

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. Krvavica¹, A. Lukić¹, M. Vrdoljak¹, J. Đugum², D. Ćurić³

SAŽETAK

Proteoliza je složen 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 Ca²⁺ 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

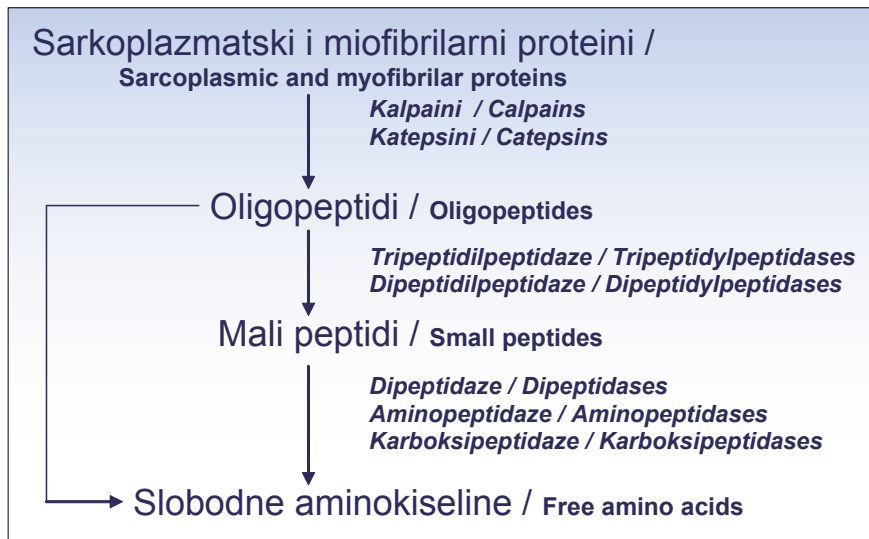
¹ Mr.sc. Marina Krvavica, predavač; Andrijana Lukić, dipl.inž., asistent; Marija Vrdoljak, dipl.inž., asistent; Veleučilište „Marko Marulić“ Knin, Petra Krešimira IV 30, 22300 Knin, Hrvatska; E-mail: mkrvavica@net.hr ili mkrvavica@veleknin.hr

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

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

▼ **Slika 1.** Proteoliza u pršutu tijekom procesa prerade (Sarraga i sur. 1993; Toldra i sur. 1995; Toldrà, 2002)

▼ **Figure 1.** The proteolysis during the processing of dry-cured ham (Sarraga et al. 1993; Toldra et al. 1995; Toldrà, 2002)



sudjeluje u formiranju konzistencije pršuta temeljem razgradnje miofibrilarnih proteina koji grade mišićnu strukturu. Stvaranjem peptida i slobodnih aminokiselina utječe na okus pršuta, a slobodne aminokiseline sudjeluju kao supstrat u budućim reakcijama, koje doprinose formiranju konačne arome i okusa pršuta, odnosno djeluju kao prekursori arome i okusa. Najvažnije proteolitičke promjene, koje sudjeluju u stvaranju posebnog okusa i arome pršuta visoke kakvoće, događaju se jedino u produženom procesu zrenja i kod pršuta niske koncentracije soli (Toldrà i Flores, 1998). Većina dosadašnjih istraživanja usmjerena su na mišićne enzimske sustave, kako bi se objasnile promjene u pršuta nastale tijekom prerade, te uspostavila što bolja kontrola preradbenog procesa i optimizirala finalna kakvoća pršuta.

Tijek proteolize u pršutu može jako varirati u ovisnosti od tipa pršuta, količine endogenih proteolitičkih enzima i specifičnih preradbenih uvjeta. U osnovi, proteoliza teče prema slici 1. (Sarraga i sur. 1993; Toldrà i sur. 1995; Toldrà, 2002).

AKTIVNOST MIŠIĆNIH PROTEAZA

Početna razgradnja glavnih miofibrilarnih proteina od strane kalpaina i katepsina, te stvaranje proteinskih ostataka i polipeptida srednje veličine, rezultat

je hidrolize, odnosno, razgradnje strukture Z-membrane i proteina (troponin T, dezmin, nebulin i titin), te sarkoplazmatskih proteina (Toldrà, 2002). Razgradnja polipeptida se nastavlja do malih peptida, a rezultat je djelovanja di- i tripeptidilpeptidaza. Konačno, slobodne aminokiseline nastaju aktivnošću dipeptidaza, aminopeptidaza i karboksiptidaza. Aktivnost enzima mikrobnog podrijetla također je prisutna, mada ispitivanje miofibrilarnih i sarkoplazmatskih proteina u sterilnim uvjetima pokazuje vrlo slabu aminopeptidaznu aktivnost malog broja uobičajenih mikroorganizama pršuta (Toldrà, 2002).

jenih mikroorganizama pršuta (Toldrà, 2002).

Proteolitički enzimi koji razgrađuju mišićno tkivo *post mortem*, su mišićne proteaze (Toldrà, 2002), a podijeljene su na endopeptidaze (proteinaze) i egzopeptidaze. **Endopeptidaze** hidroliziranjem miofibrilarnih proteina i stvaranjem proteinskih ostataka i polipeptida, sudjeluju u postmortalnom omekšavanju mišićnog tkiva (Dransfield, 1994). Na osnovu funkcionalne grupe dijele se na cisteinske, serinske, aspartatne i metalo proteinaze. Mišićne proteinaze spadaju u cisteinske i aspartatne proteinaze. **Cisteinske proteinaze**, kao grupa, djeluju u širokom rasponu pH vrijednosti (4,5 – 10). Pored različitih biljnih enzima, u ovu grupu spadaju katepsini (proteinaze animalnog porijekla), a zajednička im je osobina da su aktivni u uvjetima niske pH vrijednosti. Cisteinske proteinaze imaju jednu ili više cisteinskih grupa na aktivnom kraju. Njihovu aktivnost inhibiraju oksidativna sredstva, bazni pH i teški metali koji se vežu na aktivne krajeve. Osim toga, specifični inhibitori, cistatini najvjerojatnije reguliraju njihovu aktivnost u stanicama, osobito u slučaju slučajne ruptur stanice ili tumorom deformirane stanice, kada cisteinske proteinaze napadaju oštećeno tkivo (Vestergaard, 1996). Aktivnost cistatin inhibitora utvrđena je u mišićima nakon 8 mjeseci *postmortem* (Parreño i sur. 1994). Od cisteinskih proteinaza, jedino su katepsin B, L i H

