečavanju zamjene određenog mesa onim koje je zabranjeno za određene društvene grupe ili manje vrijednim vrstama mesa u proizvodima od mesa koji su namijenjeni za ljudsku upotrebu (Čaklovića i sur., 1998.; Necidova i sur., 2002.). Osim ovoga, falsificiranje mesnih proizvoda i njihovo neodgovarajuće deklariranje može dovesti do opasnosti od pojave različitih alergijskih reakcija kod osjetljivih potrošača s nepredvidivim ishodom (Necidova i sur., 2002.).

U nadzoru primjene propisa o deklaraciji vrsta mesa u prometu, koriste se anatomsko-morfološka, vizualna i druga organoleptička svojstva mesa, a po potrebi i laboratorijska ispitivanja (histološka, fizikalno-kemijska, serološka i dr.). Pripadnost velikih komada mesa određenoj vrsti može se utvrditi bez poteškoća, jer postoje izrazite razlike u anatomskoj građi i u svojstvima mišićnog, vezivnog i masnog tkiva. Posebne poteškoće predstavlja diferencijacija

malih komada mesa, te mljevenog i termički obrađenog mesa (kuhano, pečeno itd.). Za dokazivanje vrsta mesa u miješanim supstratima (konzerve, kobasice i sl.), organoleptički nalaz je nesiguran i na njega se ne može osloniti, a prednost treba dati različitim analitičkim postupcima.

## 1. FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE

### 1.1. Histološka pretraga

Kao metoda za identifikaciju vrste animalnih bjelančevina odnosno vrste mesa, histološka pretraga se danas rjeđe koristi zbog postojanja pouzdanijih metoda. Zasniva se na primjeni specifičnog načina bojenja ispitivanog uzorka ili kemijski (određivanje količine oksiprolina), gdje se pokušava utvrditi prisutnost grubljeg vezivnog tkiva. Metoda se koristi za utvrđivanja patvorenja kobasica dodavanjem nedeklariranih vrsta mesa i to samo u slučaju kada nadjev ispitivane kobasice nije suviše usitnjen, jer je u suprotnom metoda nepouzdana (Rašeta, 1981).

### 1.2. Fluorescencija pod UV svjetlom

UV svjetlost se može koristiti za detekciju pridodanih životinjskih dijelova mješovitim supstratima kao što su konzerve ili kobasice na način da se hrvkavično, koštano i vezivno tkivo boje bijelo, kuhana jetra svjetlo ili tamno žuto, kuhano vime u različitim nijansama žute boje, dok loj i druga masna tkiva ne fluoresciraju. Kao i kod histološke pretrage, ova metoda je od koristi samo onda ako supstrat nije suviše usitnjen (Rašeta, 1981.).

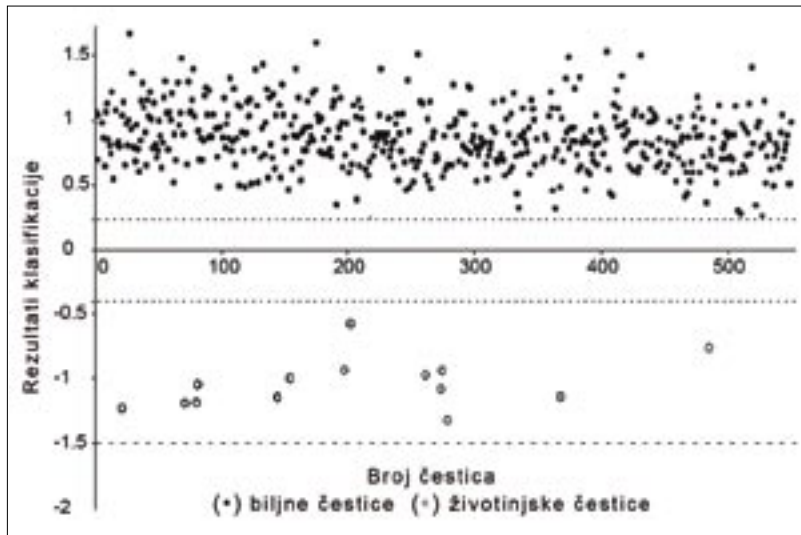
### 1.3. Mikroskopija

1.3.1. Metoda bliske infracrvene spektroskopije (eng. Near Infrared Spectroscopy-NIRS)

Ova tehnika je naročito korisna za identifikaciju organskih supstanci. Princip rada NIRS-a se zasniva na absorpciji svjetlosti (absorbanci) određene valne dužine elektromagnetnog spektra od strane molekula koje sadrže analizirani uzorak. Ovo je analitička metoda široko zastupljena u proizvodnji hrane, a prednosti su joj brzina, upotreba bezopasnih reagensa, kratka i jednostavna priprema uzorka, ekonomska pristupačnost itd. Osnovni nedostatak ove metode je to što je indirektna i zbog toga zahtjeva veliki broj referentnih vrijednosti autentičnih uzoraka da bi se dobio kalibracijski ili diferencijalni model. Metode temeljene na NIRS

▼ **Slika 1.** Izgled bliskog infracrvenog spektra za hranu koja sadrži komponente biljnog (•) i životinjskog porijekla (◦).

