

# Metode identifikacije goveđeg mesa iz pašnog uzgoja

Goran Kiš<sup>1</sup>\*, Ivica Kos<sup>2</sup>, Dalibor Bedeković<sup>1</sup>, Ivan Širić<sup>2</sup>, Zlatko Janječić<sup>1</sup>, Petar Čurković<sup>1</sup>

## Sažetak

Meso dobiveno od goveda hranjenih voluminoznim krmivima, odnosno, na paši premium je proizvod, poboljšanih nutritivnih i osjetilnih karakteristika. Navedeno je potaknulo i veliko zanimanje za metode identifikacije i provjere autentičnosti kojima se garantiraju tvrdnje o podrijetlu takvog mesa. Ovaj rad daje pregled trenutnih saznanja o identifikaciji autentičnosti mesa goveda hranjenih, dominantno travama, odnosno, pašnim načinom proizvodnje. Razvijen je niz analitičkih metoda, samih ili kombiniranih, koje uključuju analize elementarnih ili molekularnih sastojaka animalnih proizvoda i u kombinaciji s kemometrijom, koji su se pokazali korisnima za razlikovanje različitih sistema hranidbe uz provjeru autentičnosti mesa goveda držanih na pašnjacima. Neke od ovih analiza uključuju određivanje sastava masnih kiselina, hlapljivih i fenolnih spojeva, karotenoida, stereoizomera vitamina E, omjera stabilnih izotopa, proteinskih markera i drugih bioaktivnih spojeva. Opisana je primjena spektroskopskih metode u identifikaciji podrijetla goveđeg mesa, te suvremena funkcionalna genomika, kao jedan od najnovijih pristupa u identifikaciji mesa proizvedenog na paši. Njihova identifikacijska pouzdanost u složenijim uvjetima hranjenja, kao što su promjene u dostupnosti krmiva i/ili kada paša čini samo dio hranidbe životinje i dalje se nadgrađuju i aktivno se istražuju. Opisuju se metode kroz njihove mogućnosti i potencijalna ograničenja, a što je najčešće uzrokovano varijacijama u količini, karakteristikama i sastavu hrane s pašnjaka koju konzumiraju životinje, a koje su ipak svojstvene sustavima proizvodnje na travnjacima, varijacijama u reakcijama životinja unutar i između pasmina i poteškoće u otkrivanju konzumacije hrane koja nije trava od strane životinje. Također, ističe niz pitanja za razmatranje, točke opreza i upozorenja u primjeni ovih metoda. Provjera autentičnosti životinja, povijest hranidbe kroz životinjske proizvode, a posebno provjera autentičnosti mesa od životinja hranjenih travom, suočava se s izazovima svojstveno praksama u uzgoju stoke, uglavnom zbog varijacija u sastavu obroka i varijacijama tijekom proizvodnog života. Velik dio dosadašnjih istraživanja bavio se dokazivanjem sistema identifikacije proizvoda, dok bi se budućnosti trebalo uložiti više resursa za razvoj baza podataka kako bi se stekla jednostavnost primjene i sigurnost sustava kontrole animalnih proizvoda.

**Ključne riječi:** meso goveda, hranidba, paša, identifikatori

<sup>1</sup> dr.sc. Goran Kiš, izvanredni profesor; dr.sc. Dalibor Bedeković, docent; dr.sc. Zlatko Janječić, redoviti profesor u trajnom zvanju; Petar Čurković, mag.ing.agr., student; Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za hranidbu životinja

<sup>2</sup> dr.sc. Ivica Kos, izvanredni profesor; dr.sc. Ivan Širić, izvanredni profesor; Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za specijalno stočarstvo

Autor za korespondenciju: [kis@agr.hr](mailto:kis@agr.hr)