aktivni u tkivu buta za vrijeme preradbenog procesa. **Aspartatne proteinaze** su animalnog podrijetla i aktivne su u uvjetima izrazito niskog pH. Katepsin D pripada ovoj skupini, a optimalno mu je djelovanje kod pH 3, ali djeluje i pri višim vrijednostima pH. Katepsin D zadržava aktivnost tijekom prvih mjeseci prerade (Toldrá i sur. 1993). **Egzopeptidaze** stvaranjem slobodnih aminokiselina, sudjeluju u formiranju okusa i arome pršuta (Nishimura i sur. 1990).

Najvažnije mišićne **proteinaze (endopeptidaze)** su katepsini i kalpaini. Kalpaini I i II su cisteinske endopeptidaze smještene u citosolu i u području Z – membrane, a optimalnu aktivnost postižu pri neutralnom pH (oko 7,5). Aktivni su jedino u prisutnosti određene koncentracije Ca^{2+} iona, a aktivnost gube već nakon 10 – 14 dana *postmortem*, odnosno nakon prve faze soljenja (Rosell i Toldrá, 1996). Kalpainski enzimski sustav sastoji se od tri proteina, kalpaina I i II i kalpain inhibitora – kalpastatina. Još se raspravlja i nije razjašnjeno, koje proteaze igraju važniju ulogu u početnom razlaganju, odnosno omekšavanju mišićnog tkiva. Neki autori vjeruju da su to Ca^{2+} -aktivne proteaze, odnosno kalpaini (Koochmaraie i sur. 1988), drugi da su to katepsini (Ouali i sur. 1987; Ouali, 1990), dok treći vjeruju u zajedničko djelovanje ovih dvaju proteaznih sustava (Asghar i Bhatti, 1987). Međutim, odgovor na ovo pitanje vjerojatno ima veze s optimalnim pH, te sposobnošću svakog od njih da razlažu miofibrilarne proteine. Pretpostavlja se da proces aktivacije kalpaina teče na slijedeći način (Koochmaraie, 1992, 1994):

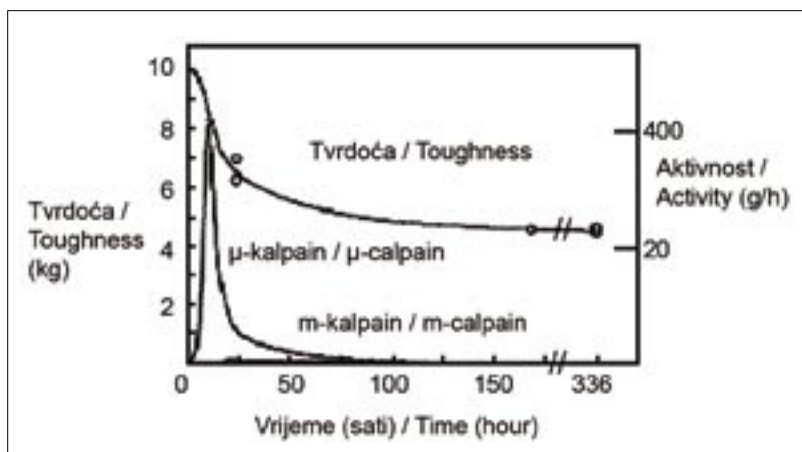
U prvim satima nakon klanja postupno se oslobađaju kalcijevi ioni iz sarkoplazmatskog retikula. Najprije se aktivira kalpain I (μ CANP) koji zahtjeva mikromolarnu koncentraciju (50 – 70 μ M) Ca^{2+} -iona, a naknadna aktivacija kalpaina II (mCANP) događa se u prisutnosti milimolarne koncentracije (1-5 mM) Ca^{2+} -iona. Prema Dransfieldu, (1994) u citosol se uvijek oslobodi dovoljna količina slobodnih kalcijevih iona za aktivaciju ukupne količine kalpaina I, dok se kalpain II aktivira svega 30% od njegove ukupne količine. Prema

tome, postmortalno omekšavanje mišića počinje aktiviranjem kalpaina I (pH 6,3), i naglo raste s porastom kalpainske aktivnosti. Višak Ca^{2+} -iona aktivira kalpain II, što pojačava daljnje omekšavanje. Nakon postizanja maksimalne aktivacije, aktivnost kalpaina progresivno opada (Slika 2.).

Budući da kalpaini, za razliku od katepsina, nisu u stanju razgraditi miozin, aktin, α -aktinin i troponin C, može se pretpostaviti da početne postmortalne promjene u mišićima nastaju zahvaljujući djelovanju kalpaina. Optimalne pH vrijednosti kalpaina i katepsina nameću hipotezu, da kalpaini započinju proteolizu, a katepsini je nastavljaju. Lizozomski katepsini zatvoreni su unutar lizozomske membrane i njihovo oslobađanje je preduvjet za proteolitičko djelovanje. Nizak pH i visoka temperatura mogući su uzrok rupture membrane lizozoma, nakon čega oslobođene katepsinske proteinaze difundiraju u intermiofilamentni prostor, gdje započinju proteolizu. Međutim, proces započinje jedino ako je pH iznad 6,0 (Toldrá, 2002), unatoč njihovu oslobađanju iz lizozoma. Prema tome, može se pretpostaviti da proteoliza započinje djelovanjem kalpaina, osobito kalpaina I u uvjetima niske koncentracije Ca^{2+} -iona, koji razlažu Z-membranu i regulatorne proteine, a zatim s padom pH mesa dolazi do inaktivacije kalpaina i oslobađanja katepsina koji su sposobni za razgradnju miofibrilarnih proteina (Toldrá, 2002). Ionska sila, zahvaljujući soljenju, također doprinosi proteinskoj razgradnji. Budući da su kalpaini aktivni jedino u neutralnoj pH