▼ **Figure 1.** Appearance of near infrared spectrum for food containing components of vegetable (•) and animal origin (◦).



tehnologiji imaju svoju aplikativnu ulogu u globalnoj kontroli sastavnih dijelova stočne hrane. Metode su dosta jednostavne za upotrebu i mogu se koristiti za brzu detekciju sumnjivog materijala, nakon čega se može upotrijebiti neka od potvrđnih metoda (Gizzi i sur., 2003; slika 1.).

1.3.2. Vibracijska spektroskopija FT-IR (Fourier Transform Infrared) je vrsta spektroskopije koja je danas uvelike zamijenila klasičnu infracrvenu spektroskopiju zbog veće brzine i osjetljivosti. Ova metoda se zasniva na matematičkoj operaciji transformacije kompleksnih krivulja u interferogram ili zbir različitih interferencija svjetlosnih valova koji se preklapaju, dok se krivulje komponenti u supstratu pretvaraju u infracrveni spektar. Ellis i sur. (2005) su korištenjem ove metode pokušali utvrditi mogućnost razlikovanja između kokošnjeg i purećeg mesa kao i utvrđivanje razlikovanja među mišićnim grupama ove dvije vrste peradi. Mjerenje FT-IR i Raman metodom je vršeno direktno s površine uzoraka mesa i ustanovljena je mogućnost određivanja životinjske vrste i vrste mišićne grupe nakon kvantitativne interpretacije infracrvenog spektra pomoću funkcijskih analiza.

#### 1.4. Kromatografske tehnike

##### 1.4.1. Tekućinska kromatografija (LC)

Kvantitativne i kvalitativne kromatografske razlike vrsta mesa se koriste za njihovu identifikaciju.

Tekuća kromatografija je jednostavna, brza i pouzdana metoda, a može se koristiti za detekciju vrsta svježeg i smrznutog mesa, te za određivanje vrste animalnih bjelančevina u mesnim mješavinama koje nisu toplinski obrađene. Ovom metodom moguće je izvršiti identifikaciju različitih vrsta mesa: sirove govedine, svinjetine, teletine, piletine, puretine i pačetine (Ashoor i sur., 1988). Uzorci se miješaju s vodom, a topive bjelančevine tih vodenih mješavina se separiraju pomoću LC metode. Meso (bjelančevine) iste životinjske vrste imaju iste kromatografske profile, a razlika je kvantitativna, dok meso (bjelančevine)

porijeklom od različitih vrsta životinja imaju i različite kromatografske profile.

##### 1.4.2. Plinska kromatografija

Ovom metodom se mogu dokazati različite vrste animalnih bjelančevina u miješanom supstratu. Detekciju tkiva centralnog nervnog sistema (CNS-a) tj. mozga i kičmene moždine, pomoću GC-MS metoda, i određenih masnih kiselina i njihovih metilnih estera, pokazala se kao uspješan prilaz problemu identifikacije riskantnih tkiva u mesnim proizvodima. Ovakvom analizom dostignut je nivo kvantifikacije tkiva CNS-a u količini od 0,01 % (Lucker i sur., 2004.).

## 2. SEROLOŠKE METODE

### 2.1. Precipitacija

Biološko diferenciranje bjelančevina pomoću precipitacije se zasniva na činjenici da se, poslije parenteralnog unošenja u organizam topivih bjelančevina, u njemu stvaraju specifične supstance, koje ih aglutiniraju i precipitiraju. U ovom slučaju, kao najpodesnije ogledne životinje pokazali su se kunići. Ubrizgavanjem sterilnog konjskog mesnog ekstrakta ili mesnog ekstrakta druge životinjske vrste u krv kunića, dobiva se serum kunića koji ima svojstvo da iz otopine taloži (precipitira) samo konjske bjelančevine ili bjelančevine druge korištene životinjske vrste (Rašeta, 1981).