## Uvod

Provjera autentičnosti mesa dobivenog od goveda hranjenih na paši od interesa je svih sudionika prehrambenog lanca iz nekoliko razloga. Životinje hranjenje travom zadovoljavaju zahtjeve potrošača za nutritivno vrijednijim proizvodima proizvedenim na „prirodan“ način. Danas potrošači pokazuju sve veći interes za način proizvodnje njihove hrane i utjecaju proizvodnje hrane na okoliš te hranidba goveda na paši, travom, donosi pozitivne vrijednosti u tom pogledu. Nadalje, sve veći broj znanstvenih istraživanja pokazuje da su prehrambene prednosti mesa s travnjaka, viši sadržaj nutritivno vrijednih spojeva, poput specifičnih masnih kiselina (MK), vitamina i antioksidansa (Aurousseau i sur., 2004; Alfaia i sur., 2009.; Butler i sur., 2011.). Konačno, proizvođači koji su se obvezali poštivati specifične uvjete proizvodnje, obično putem certificiranih standarda proizvodnje, traže zaštitu od pojedinih, neiskrenih aktera u proizvodnji mesa koji bi mogli biti u iskušenju iskoristiti bolje cijene koje prate takove proizvode, bez pridržavanja odgovarajućih ograničenja ovakve proizvodnje. U pogledu potencijalne dodane vrijednosti i dodatnih troškova proizvoda, proizvođači mesa i potrošači su stoga zabrinuti o potencijalnim rizicima prijevare. Navedeno, je potaknulo razvoj analitičkih metoda provjere autentičnosti koje nadilaze kontrolu na farmi (samoinspekciju ili kontrolu na farmi neovisnih agencija) kako bi se jamčilo da je proizvod u potpunosti usklađen sa propisanim standardima. U radu će se dati pregled dosadašnjih znanstvenih saznanja i metodologije za provjeru autentičnosti mesa hranjenih dominantno travom u proizvodnji mesa goveda. Znanstvena literatura o autentičnosti mesa goveda hranjenja travom pokriva čitav niz situacija, kao što su razlike u hranidbi goveda travom naspram (vs.) hranidbi žitaricama ili kukuruzom, hranidbe svježom travom vs. hranjenju konzerviranom travom (sijeno, sjenaža, travna silaža), razlikovanje prema načinu konzerviranja (sijeno vs. sjenaža vs. silaža), razlikovanje prema porijeklu (leguminoze vs. trave, kultivirane vs. prirodni pašnjaci, botaničke raznolike vs. monokulture), identifikacija prema udjelima u obroku, te identifikacija ekološki vs. konvencionalno proizvedeno meso. Ovaj članak daje pregled istraživanja provedenih u svim tim situacijama uz opis analitičkih metoda primijenjenih u svakome od njih.

## Razlikovanje specifičnosti obroka

Obrok, koji predstavlja kombinaciju krmiva kojim se životinje hrane, jedan je od najvažnijih čimbenika koji utječu na sastav mesa goveda. Taj je učinak posljedica specifičnih spojeva koji se ili izravno prenose iz obroka - hrane za životinje u hranu za ljude ili ih proizvode mikroorganizmi buraga ili metabolizma životinja, pod utjecajem specifičnosti pojedenog obroka. Ovi spojevi, stoga, mogu poslužiti kao identifikatori hrane koju su životinje pojele, odnosno, načina proizvodnje mesa goveda. Razlike u sastavu mesa induciraju razlike u njegovim optičkim svojstvima, a time i spektralne značajke, koje se također, primjenom određene spektrofotometrijske metodologije, mogu koristiti za potvrdu autentičnosti obroka životinja. U razvoj identifikacije proizvoda od životinja hranjenih travom navode se dva sveobuhvatna pristupa, od kojih je jedan kvantificiranje specifičnih elemenarnih i molekularnih sastojaka mesa, te druga globalnija metoda profiliranja „otiska“ animalne proizvodnje, poput spektrofotometrijske analize svojstava proizvoda.

## Kemijski spojevi u mesu kao indikatori hranidbe Masne kiseline

U istraživanju Alfaia i sur. (2009.) utvrđeno je sa 100 %-tnom sigurnošću razlika u sastavu masnih kiselina mesa između životinja hranjenih koncentratom na bazi ječma, životinja hranjenih na pašnjacima ili životinja hranjenih na pašnjacima uz naknadno dodavanje koncentrata na bazi ječma kroz dva ili četiri mjeseca prije klanja. Isto tako, studijom u Irskoj (Monahan i sur., 2018.) dokazano je da je sastav MK omogućio ispravnu klasifikaciju gotovo 93 % uzoraka govedine iz četiri različita načina hranidbe: hranidba na pašnjacima (jednu godinu) vs. obrok s koncentratima na bazi ječma (jednu godinu) vs. travna silaža (šest mjeseci) zatim paša (šest mjeseci) vs. travna silaža (šest mjeseci), zatim paša (tijekom šest mjeseci) uz dodavanje 50 % ječma obroku. U navedenom istraživanju jedina pogreška u identifikaciji mesa bila je kod životinja koje su prije samog pokusa, držanja na paši, hranjene travnom silažom. Prema istraživanju Monhani i sur. (2018.) provjera autentičnosti goveđeg mesa, od životinja hranjenih travama (pašnjak ili silaža), moguća je s točnošću od gotovo 100 %. Osim analize hranidbe goveda samo na bazi trave, Moloney i sur. (2018.) koristili su analizu MK mesa za provjeru autentičnosti paše. Dobiveni rezultati