▼ **Slika 2.** Postmortalna aktivacija kalpaina i omekšavanje *m. longissimus dorsi* goveda (Dransfield, 1994)

▼ **Figure 2.** Activation of calpains post-mortem and tenderization of beef *m. longissimus dorsi* (Dransfield, 1994).



sredini, porast pH *post mortem* (Koochmarai, 1994) i porast koncentracije soli u mesu uzrokuju njihovu inaktivaciju vrlo brzo nakon klanja (10-14 dana) (Toldrá, 2002). Ova činjenica dovodi u pitanje važnost kalpaina u ukupnoj proteolizi mišićnog tkiva pršuta tijekom prerade.

Katepsini B, D, H i L su aktivni u kiseloj sredini, maleni su (20-40 tisuća Mr) i locirani na lizozomina. Katepsini B, H i L spadaju u cisteinske proteinaze i aktivni su tijekom cijelog procesa prerade (Toldrá, 2002). Utvrđena je uobičajena rezidualna aktivnost u iznosu od 5 – 10% u pršutima nakon 15 mjeseci, što ih svrstava u red stabilnih enzima (Toldrá i sur., 1993). Katepsin D (aspartatna proteinaza) je aktivan tijekom šest mjeseci preradbenog procesa. Ispitivanja *in vitro*, pokazuju katepsinsku aktivnost u razgradnji različitih miofibrilarnih proteina i to razgradnji titina, miozinskih teških lanaca, aktina, tropomiozina i troponina T i I, od strane katepsina D i L, te miozina i aktina od strane katepsina B (Toldrá, 2002). S druge strane, katepsin H specifičnih je osobina, jer pokazuje i endo i aminopeptidaznu aktivnost. Još nije sa sigurnošću utvrđeno koji od katepsina imaju važniju ulogu u proteolizi mišićnog tkiva tijekom prerade. Dosadašnja istraživanja bazirana su uglavnom na individualnoj enzimskoj aktivnosti u samom mjestu djelovanja enzima (*in situ*, promatranja na temelju iskustva) i hipotezama temeljenim na eksperimentalnim modelima *in vitro*. Utvrđene varijabilnosti uglavnom su rezultat različitih analitičkih metoda i razlika u tehnološkom procesu (Toldrá, 2002). Nadalje, vrlo važna činjenica kod ispitivanja aktivnosti svih enzima u pršutu je anatomske položaj i funkcija mišića u kojem se vrše ispitivanja. Primjerice, *m. semimembranosus* (SM) i *m. biceps femoris* (BF) su smješteni blizu površine buta, ali je kod većine tipova pršuta (ovisno o načinu obrade buta) BF pokriven kožom i potkožnim masnim tkivom, nasuprot SM, koji se nalazi na medijalnoj strani buta (otvorena površina). Zbog toga je mišić SM više izložen visokoj koncentraciji soli tijekom prve faze soljenja i većoj dehidraciji tijekom sušenja i zrenja. S tim u svezi veći broj autora nalazi nižu enzimsku aktivnost u SM (Sárraga i sur. 1993; Parreño i sur. 1994; Rico i sur. 1990). Zbog visokog koeficijenta korelacije između aktivnosti katepsina B i L (Vestergaard, 1996), aktivnost katepsina B često može biti pokazatelj zajedničke aktivnosti. Katepsin

B je maksimalno aktivan kod pH 5,7, 80% aktivnosti ima kod pH 6,0 (Rico i sur. 1991; Toldrá i sur. 1992b), a oko 60% na pH 5,5 (Toldrá i sur. 1993), dok je optimalna temperatura 37°C (Bond, 1989). U stanju je hidrolizirati miozin, aktin, tropomiozin, troponin T i kolagen, te razgraditi miozin na manje fragmente molekulske mase oko 50.000 do 220.000 (Toldrá, 2002). Optimalan pH za katepsin L je također 5,7 i optimalna temperatura 37°C (Rico i sur. 1991), a 80% aktivnosti zadržava kod pH 6. Oba ova enzima su još aktivna na 20°C, a budući da temperatura tijekom faze sušenja i zrenja raste, raste i njihova aktivnost (Rico i sur. 1991). Oko 50-65% katepsina B i 80% katepsina B+L ostaje aktivno na a_w 0,85 – 0,90, što je tipična vrijednost za vodeni aktivitet mesa buta tijekom prerade (Rico i sur. 1991; Toldrá i sur. 1992b). Nadalje, 60 – 70% aktivnosti ovi enzimi zadržavaju u uvjetima 6% soli (Rico i sur. 1991; Toldrá i sur. 1992b). Nitrati i askorbinska kiselina nemaju utjecaja na aktivnost katepsina B i B+L u koncentraciji koja se primjenjuje kod prerade pršuta (Rico i sur. 1991; Toldrá i sur. 1992b). Još nije u potpunosti razjašnjeno zbog čega glukoza, čak i u niskoj koncentraciji (0,1 – 0,5 g/l), izrazito stimulira aktivnost katepsina B (Rico i sur. 1991; Toldrá i sur. 1992b). Nakon 8 mjeseci od početka procesa prerade (kod završne temperature 26°C) u španjolskih pršuta je utvrđeno sljedeće: 27% početne aktivnosti katepsina B zaostaje u mišiću SM, a 45% u mišiću BF, (Parreño i sur. 1994). Toldrá i Etherington, (1988) nalaze 18% rezidualne aktivnosti katepsina B+L i 14% katepsina B u mišiću SM, a Toldrá i sur. (1991) utvrđuju prosječno 40% rezidualne enzimске aktivnosti u mišiću BF, a slične rezultate imaju i Sárraga i sur. (1993). Prema nekim autorima katepsin L brzo gubi aktivnost, a maksimalnu aktivnost postiže na početku preradbenog procesa (Parreño i sur. 1994). Rico i sur. (1990) i Toldrá i sur. (1993) zaključuju da su katepsin L, a osobito katepsin B, najvažniji enzimi koji uzrokuju proteolizu tijekom procesa prerade pršuta. Katepsin H je lizozomski cisteinski enzim s endo- i egzo-peptidaznom aktivnošću (Toldrá i sur. 1996). Maksimalnu aktivnost postiže kod pH 6,5 - 6,8, dok pad pH ispod 5,7 uzrokuje nagli pad aktivnosti (Rico i sur. 1991), a kod pH 6,0 pokazuje 82% aktivnosti (Rico i sur. 1991; Toldrá i sur. 1992b). Endopeptidazna aktivnost katepsina H je slaba, a egzo-peptidazna aktivnost je ograničena