**2.2. Agar gel imunodifuzija**

Hayden (1981) je koristio antiserum za termostabilne antigene kako bi utvrdio patvorenje u kuhanim goveđim kobasicama, koristeći imunodifuzioni test. Antiserum termostabilnih mišićnih antigena (TMAs) se može koristiti za identifikaciju vrste kod sirovih, kuhanih i autoklaviranih mesnih ekstrakata, čak i od filogenetski blisko srodnih vrsta pomoću testa agar gel imunodifuzije.

**2.2.1. Jednosmjerna radijalna imunodifuzija (Mancinijev postupak)**

Rezultat reakcije imunodifuzije vrši se mjerenjem promjera precipitacijskog kruga i izračunavanjem njegove površine, a dobiveni rezultat se uspoređi s podacima na baždarnoj krivulji. Ova krivulja se dobiva tako što se izmjere promjeri i izračunaju površine precipitacijskih krugova nastalih u reakciji između standarda antiimunoglobulina i uzorka seruma s poznatom količinom imunoglobulina (Naglić i Hajsig, 1993).

**2.2.2. Dvosmjerna radijalna imunodifuzija (Ouchterlony's postupak)**

Ovo je pouzdan postupak koji se jednostavno

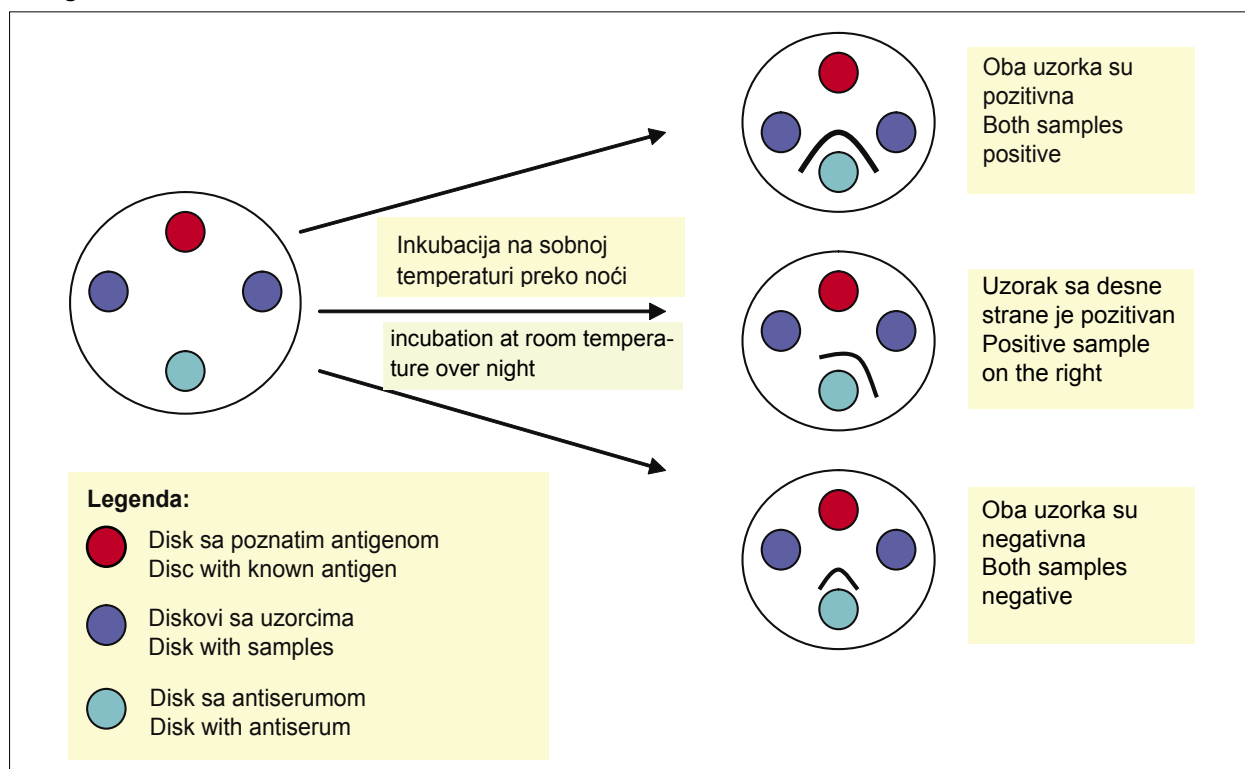
izvodi, a pogodan je u određivanju vrsta mesa. Ova metoda služi za razlikovanje animalnih bjelančevina u obarenim kobasicama. Od jednosmjerne radijalne imunodifuzije se razlikuje jer su oba učesnika serološke reakcije tj. antigen i antitijela, unose u udubljenja u agar gelu. Iz ovih udubljenja zrakasto difundiraju u gel tvoreći tako u njemu precipitacijsku liniju na mjestima gdje je došlo do uspostavljanja optimalnih odnosa njihovih koncentracija (slika 2). Ova metoda je znatno osjetljivija od jednosmjerne radijalne difuzije (Kang'ethe i sur., 1986; Poli i sur., 1977).