vjerodostojno utvrđuju razlike u MK sastavu mesa u 86 % slučajeva za hranidbu samo s travama, te 81 % u obroka koji se sastojao od trava i leguminoza (djetelina). Slični rezultati dobiveni su i pri određivanju MK profila mlijeka, krava hranjenih različitim vrstama voluminoznih krmiva. Međutim, s obzirom da profil MK animalnih proizvoda uvelike varira ovisno o fenološkim stadijima pašnjaka, botaničkom sastavu i samim menadžmentom pašnjaka, čini se da je teško standardizirati analitičke metode za razlikovanje tipa pašnjaka koje bi nam bile pouzdane tijekom cijele vegetacijske godine ili na velikim poljoprivrednim površinama (Coppa i sur., 2015.). Također, pri određivanju sastava MK i donošenje zaključaka na temelju rezultata analiza, trebamo biti oprezni i spomenuti činjenicu da neka koncentratna krmiva također mogu biti izvori MK (npr. sjeme lana), te dati sličan profil MK (linolne,  $\alpha$ -linolenska i konjugirane linolenska kiseline) kao da su životinje bile hranjene samo travom ili na paši.

### Hlapljivi spojevi

Hlapljivi spojevi u mesu ekstrahiraju se pomoću tehnologije dinamičke analize para, a zatim analiziraju plinskom kromatografijom – MS. Masne kiseline s razgranatim lancem, laktoni, aldehidi, indoli, 2,3- oktandioni, terpeni, te sumporni spojevi mesa, spojevi su koji ovise o različitoj hranidbi. Navedeni spojevi posebno su pogodni za identifikaciju mesa dobivenog od goveda hranjenog različitim obrocima od svježe trave vs. koncentrata (Vasta i Priolo, 2006.), te svježih trava vs. konzervirana krma (Abilleira i sur., 2011.). Neki od ovih spojeva (terpeni), hlapljive su komponente koje se iz komponenti obroka goveda izravno prenose u životinjsko tkivo. Drugi spojevi (skatol i indol) proizvod su metabolizma same životinje, dok se neki određeni spojevi sumpora ili produkti oksidacije formiraju prilikom termičke obrade mesa, odnosno, kuhanjem. Kroz komparativnu analizu četiri sustava hranidbe goveda Monahan i sur. (2018.) identificirani su četiri spoja (skatol, 3-undekanon, kuminični alkohol i 2-metil-1-butanol) koji su im omogućili utvrditi razlike u sastavu mesa životinja hranjenih na pašnjaku od životinja hranjenih koncentratom. Posebno je zanimljiva pojava jednog hlapljivog organskog ugljikovodika, Germakrena D, kao čvrstog indikatora hranidbe goveda travama. Osim povratnog praćenja hranidbe travama, terpeni su pogodni kao identifikatori hranidbe na pašnjacima i to posebice na trajnim

pašnjacima i livadama bogatim dvosupnicama (Abilleira i sur., 2011.). Treba spomenuti da se hlapljivi spojevi neravnomjerno talože kroz različite frakcije masti u preživača, tako da razlikovni učinak vrste hrane za goveda može ovisiti izboru frakcije masnoće za analizu. Nadalje, profil terpena u hrani može široko varirati zbog niza čimbenika. Na pašnjacima, profil terpena uvelike ovisi o botaničkom sastavu, fenološkom stadiju, preferencijama životinja prema određenim biljkama, a što sve ovisi o samom gospodarenju pašnjacima (Coppa i sur., 2011.). Iz sveg navedenog proizlazi da zbog specifičnosti terpenskih profila ne čini se da je jednostavno i lako uklopiti terpena u generičku metodologiju provjere autentičnosti hranidbe goveda na paši. Ovo čini vrlo važnu prepreku u uspostavljanju čvrstih, stabilnih i generalizirajućih odnosa između obroka koji jedu goveda i profila hlapljivih spojeva animalnih proizvoda. Ipak, neki pojedinačni terpeni (p-cimen,  $\beta$ -kariofilen i trans-kadin-1(6),4-dien), te druge hlapljive tvari (toluen i nekoliko spojeva sumpora) više su puta identificirani kao identifikatori hranidbe goveda na pašnjacima (Vasta i Priolo, 2006.). Kako su analize navedenih spojeva dugotrajne i skupe, te su izvedene na ograničenom broju uzoraka, njihova se stvarna razlikovna pouzdanost još treba dokazati na mnogo većem broj uzoraka. Jednostavno promatranje značajnosti utjecaja hrane na sadržaj odabranih spojeva u mesu nije dovoljan za potrebe provjere autentičnosti. Ključni dio je odrediti udio uzoraka koji reprezentativno predstavlja svaki obrok. Postoje dva velika ograničenja za ove spojeve, kao identifikatora pojedene hrane. Metode ekstrakcije još uvijek nose jaka ograničenja u smislu hvatanja hlapljivih tvari i analitičke ponovljivosti analiza, te budući da su kandidati za identifikatore provjereni na malom broju uzoraka, postoji pitanje njihovog šireg korištenja kao identifikatora hranidbe u stvarnim uvjetima proizvodnje.

### Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka koji se mogu prenijeti iz obroka u animalne proizvode izravno nepromijenjeni ili djelomično izmijenjeni putem bakterija u buragu ili metabolizmom životinje domaćina. Ovi spojevi specifični su za svaku biljnu vrstu, a fenolni profil prirodnih travnjaka varira ovisno o botaničkom sastavu (Besle i sur., 2010.). Pokazalo se da je analiza fenolnih spojeva omogućila da se jasno vide razlike obroka na bazi sijena, silaže trave, kukuruzne silaže i paše.

Spojevi karbonilne skupine bili su predloženi kao identifikatori hranidbe silažama, bez obzira na porijeklo (trava ili kukuruz), dok su spojevi glicinamidne skupine (hipurinska kiselina) predloženi kao identifikatori hranidbe na paši (Rouge i sur., 2013.). Međutim, navedena istraživanja su bila prva o takvoj primjeni fenolnih spojeva, te prikladnost ovih spojeva treba biti detaljnije istražena. Također, treba spomenuti da sadržaj fenolnih spojeva u krmi uvelike varira te osim o botaničkog sastavu ovisi i o starosti biljaka prilikom konzumiranja/košnje, metodi konzervacije, te općenito upravljanjem pašnjakom (Besle i sur., 2010.). Fenolni spojevi u mesu i animalnim proizvodima se stoga suočavaju s sličnim ograničenjima kao i hlapljivi spojevi.

### Karotenoidi

Karotenoidi čine glavnu skupinu prirodnih pigmenata. Lutein je jedini karotenoid pohranjen u masti ovaca, dok goveda, presudno, akumuliraju  $\beta$ -karoten. Zeaksantin, glavni karotenoid u zrnu kukuruza, ne pohranjene se u masnom tkivu preživaa. Koncentracija karotenoida u životinjskom masnom tkivu životinja i njihovim proizvodima izravno je povezan s razinom unosa karotenoida obrokom (Calderon i sur., 2007.). Svježa zelena trava posebno je bogata karotenoidima, ali nakon što se osuši, krma progresivno gubi sadržaj pigmenata karotenoida, foto razgradnjom. U usporedbi s početnim sadržajem karotenoida, izmjerenih u svježoj travi, uvenula silaža s 28 % ST sadrži 60 % dok s 35 % ST do 30 % karotenoida, sjenaža 30 % dok u sijenu ima svega oko 20 % karotenoida (Nozière i sur., 2006.). Istovremeno je većina koncentratnih krmiva praktički bez luteina i  $\beta$ -karotena. Navedeno je jedan od razloga zbog čega je sadržaj karotenoida predložen kao identifikator autentičnosti proizvodnje mesa goveda hranjenih na bazi trave u odnosu na ona hranjena koncentratima i/ili obrokom na bazi kukuruzne silaže (Monahan i sur., 2018.). U navedenom istraživanju sadržaj karotenoida izravno je određen metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) ili posredno preko spektra refleksije tjelesne masti. Prache i Thériez (1999.) utvrđuju da se analizom koncentracije karotenoida u plazmi ili putem spektra refleksije masnog tkiva mogu razlikovati životinje hranjene travom od onih hranjenih u štalama. Osmislili su spektro-kolorimetrijski indeks, izračunat iz spektra refleksije u području karotenoida koji apsorbiraju svjetlost, za kvantificiranje njihovog intenziteta i