na slobodne aminokiselinske ostatke, odnosno na hidrolizu njihovih baznih ostataka. Optimalna temperatura djelovanja je 37°C, ali je aktivan (30%) i na 20°C, a zadržava i 20 – 40% aktivnosti kod tipične vrijednosti a_w mesa tijekom procesa prerade (0,85-0,90) (Rico i sur. 1991; Toldrá i sur. 1992b). Sol je jak inhibitor katepsina H, te u uvjetima 6% soli katepsin H zadržava samo 35-38% aktivnosti. Nitrati, glukoza i askorbinska kiselina nemaju utjecaja na aktivnost katepsina H (Rico i sur. 1991; Toldrá i sur. 1992b). Toldrá i sur. (1991) nalaze da aktivnost katepsina H brzo opada tijekom procesa prerade, a Parreño i sur., (1994) nalaze da aktivnost katepsina H naglo pada na nizak nivo odmah nakon faze salamurenja, te zaključuju da je utjecaj ovog enzima na proteolizu zanemariv. Optimalan pH za aktivnost katepsina D je 3,0 – 4,5. Sposoban je hidrolizirati titin, miozin, nebulin, aktin i tropomiozin, te slično katepsinu B, razgrađuje miofibrilarne proteine (miozin) na fragmente molekulske mase oko 100.000 (Toldrá, 2002). Unatoč optimalnom kiselom pH, aktivan je 30% kod pH 5,5 i 13% kod pH 6 (Toldrá i sur. 1992b). Sol je također, snažan inhibitor aktivnosti katepsina D, pa samo 10% od ukupne aktivnosti zaostaje u sredini sa 6% soli (Rico i sur. 1990; Toldrá i Etherington, 1988; Toldrá i sur. 1992b). Katepsin D je uglavnom aktivan na temperaturi faza sušenja i zrenja, a maksimalno je aktivan na 40°C (Rico i sur. 1990). Na 30°C, zadržava 83% aktivnosti (Toldrá i sur. 1992b). Snižavanje a_w vrijednosti, smanjuje enzimsku aktivnost katepsina D, tako da kod tipične vrijednosti aktivnosti vode u procesu sušenja mesa (0,85-0,90) prisutno 65-75% aktivnosti ovog enzima (Toldrá i sur. 1992b; Rico i sur. 1990). Nitrati ne djeluju značajnije na aktivnost katepsina D (Toldrá i sur. 1992b; Rico i sur. 1990). Niske koncentracije glukoze (0,5 g/l) neznatno inhibiraju aktivnost katepsina D (Toldrá i sur. 1992b), dok visoke koncentracije glukoze (iznad 4 g/l) osjetno pojačavaju aktivnost ovog enzima (Rico i sur. 1990). Askorbinska kiselina nema utjecaja ili neznatno stimulira aktivnost katepsina D (Rico i sur. 1990; Toldrá i sur. 1992b). Rico i sur. (1990), Toldrá i sur. (1991, 1993), Sarrága i sur. (1993) i Toldrá i Etherington, (1988) zaključuju da katepsin D može biti važan za proteolizu jedino u prvim fazama procesa prerade pršuta, gdje je aktivan zahvaljujući niskoj koncentraciji soli i visokoj aktivnosti vode. Nasuprot tomu, Gil i

sur. (1989) ne uočavaju nikakvo smanjenje aktivnosti katepsina D za vrijeme procesa prerade španjolskih pršuta. Toldrá i sur. (1993) u različitim fazama preradbenog procesa pršuta, elektroforezom utvrđuju brojne promjene, kao što su progresivna razgradnja miozina i troponina C i I i formiranje fragmenata različite molekulske mase te pretpostavlja da aktin, aktinin, troponin T i tropomiozin najvjerojatnije nisu promijenjeni. Neki proizvodi razgradnje identificirani elektroforezom, najvjerojatnije potječu od proteolize miozina od strane katepsina B i L, a možda i katepsina D (Toldrá i sur. 1993).