**2.3. Imunoelektroforeza**

Imunoelektroforeza je specifična metoda koja kombinira prednosti elektroforeze i imunodifuzije u gelu. Za identifikaciju vrsta mesa u mesnim proizvodima koristi se elektroforeza u agar gelu, u koji se antigen i antitijela stavljaju u posebna, nasuprot smještene udubljenja. Kada se uključi istosmjerna struja, antitijela se kreću prema katodi zbog strujanja pufera u tom smjeru (elektroendosmoza). Molekule antigena, koje su dovoljno jako negativno nabijene, kreću se u suprotnom smjeru prema anodi, pa na

▼ **Slika 2.** Shematski prikaz očitavanja rezultata dvosmjerne imunodifuzijske metode

▼ **Figure 2.** Results of imunodifusion method

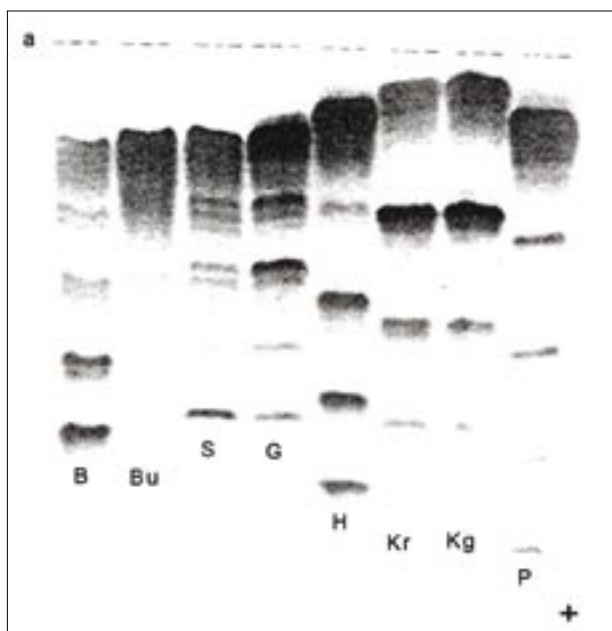


mjestu optimalnog odnosa koncentracija oba učesnika reakcije nastane precipitacijska linija (Naglić i Hajsig, 1993).

#### 2.4. Izoelektrično fokusiranje

▼ **Slika 3.** Separacija laktat dehidrogenaza izoenzima iz svježeg mesa s elektroforezom (Slattery i Sinclair, 1983)

▼ **Figure 3.** Separation of lactate dehydrogenase isoenzym from raw meat by electrophoresis (Slattery i Sinclair, 1983)



B – Beef / govedina  
Bu – Buffalo  
S – Sheep / ovčetina  
G – Goat/kozje meso  
H – Horse / konjetina

Kr - Red kangaroo / meso crvenog klokana  
Kg – Grey kangaroo / meso sivog klokana  
P – Pig/svinjetina

Ovo je tehnika kojom se u električnom polju razdvajaju bjelančevine na nosaču koji sadrži pH gradijent, obično s konstantnim padom pH vrijednosti od katode prema anodi. Proteini putuju pod utjecajem električnog polja od katode prema anodi, do onog pH gradijenta koji odgovara njihovim izoelektričnim točkama, gdje se koncentriraju u vrlo oštre frakcije. Danas postoje puferi sastavljeni od smjese sintetskih aminokiselina, amfolini, koji u električnom polju sami stvaraju pH gradijente. Ovom se tehnikom postiže vrlo dobro razdvajanje i zato se upotrebljava u eksperimentalnom radu u ispitivanjima sastava različitih bjelančevina (Štraus, 1988).

Drugi autori (Sinclair i Slattery, 1982; Skarpeid i sur., 1998) ovu metodu koriste u analizi uzoraka

svježeg mesa goveda, bufala, konja, klokana, ovce, kože i svinje, odnosno uzoraka s različitim količinama goveđeg, svinjskog i purećeg mesa. Rezultati su pokazali da se uz pomoć izoelektričnog fokusiranja može razlikovati vrsta mesa tj. napraviti razlika između svježeg mesa goveda, bufala, konja, klokana i svinje, ali nije moguće izvršiti diferencijaciju između mesa ovce i kože. Priprema uzoraka i tehnika separacije je jednostavna, a rezultati se mogu brzo dobiti.