Najvažnije mišićne **egzopeptidaze** podijeljene su na amino-, karboksi-, di-, tri-, dipeptidil- i tripeptidilpeptidaze. Ovi enzimi uglavnom sudjeluju u kasnijim fazama proteolitičke razgradnje. Di- i tripeptidilpeptidaze (DPP i TPP) sudjeluju u stvaranju di- i tripeptida od proteinskih i polipeptidnih amino ostataka. DPP I, DPP II i TPP I su smještene na lizozomima, a optimalnu aktivnost postižu u kiseloj sredini. DPP I je lizozomska cisteinska proteaza (korišten je i naziv katepsin C) s optimalnim pH 5,0 – 6,0, a aktivna je jedino u prisustvu halidnih iona ili spojeva tiola. DPP II je lizozomska serinska proteaza s optimalnim pH 4,5 – 5,5, a razlikuje se od DPP I po tome što njezin specifični supstrat ne zahtijeva prisustvo tiola i halida (Vestergaard, 1996). DPP III, DPP IV i TPP II su locirane u citosolu, a DPP IV je vezana za membranu. Optimalan pH za ove enzime je 7,0 – 8,0. DPP III je slabo aktivna u mišićima (Vestergaard, 1996), a DPP IV uklanja amino ostatke dipeptida, ako je pretposljednji ostatak prolin ili alanin. TPP su serinske proteaze. Ova grupa enzima je aktivna čak i nakon 15 mjeseci procesa prerade pršuta, osim DPP II koja je aktivna do 8. mjeseca preradbenog procesa (Sentandreu i Toldrá, 2001). Karboksipeptidaza A (katepsin A) je serinska proteaza, a karboksipeptidaza B (katepsin B2) cisteinska proteaza. Obje su smještene na lizozomima i imaju optimalan pH oko 5,0 – 5,5 (Kirschke i Barrett, 1987). Dipeptidaze (prolin-, prolin-, glicil-, leucin- i glicil-glicin) i tripeptidaze su smještene na lizozomima, a kataliziraju hidrolizu peptidnih veza dipeptidnih i tripeptidnih amino ostataka (Toldrá, 2002). Zadnji korak proteinske razgradnje u mišićima je stvaranje slobodnih aminokiselina. Veliki porast koncentracije slobodnih aminokiselina u pršutu (Aristoy i Toldrá, 1991; Toldrá i Aristoy, 1993)

vezan je s aktivnošću mišićnih aminopeptidaza u neutralnom pH (Toldrá i sur. 1992a; Nishimura i sur. 1990). Aminopeptidaze su enzimi koji hidroliziraju peptidne veze u blizini amino krajeva mnogih proteina i polipeptida, odnosno razlaganje peptida rezultat je uklanjanja jedne aminokiseline smještene u nizu, odmah iza N-kraja. Tako, alanil-aminopeptidaza hidrolizira peptide s alaninom vezanim za amino kraj, leucil-aminopeptidaza hidrolizira amino kraj s leucilom itd. Međutim, to su samo posebne sklonosti ovih enzima, jer su oni sposobni hidrolizirati i veze s drugim aminokiselinama (Flores i sur. 1996; 2000). Arginil- (RAP), leucil- (LAP), alanil- (AAP), metionil- (MAP) i piroglutamil- (PGAP) aminopeptidaze su smještene u citosolu i aktivne u neutralnom (RAP i AAP) ili baznom pH (LAP i PGAP). Alanil- i metionil-aminopeptidaze su aktivne u različitim uvjetima supstrata, dok je arginil-aminopeptidaza (aminopeptidaza B) aktivna jedino u prisutnosti klorida, a hidrolizira bazne aminokiseline. Leucil- i piroglutamil-aminopeptidaze su manje zastupljene u mišićima svinja, a optimalni pH za njihovu aktivnost je daleko od nivoa pH u pršutu tijekom prerade, pa je njihov značaj vjerojatno zanemariv (Toldrá, 2002).

RAZGRADNJA BJELANČEVINA I PEPTIDA

Djelovanje kalpaina i katepsina u početnim fazama prerade vezano je s fragmentacijom miofibrila kroz Z-membranu, hidrolizom dezmina, titina i nebulina i pojavom dva polipeptida molekulske mase 95.000 i 30.000 (Koochmarai, 1994). Rezultat toga je intenzivna proteinska razgradnja i porast mekoće mesa. Elektroforeza mišićnih sarkoplazmatskih i miofibrilarnih proteina pokazuje da tijekom preradbenog procesa pršuta nastaju značajne promjene ovih proteina (Toldrá i sur. 1993). Miozinski teški lanac (HMM) i laki lanci (LMM) 1 i 2, te troponin C i I nestaju, a formira se nekoliko fragmenata molekulske mase 150.000, 95.000 i 16.000, te nekoliko od 50.000-100.000 i 20.000-45.000 (Toldrá, 2002). U osnovi, hidroliza miofibrilarnih proteina je intenzivnija od hidrolize sarkoplazmatskih proteina. Slične promjene utvrđene su kod španjolskog Serrano pršuta i francuskog Bayone pršuta (Toldrá i sur. 1992a; Monin i sur. 1997). Pregled elektronskim mikroskopom, također pokazuje značajne

ultrastrukturalne promjene, kao što su razgradnja i smanjenje Z-membrane i oštećenja mišićnih vlakana. Rupture mišićnih vlakana su jače izražene pred kraj faze soljenja (Monin i sur. 1997). Vezano za proteinaznu aktivnost i stabilnost, aktivnost kalpaina je smanjena prvih dana *post mortem*. Katepsin D je aktivan prvih 6 mjeseci, a katepsini B, L i H su aktivni tijekom cijelog preradbenog procesa. U svakom slučaju, katepsini B i L su vrlo značajni, jer zahvaljujući optimalnom pH (5,7), imaju dobru aktivnost i stabilnost. Neki problemi vezani za konzistenciju i organoleptičke osobine pršuta povezani su s intenzitetom proteolize, odnosno s prekomjernom proteolizom. Prekomjerna proteoliza u pršutu vezana je s genetskom osnovom, hranidbom i dobi svinja, što može značajno utjecati na aktivnost nekih enzima, osobito viši nivo katepsinske aktivnosti. Posljedica je mekša konzistencija pršuta i lošija ocjena organoleptičkih osobina pršuta. Mekša konzistencija pršuta u pozitivnoj je korelaciji s povišenom rezidualnom aktivnošću katepsina B i nižim nivoom soli (Parolari i sur. 1994) i povišenom rezidualnom aktivnošću katepsina B+L (García-Garrido i sur. 2000). Povišena koncentracija peptida i slobodnih aminokiselina, kao rezultata prekomjerne proteolize, može uzrokovati neprijatan okus pršuta. Rodríguez- Nuñez i sur. (1995) analiziraju rezultate proteinske razgradnje i gomilanje peptida, te nalaze brojne peptide velike molekulske mase (2.700-4.500). Ovi peptidi nastaju nakon faze soljenja i tijekom rane faze sušenja i zrenja pršuta, koji se u slijedećim fazama procesa hidroliziraju na peptide manjih molekulskih masa (ispod 2.700). Povećanje koncentracije peptida u uvjetima niske koncentracije dodane soli, potvrđuje inhibitorni utjecaj soli na katepsine (Rico i sur. 1991). Prema Martín i sur. (1998), povećanjem koncentracije soli smanjuje se stvaranje peptida. Najvažnija peptidaza u procesu prerade pršuta najvjerojatnije je DPP I, s obzirom na optimalan pH (5,5) te aktivnost i stabilnost tijekom prerade. Nešto manju važnost vjerojatno ima DPP IV, a druge peptidaze imaju manji značaj. U novijim istraživanjima izolirani su i identificirani u pršutu na kraju tehnološkog procesa, tripeptidi koji sadrže Glu, Val i Asp i neki dipeptidi kao Ile, Val, Leu-Glu, Ile-Asp, Ala-Met, Gly-Glu, Glu-Arg, Pro-Leu, Gly-Ser, Asp-Val, i Ser-Lys (Sentandreu i sur. 2002).