#### 2.5. Immunobloting (Western Blot) tehnika

Ova tehnika daje informacije o prisutnosti, molekularskoj masi i/ili količini antigena kombiniranjem separacije bjelančevina gel elektroforezom i specifičnog prepoznavanja antigena odgovarajućim antitijelom. Immunobloting je jedna od tehnika za utvrđivanje tkiva CNS-a u proizvodima od mesa. Lucker i sur. (2000) su ovom metodom ispitivali toplinski obrađene mesne proizvode na prisutnost neuron- specifičnih eneolaza i glijalnih fibrilarnih kiselih bjelančevina i u uzorcima utvrdili tkivo CNS-a.

#### 2.6. Enzimski imunoapsorpcijska analiza

Ova metoda je danas široko rasprostranjena u dijagnostici različitih rezidua u hrani (antibiotika, hormona, mikotoksina itd.), kao i za utvrđivanje vrste bjelančevina u namirnicama. Poznatija je pod engleskim nazivom ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) i spada u grupu vrlo osjetljivih seroloških reakcija, a zasniva se na reakciji antigen-antitijelo.

Indirektna ELISA se koristi u pojednostavljenom obliku za analizu različitih sirovih vrsta mesa i proizvoda od sirovog mesa. Većina dostupnih ELISA postupaka za određivanje vrste sirovog mesa koriste poliklonalna antitijela krvnih bjelančevina, bjelančevina seruma (Griffiths i Billington 1984; Kang'ethe i sur., 1982; Patterson i sur. 1984) ili topivih bjelančevina mišića (Martin i sau., 1986).

Postupak dvostrukih antitijela (sendvič ELISA) prilagođen je identifikaciji antigena. Na stjenku udubljenja mikrotitracijske ploče se najprije absorbiraju neoznačena antitijela za antigen koji se ispituje. Na njih se nanese ispitivani antigenski pripravak, pa enzimom označena antitijela za antigen koji se želi dokazati, te se na kraju doda enzimski supstrat. Nakon nanošenja svakog pojedinačnog učesnika u reakciji i njihove inkubacije, nevezani učesnici u

reakciji se ispiru iz udubljenja puferskom otopinom, a pozitivan ili negativan rezultat reakcije odredi se prema promjeni boje supstrata.

### 3. MOLEKULSKO-BIOLOŠKE METODE

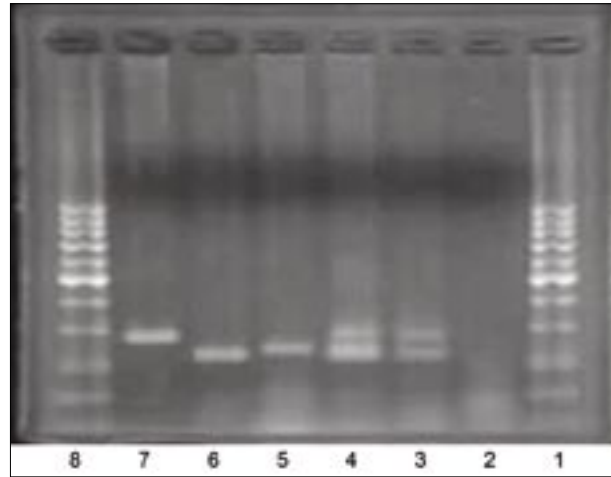
#### 3.1. Lančana reakcija polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction; PCR)

Princip identifikacije vrsta mesa ovom molekulo-biološkom metodom bazira se na umnožavanju jednog dijela citohrom-b gena. Svaka životinjska vrsta ima specifičnu građu DNK lanaca koja se nakon multipliciranja (umnožavanja) razdvaja elektroforezom u agar gelu (Meyer i sar., 1995.). Jednostavnim postupkom, koji se koristi i kod sirovih i kod termičkih obrađenih proizvoda od mesa, izolira se DNK iz ispitivanog uzorka, a zatim se PCR metodom iz ispitivane i poznate referentne DNK amplificiraju homologna područja citohrom-b gena. Ovaj gen je posebno važan zato što ga ima dosta u svim stanicama i zato što međunarodne banke podataka posjeduju detalje o njegovim sekvencama. Nakon elektroforeze se uspoređuju dobiveni profili, te se na osnovu njihovih razlika može izvršiti diferencijacija pojedinih vrsta mesa. Granice detekcije animalnih bjelančevina za ovu metode je ispod 1 % (Sun i Lin,

2003.), a za multipleks PCR metodu 0,25 % (Bellagamba i sur., 2003.).

▼ **Slika 4.** Različite početnice specifične za vrstu za detekciju goveđeg, svinjskog i ovčjeg mesa PCR metodom

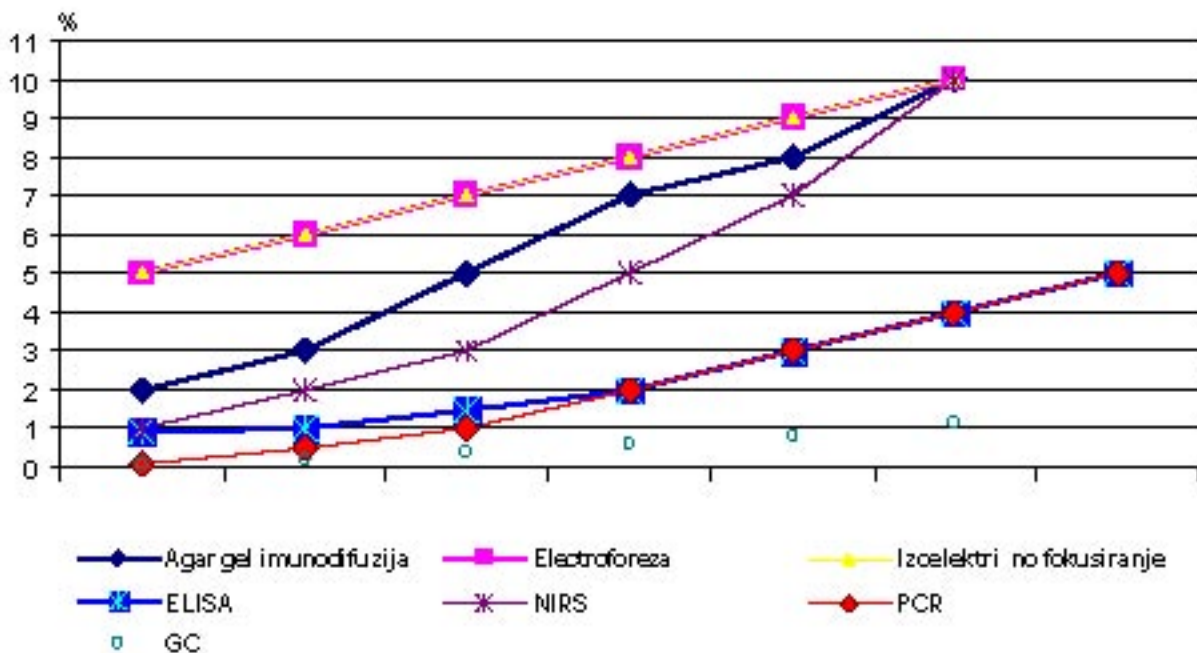
▼ **Figure 4.** Species specific primers for detection of beef, pork and sheep meat with PCR



Rezultati istraživanja granice detekcije svih metoda opisanih u ovom radu su prikazani u grafikonu 1. iz kog se vidi da su dijagnostičke metode s najnižom granicom detekcije plinska kromatografija (GC) čiji

▼ **Grafikon 1.** Komparacija osjetljivosti pojedinih metoda za dokazivanje vrste animalnih bjelančevina

▼ **Graph 1.** Sensitivity comparison of methods for identification of proteins of animal origin



je nivo kvantifikacije tkiva CNS-a u količini od 0,01 % (Lucker i sur., 2004), te već spomenute granice detekcije za PCR 1 % (Bellagamba i sar., 2003; Sun i Lin, 2003).

## UMJESTO ZAKLJUČKA

Usavršavanje metoda za dokazivanje vrste animalnih bjelančevina u mesu i mesnim proizvodima pokazuje vidljive rezultate. Svaka od postojećih metoda ima prednosti i nedostatke. Osjetljivost, specifičnost, mogućnost reproduciranja i praktičnost opisanih metoda su različiti. Nijedan od postupaka se ne može univerzalno zamijeniti nekim drugim, ali se oni mogu međusobno dopunjavati. U spornim slučajevima neophodno je imati na raspolaganju metode koje se zasnivaju na različitim principima i kriterijima dokazivanja.