STVARANJE SLOBODNIH AMINOKISELINA

Prekomjerno stvaranje slobodnih aminokiselina tijekom procesa prerade pršuta, rezultat je intenzivne proteolize u mišićnom tkivu. Najčešće se u većoj količini nalaze alanin, leucin, valin, arginin, lizin, glutaminska i asparaginska kiselina. Konačna koncentracija ovisi o duljini procesa prerade i tipu pršuta. Sadržaj slobodnih aminokiselina u Parma pršutu, raste osobito u periodu od 9. do 12. mjeseca prerade (Schivazappa i sur. 1995). S druge strane, kod španjolskih pršuta najveća količina slobodnih aminokiselina se stvara nakon 240 dana prerade, što se ujedno poklapa s najintenzivnijom proteolizom razgradnjom i maksimalnom enzimskom aktivnošću. Nakon toga, stvaranje slobodnih aminokiselina se usporava, zahvaljujući redukciji enzimске aktivnosti i reakcijama koje rezultiraju stvaranjem drugih spojeva (Toldrá i sur. 2000). Trend smanjenja nastanka slobodnih aminokiselina pojavljuje se kod francuskih pršuta nakon 179 dana (Buscaillon i sur. 1994), a kod iberijskog pršuta nakon 420 dana (Ruiz i sur. 1999). Mali peptidi, koji nastaju kao rezultat djelovanja tri- i dipeptidilpeptidaza, stvaraju se sve do kraja procesa prerade pršuta. Najviša koncentracija slobodnih aminokiselina nađena je kod iberijskih pršuta, koji imaju dug period zrenja (više od 24 mjeseca), a najniža koncentracija je zabilježena kod pršuta s kratkim preradbenim procesom (Toldrá i Flores, 1998). Zahvaljujući porastu koncentracije slobodnih aminokiselina, specifičnostima supstrata i specifičnim aktivnostima svakog enzima, moguće je odrediti u kojoj mjeri pojedina aminopeptidaza svojom aktivnošću doprinosi procesu proteolize. Na osnovu toga, najvjerojatnije je da su najvažniji enzimi koji sudjeluju u oslobađanju gotovo svih aminokiselina, alanil- i metionil-aminopeptidaze, a zatim arginil- aminopeptidaze, koje stvaraju arginin i lizin. Učešće leucil- i piroglutamil-aminopeptidaza, bez obzira na dobru stabilnost, izgleda da je smanjeno, zahvaljujući optimalnom baznom pH i niskoj koncentraciji ovih enzima u mišićima pršuta (Toldrá, 1998). Ponekad se kao rezultat pojačane proteolize može javiti pojačana produkcija peptida, osobito molekulske mase od 26.000 do 87.000, koji uzrokuju stvaranje površinskog bijelog filma na reznoj površini pršuta (Toldrá i sur. 1990) ili formiranje vidljivih bijelih kristala tirozina unutar mišićnog tkiva pršuta.

UMJESTO ZAKLJUČKA

Razgradnja mišićnih bjelančevina, odnosno tijek i stupanj proteolize, te profil i količina nastalih produkata uz druge biokemijske procese imaju presudan učinak na konačnu kakvoću pršuta. Poznavanjem ovih procesa i uvjeta u kojima su pojedini enzimi aktivni može se u procesu prede utjecati na tijek i stupanj proteolitičkih promjena, a time i na kakvoću pršuta kao finalnog proizvoda.

SUMMARY

PROTEOLYSIS IN MUSCLE TISSUES DURING THE PROCESSING OF DRY-CURED HAM

Proteolysis is a complex biochemical process of hydrolysis of proteins to the peptides and free amino acids by endogenous enzymes action. By action of muscle proteases, which are endopeptidases (calpains and cathepsins) responsible for muscle tissue initially tenderization as well as egzopeptidases (peptidases, aminopeptidases and carboxipeptidases) responsible for later stages of proteolytical degradation, the post mortem muscle proteins breakdown take place. Proteolysis in muscle starts with releasing of Ca²⁺ ions from the sarcoplasmic reticulum and activation of calpains which are probably responsible for Z-disc and regulatory proteins degradation, and it proceeds by activation of cathepsins and main myofibrillar proteins degradation which calpains are unable to hydrolyse. Proteins degradation post mortem and increment of meat pH as well as increment of salt concentration inactivate the calpains just after 10 to 14 days after the slaughtering. These processes produce the protein fragments and middle polypeptides. Further polypeptides and oligopeptides degradation until the small peptides and free amino acids takes place by action of different egzopeptidases (tripeptidylpeptidases, dipeptidylpeptidases, dipeptidases, aminopeptidases and carboxipeptidases). The products of proteolysis have a direct influence on dry-cured ham texture and taste as well, and they are involved in creating of characteristic flavour and dry-cured ham final sensorial characteristics.