## SUMMARY

### **METHODS FOR IDENTIFICATION OF ANIMAL PROTEIN ORIGIN**

*Identification of meat species or proteins of animal origin is being used in many countries from different reasons, like economic as well as religious and health reasons. The aim is to prevent replacement of the appropriate meat, assigned for human nutrition, with unsuitable or less valuable types.*

*The actual identification of animal species is very often made difficult in heat treated meat products because during this process, characteristics and content of components of meat parts change. This is especially true with proteins and fat.*

*Qualitative identification of meat species is always a primary issue. Analytical identification of one species rests on separation of specific components and their characteristics, which have been genetically determined. According to the applied principles of detection, it is possible to differentiate various groups of methods such as physical-chemical, serological and molecular-biological methods.*

**Key words:** *methods, meat species.*

## LITERATURA

**Ashoor S.H., W.C. Monte, P.G. Stiles (1988):** Liquid chromatographic identification of meats. *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 71, No. 2, 379-403.

**Ballagamba F., F. Valfre, S. Panseri, V.M. Moretti (2003):** Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *Journal of Food Protection*, 682-685,

Vol. 66, No. 4.

**Čaklovića F., M. Smajlović, B. Alić, R. Avdić, E. Bakšić, A. Telalović, E. Selimović, A. Smajlović (1998):** Legislativa hrane u zaštiti ne samo higijenskih načela, nego i kulturnih, nacionalnih, moralnih i vjerskih interesa naroda. II međunarodno naučno-stručno savjetovanje o mogućnostima proizvodnje zdravstveno sigurne hrane. Bugojno, 1998.

**Ellis D.I., D. Broadhurst, S.J. Clarke, R. Goodacre (2005):** Rapid identification of closely related muscle foods by vibrational spectroscopy and machine learning. *Analyst*, Vol. 130, No. 12, 1648-1654.

**Gizzi G., C. von Holst, V. Baeten, G. Berben, L. van Raamsdonk (2003):** An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 22 (1), 311-331.

**Griffiths N.M., M.J. Billington (1984):** Evaluation of an enzyme immunosorbent assay for beef blood serum to determine indirectly the apparent beef content of beef joints and model mixtures. *J. Sci. Food Agric.*, No. 35, 909-914.

**Hayden A.R.(1981):** Use of antisera to heat stable antigens of adrenals for species identification in thoroughly cooked beef sausages. *Journal of Food Science*, 810-814, Vol. 46.

**Kang'ethe E.K., J.M. Gathuma, K.J. Lindquist (1986):** Identification of the species origin of fresh, cooked and canned meat and meat products using antisera to thermostable muscle antigens by Ouchterlony's double diffusion test. *J. Set. Food Agric*, Vol. 37, 157-164.

**Hayden A.R.(1981):** Use of antisera to heat stable antigens of adrenals for species identification in thoroughly cooked beef sausages. *Journal of Food Science*, 810-814, Vol. 46.

**Kang'ethe E.K., J.M. Gathuma, K.J. Lindquist (1986):** Identification of the species origin of fresh, cooked and canned meat and meat products using antisera to thermostable muscle antigens by Ouchterlony's double diffusion test. *J. Set. Food Agric*, Vol. 37, 157-164..

**Kang'ethe E.K., S.J. Jones, R.L.S. Patterson (1982):** Identification of species origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *Meat Science*, Vol. 12, 229-240.

**Lucker E., W. Biedermann, S. Lachhab, U. Truyen, A. Hensel (2004):** GC-MS detection of central nervous tissue as TSE risk material in meat products: analytical quality and strategy. *Anal. Bioanal. Chem.*, 380 (7-8), 866-870.

**Lucker E.H., E. Eigenbrodt, S. Wenisch, R. Leiser, M. Bulte (2000):** Identification of central nervous system tissue in retail meat products. *Journal of Food Protection*, Vol.63, No. 2, 258-263.

**Martin P., J.I. Azcona, P.E. Hernandez, J. Tormo, C. Casas, B. Sanz (1986):** Detection of chicken meat in unheated meat mixtures by an indirect ELISA. In: *Proceedings of 32nd European Meeting of Meat Research Workers*, 429-433, 1986.

**Meyer R., U.Candrian, J.Luthy (1995):** Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of AOAC International*, Vol.78, No. 6, 1542-1551.

**Naglić T., D. Hajsig:** *Veterinarska imunologija*, Zagreb, 1993.

**Necidova L., E.Renčova, I. Svoboda (2002):** Counter immunoelectrophoresis: a simple method for detection of species-specific muscle proteins in heat-treated products. *Vet. Med.-Czech.*, Vol. 47, No. 5, 143-147.

**Patterson M.R., R.G. Whittaker, M. Spencer (1984):** Improved species identification of raw meat by double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Sci. Food Agri.*, Vol. 35, 1018-1023.