Key words: proteolysis, dry-cured ham

LITERATURA

- Aristoy, M.-C., F. Toldrá (1991):** Deproteinization techniques for HPLC amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 1792.
- Asgar, A., R.A. Bhatti (1987):** Endogenous proteolytic enzyme in skeletal muscle: their significance in muscle physiology and during post-mortem aging events in carcasses. *Advances in Food Research* 31, 343.

- Bond, J.S. (1989):** Commercially available proteases. In *Proteolytic enzymes, a practical approach* (eds. Beynon, r.j. and Bond, J.s.), Oxford University Press, Oxford
- Buscailhon, S., J.L. Berdagué, G. Gandemer, C. Touraille, G. Monin, (1994):** Effects of initial pH on compositional changes and sensory traits of French dry-cured hams. *Journal of Muscle Foods* 5, 257-270.
- Dransfield, (1994):** Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. *Meat Science* 36, 105.
- Flores, M., M-C. Aristoy, F. Toldrá (1996):** HPLC purification and characterisation of soluble alanyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2578-2583.
- Flores, M., V-J. Moya, M-C. Aristoy, F. Toldrá (2000):** Nitrogen compounds as potential biochemical markers of pork meat quality. *Food Chemistry* 69, 371-377.
- García-Garrido, J.A., R. Quiles, J. Tapiador, M.D. Laque (2000):** Activity of cathepsin B, D, H and L in Spanish dry-cured ham of normal and defective texture. *Meat Science* 56, 1-6.
- Gil, M., J. Arnau, C. Sárraga (1989):** Proteinase activities in Spanish dry-cured ham manufactured with meat of different quality. 35th ICMST Roskilde, Denmark, 3, 734.
- Kirschke, H., A.J. Barret (1987):** In *Lysosomes: Their role in protein breakdown* (Glaumann, G., ed.), Academic Press, London.
- Koohmaraie, M., A.S. Babiker, R.A. Merlek, T.R. Dutson (1988):** Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through activation of Ca²⁺-dependent proteases. *Journal of Food Science* 53, 1638.
- Koohmaraie, M. (1992):** The role of Ca²⁺-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochemie* 74, 239.
- Koohmaraie, M. (1994):** Muscle proteinases and meat ageing. *Meat Sci.* 36, 93-104.
- Martín, L., J.J Córdoba, T. Antequera, M.L. Timón, J. Ventanas (1998):** Effects of salt and temperature on proteolysis during ripening of Iberian ham. *Meat Science* 49, 145-153.
- Molina, I., F. Toldrá (1992):** Detection of proteolytic activity in microorganisms isolated from dry-cured ham. *Journal of Food Science* 57, 1308-1310.
- Monin, G., P. Marinova, A. Talmant, F.J. Martin, M. Cornet, D. Lanore, F. Grasso (1997):** Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Science* 47, 29-47.
- Nishimura, T., A. Okitani, M.R. Rhue, H. Kato (1990):** Survey of neutral amino peptidases in bovine, porcine and chicken skeletal muscles. *Agricultural and Biological Chemistry* 54, 2769.
- Ouali, A., N. Garrel, A. Obled, C. Deval, C. Valin, I.F. Penny (1987):** Comparative action of cathepsin B, D, H, L and of a new lysosomal cysteine proteinase on rabbit myofibrils. *Meat Science* 83, 100.
- Ouali, A. (1990):** Meat tenderization: Possible causes and mechanisms. A review. *Journal of Muscle Foods* 1, 129.
- Parolari, G., R. Virgili, C. Schivazzapa (1994):** Relationship between cathepsin B activity and compositional parameters in dry-cured hams of normal and defective texture. *Meat Science* 38, 117-122.
- Parreño, M., R. Cussó, M. Gil, C. Sárraga (1994):** Development of cathepsin B, L and H activities and cystatin-like activity during two different manufacturing processes for Spanish dry-cured ham. *Food Chemistry* 49, 1.
- Rico, E., F. Toldrá, J. Flores (1990):** Activity of cathepsin D as affected by chemical and physical dry-curing parameters. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A.* 191, 20-23.
- Rico, E., F. Toldrá, J. Flores (1991):** Effect of dry-curing process parameters on pork muscle cathepsin B, H and L activity. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A.* 193, 541-544.
- Rodriguez-Nuñez, E., M-C. Aristoy, F. Toldrá (1995):** Peptide generation in the processing of dry-cured ham. *Food Chemistry* 53, 187-190.
- Rosell, C-M., F. Toldrá (1996):** Effect of curing agents on m-calpain activity throughout the curing process. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A.* 203, 320-325.
- Ruiz, J., C. García, M.C. Díaz, R. Cava, J.F. Tejada, J. Ventanas (1999):** Dry cured Iberian ham non-volatile components affected by the length of the curing process. *Food Research International* 32, 643-651.
- Sárraga, C., M. Gil, J.A. Garcia-Regueiro (1993):** Comparison of calpain and cathepsin (B,L and D) activities during dry-cured ham processing from heavy and light large whitew pigs. *Journal of Food Science and Agricultural* 62, 71-75.
- Sentandreu, M.A., F. Toldrá (2001):** Importance of dipeptidyl-peptidase II in postmortem pork muscle. *Meat Science* 57, 93-103.
- Sentandreu, M.A., S. Stoeva, M-C. Aristoy, K. Laib, W. Voelter, F. Toldrá, (2002):** Identification of taste related peptides in Spanish Serrano dry-cured hams. *Journal Food Science* 68 (1) 64 - 69.
- Schivazzapa, C., G. Sacconi, R. Virgili, S. Bordini (1995):** Changes in free amino acids during dry-curing of typical Italian raw ham. *Industrial Conserve* 70, 377-385.
- Toldrá, F., D.J. Etherington (1988):** Examination of cathepsins B, D, H i L activities in dry-cured ham. *Meat Science* 23, 1-7.
- Toldrá, F., J. Flores, Ch.A. Voyle (1990):** Study of the white film developed on cut surfaces of vacuum-packed dry-cured ham. *Journal of Food Science* 55, 1189-1191.
- Toldrá, F., M.J. Motilva, E. Rico, J. Flores (1991):** Enzymes activities in processing of dry-cured hams. *Proc. Of the 37th International Congress of Meat Science and Technology, Kulmbach, Germany, 954-957.*
- Toldrá, F., M.C. Aristoy, C. Part, C. Ceveró, E. Rico, M.J. Motilva, J. Flores (1992):** Muscle and adipose tissue aminopeptidase activities in raw and dry-cured ham. *Journal of Food Science* 57, 816-818.
- Toldrá F., E. Rico, J. Flores (1992b):** Activities of pork muscle proteases in model cured meat system. *Biochemie*, 74, 291-296.
- Toldrá, F., M.C. Aristoy (1993):** Availability of essential amino acids in dry-cured ham. *International Journal of Food Science and Nutrition* 44, 215.
- Toldrá, F., E. Rico, J. Flores (1993):** Cathepsin B, D, H and L activities in the processing of dry-cured ham. *Journal of Food Science and Agricultural.* 62, 157-161.
- Toldrá, F., M. Flores, M.C. Aristoy (1995):** Enzyme generation of free amino acids and its nutritional significance in processed pork meat. In *Food Flavors: Generation, Analysis and Press Influence*

ence., (ed.), pp. 1323-1344. Charalambous G., Elsevier Sci. Pub. B.V. Amsterdam.

Toldrá, F., M. Flores, M.C. Aristoy, R. Virgili, G. Parolari (1996): Pattern of muscle proteolytic and lipolytic enzymes from light and heavy pigs. *Journal of Food science and agricultural*. 71, 124-128.

Toldrá, F. (1998): Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Science* 49, 101-110.

Toldrá, F., M. Flores (1998): The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry-cured ham. *CRC Critical reviews in Food Science and Nutrition* 38, 331-352.

Toldrá, F., M.C. Aristoy, M. Flores (2000): Contribution of muscle aminopeptidases to flavour development in dry-cured ham. *Food Research International* 33, 181-185.

Toldrá, F. (2002): Dry-cured meat products. Food and Nutrition press, inc. Trumbull, Connecticut, USA.

Vestergaard, C.S., (1996): Sensory and chemical profiling of Italian dry-cured ham. Master Thesis. Royal Veterinary and Agricultural University of Denmark. Faculty of Dairy.

Prispjelo / Received: 26.3.2007.

Prihvaćeno / Accepted: 5.7.2007. ■

KAKVOĆA I ZDRAVSTVENA ISPRAVNOST MESA ŠARANA IZ INTENZIVNOG UZGOJA

Fleck¹, A., M. Hadžiosmanović², Ž. Cvrtila², N. Zdolec², I. Filipović², L. Kozačinski²

SAŽETAK

U radu su prikazani rezultati senzornih, mikrobioloških i kemijskih pretraga mesa šarana iz intenzivnog uzgoja. Za potrebe istraživanja uzorkovano je 10 primjeraka šarana prosječne mase 2092 g. Organoleptičkom pretragom svi su uzorci ocijenjeni svježom ribom. Na osnovi rezultata mikrobiološke pretrage mesa šarana zaključujemo da 20% uzoraka zadovoljava odredbe Pravilnika o mikrobiološkim standardima za namirnice (NN RH 125/03, 40/01, 20/01). Količina bjelančevina u uzorcima šarana prosječno je iznosila 17,17 %, masti 10,56 %, vode 69,93 % i pepela 1,25%.

UVOD

Količine pojedinih hranjivih tvari u mesu riba značajno variraju ovisno o vrsti ribe, prehrani, starosti, spolu, migraciji, uvjetima okoliša te godišnjem dobu. U tabl. 1. prikazan je prosječni sastav mesa nekoliko najpoznatijih vrsta slatkovodnih riba, a radi usporedbe, i sastav nekoliko najčešćih drugih namirnica

animalnog podrijetla (Kulier, 1996).

Količine pojedinih hranjivih tvari u mesu riba značajno variraju ovisno o vrsti ribe, prehrani, starosti, spolu, migraciji, uvjetima okoliša te godišnjem dobu. U tabl. 1. prikazan je prosječni sastav mesa nekoliko najpoznatijih vrsta slatkovodnih riba, a radi usporedbe, i sastav nekoliko najčešćih drugih namirnica animalnog podrijetla (Kulier, 1996). Sastav ribljeg mesa je u suštini jednak sastavu mesa životinja za klanje. Ipak, poradi nekih svojih osobina riblje meso se različito ponaša pri uskladištenju i čuvanju, odnosno u tehnološkim procesima prerade. Na to prvenstveno utječe veći postotak vode u mesu ribe, te je ono podložnije kvarenju. Meso riba ima mnogo manje vezivnog tkiva, nježnije je, podložnije enzimskoj i mikrobiološkoj razgradnji, te time i lakše probavljivo (Marošević, 1982). Bjelančevine ribljeg mesa su biološki jednako vrijedne kao i bjelančevine iz drugih životinjskih izvora (mesa toplokrvnih životi-

¹ Alan Fleck, dr. vet. med., Veterinarska ambulanta "Goldi", Preradovićeveva 26, Zagreb

² Dr. sc. Mirza Hadžiosmanović, redoviti profesor; dr. sc. Željka Cvrtila, docentica; dr. sc. Nevijo Zdolec, znanstveni novak - viši asistent; Ivana Filipović, dr. vet. med., znanstvena novakinja – asistentica; dr. sc. Lidija Kozačinski, izvanredna profesorica; Zavod za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Heinzlova 55.