**Poli G., Pont., A. Balsari, S. Cantoni. (1977):** *I. Aminet* 16, 87.

**Rašeta J.:** Higijena mesa. Naučna knjiga, Beograd, 1981.

**Sinclair A.J., W.J. Slaterry (1982):** Identification of meat according to species by isoelectric focussing. *Australian Veterinary Journal*, Vol. 58.

**Skarpeid H.J., K. Kvaal, K.I. Hildrum (1998):** Identification of animal species in ground meat mixtures by multivariate analysis of isoelectric focusing profiles. *Electroforesis*, Vol. 19, No. 18, 3103-3109.

**Slaterry W.J., A.J. Sinclair (1983):** Differentiation of meat

according to species by electrophoretic separation of muscle lactate dehydrogenase and esterase isoenzymes and isoelectric focusing of soluble muscle proteins. *Australian Veterinary Journal*, Vol. 60, No. 2.

**Straus B (1988):** *Medicinska biokemija*. Jugoslavenska medicinska naklada, Zagreb, 1988.

**Sun Y.L., C.S. Lin (2003):** Establishment and application of a fluorescent polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for identifying porcine, caprine and bovine meats. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 51, No. 7., 1771-1776.

**Prispjelo / Received:** 1.5.2007.

**Prihvaćeno / Accepted:** 29.6.2007. ■

# PROTEOLIZA MIŠIĆNOG TKIVA TIJEKOM ZRENJA PRŠUTA

M. Krvavica<sup>1</sup>, A. Lukić<sup>1</sup>, M. Vrdoljak<sup>1</sup>, J. Đugum<sup>2</sup>, D. Ćurić<sup>3</sup>

## SAŽETAK

Proteoliza je složeni biokemijski proces u kojem se proteini pod utjecajem endogenih enzima hidroliziraju u manje jedinice - peptide i slobodne aminokiseline. Postmortalna razgradnja mišićnih proteina odvija se pod utjecajem mišićnih proteaza odnosno endopeptidaza (kalpaini i katepsini) koje sudjeluju u početnom omekšavanju mišićnog tkiva i egzopeptidaza (peptidaze, aminopeptidaze i karboksipeptidaze) koje učestvuju u kasnijim fazama proteolize. Proteoliza u mišićima započinje oslobađanjem Ca<sup>2+</sup> iona iz sarkoplazmatskog retikuluma i aktivacijom kalpaina koji razlažu Z-membranu i regulatorne proteine, a nastavlja se aktivacijom katepsina i hidrolizom glavnih miofibrilarnih proteina koje kalpaini nisu u stanju hidrolizirati. Postmortalna razgradnja proteina i porast pH mesa uz porast koncentracije soli uzrokuje inaktivaciju kalpaina već 10 do 14 dana nakon klanja. U ovim procesima nastaju proteinski ostaci i polipeptidi srednje veličine. Daljnja razgradnja polipeptida i oligopeptida do malih peptida i slobodnih aminokiselina rezultat je djelovanja različitih egzopeptidaza (tripeptidilpeptidaza, dipeptidilpeptidaza,

dipeptidaza, aminopeptidaza i karboksipeptidaza). Nastali produkti proteolize izravno utječu na konzistenciju pršuta te sudjeluju u stvaranju karakteristične arome i okusa, odnosno formiranju konačnih organoleptičkih svojstava pršuta.

**Ključne riječi:** proteoliza, pršut

## UVOD

Proteoliza je značajan niz biokemijskih reakcija u tkivima pršuta, koje sudjeluju u stvaranju karakteristične ukupne arome, okusa i mirisa tijekom procesa prerade. Proteolitička aktivnost glavna je značajka endogenih enzimskih sustava u tkivima pršuta. Oni uz limitirajuće čimbenike (pH, koncentracija soli i vlage itd.), stvaraju nepovoljne uvjete za rast mikroorganizama, te je i aktivnost mikrobnih enzima unutar pršuta beznačajna (Molina i Toldrá, 1992).

Važnost proteolize kao čimbenika kakvoće pršuta, očituje se na nekoliko načina. Proteoliza izravno

<sup>1</sup> Mr.sc. Marina Krvavica, predavač; Andrijana Lukić, dipl.inž., asistent; Marija Vrdoljak, dipl.inž., asistent; Veleučilište „Marko Marulić“ Knin, Petra Krešimira IV 30, 22300 Knin, Hrvatska; E-mail: mkrvavica@net.hr ili mkrvavica@veleknin.hr

<sup>2</sup> Dr.sc. Jelena Đugum, načelnica odjela; Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva, Grada Vukovara 78, Zagreb.

<sup>3</sup> Dr.sc. Duška Ćurić, izvanredni profesor; Prehrambeno biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Pirotićeva 6, Zagreb