tako procjenu njihove koncentracije (Prache i sur., 2003.). Ova jednostavna, brza i mobilna metoda ubrzo se proširila za identifikaciju hranidbe u proizvodnji mesa goveda (Monahan i sur., 2018.), a i rezultati ponovljenih analiziranja od tada su potvrđeni u većim bazama podataka Irske, Španjolske i Italije i na drugim animalnim proizvodima od mesa janjadi i mlijeka (Nozière i sur., 2006.; Prache i sur., 2018.). Kako se nakupljanje karotenoida razlikuje između masnih naslaga, razlikovna pouzdanost ovisi o mjestu s kojega uzroujemo uzorak za analizu (Dian i sur., 2007.). Nadalje, čak i uz identičan unos karotenoida, intenzitet nakupljanja karotenoida u masti i dalje se može razlikovati između pojedinih pasmina (Macari i sur., 2017.). Još jedna točka opreza koju treba spomenuti je da se karotenoidi mogu dodati u obroke, grubim koncentratnim krmivima i od lucerne (Prache i sur., 2009.; Macari i sur., 2017.) stoga i taj podatak moramo znati, kako ne bi došlo krive interpretacije i autentifikacije proizvoda.

### Stereoizomeri vitamina E

Stereoizomernom analizom vitamina E u životinjskim proizvodima može se pratiti porijeklo i identificirati prirodni vs. sintetički dodatak vitamina E. Monahan i sur. (2018.) utvrdili su da je RRR- $\alpha$ -tokoferol bio dominantni stereoizomer u govedine dobivene od goveda hranjenih travom - prirodni vitamin E, dok su svih ostalih osam stereoizomera pronađeni kod životinja hranjenih koncentratima uz dodatak sintetičkog vitamina E.

### Stabilni izotopi

Omjeri stabilnih izotopa glavnih atoma koje tvore molekularne frakcije životinjskih tkiva i proizvoda ovise o izotopskom sastavu pojedine hrane. Omjeri stabilnih izotopa u određenim krmivima izražavaju se kao relativna zastupljenost dvaju izotopa mjereno omjerom izotopa i pod utjecajem su proizvođačkih navika. To se odnosi na vrstu i udio pojedinih komponenti obroka, vrstu i ulazne količine primjene gnojiva u proizvodnji krme, te geografskim čimbenicima koje čine; geografska širina, nadmorska visina i blizina do mora. Vrijednost omjera stabilnih izotopa nekog elementa za dani uzorak konvencionalno se uspoređuje sa standardom vrijednost izmjerenom na referentnom proizvodu i izražava kao indeks,  $\delta$ . C4 biljke (kukuruz) i C3 biljke (travnjaci, žitarice, soja, šećerna repa) imaju različite metaboličke puteve za



fotosintezu, što inducira razlike u njihovim omjerima stabilnih izotopa ugljika. Raspon varijacija vrijednosti  $\delta^{13}\text{C}$  je -14 ‰ do -10 ‰ za C4 biljke vs. -35 ‰ do -21 ‰ za biljke C3. Vrijednost  $\delta^{13}\text{C}$  može tako jasno odvojiti govedina hranjenu kukuruzom vs. silažom trava (Bahar i sur., 2005.). Samo za primjer, treba spomenuti točku opreza i kod ove metodologije, kako su neke tropske travnjačke biljke, biljke C4, životinje napasivane na ovakvom tipu travnjaka mogle bi greškom dobiti lažno pozitivan rezultat kao da su hranjenje na bazi kukuruza. Vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  u dušičnim spojevima voluminozne krme, zbog atmosferske fiksacije dušika daleko su niže u leguminozama nego u travama (Devincenzi i sur., 2014.). Navedeni autori iskoristili su to kako bi identificirali meso janjadi koja su jela obrok od 62 % lucerne u odnosu na janjad koja je bila samo na paši. U goveda, profil MK u kombinaciji s  $\delta^{15}\text{N}$  ispravno klasificiran 96 % i 87 % uzoraka mišića od goveda koje su pasla smjese trava i djetelina u odnosu na ona s pašnjaka samo na travi (Moloney i sur., 2018.). Sustavi ekološke poljoprivrede sve manje koriste C4 biljke kao stočnu hranu, dok sve više cijene travnjačke mahunarke, zbog čeka se potiču metode korištenjem omjera izotopa C i N za provjeru autentičnosti govedine dobivene od goveda uzgajanih po ekološkim principima. Studije koje je objavio Monahan i sur. (2018.) je dokazano da su vrijednosti  $\delta^{13}\text{C}$  sve manje i manje varijabilne u ekološki dobivenom mesu, dok su rezultati za N izotope varijabilniji, s vrijednostima  $\delta^{15}\text{N}$  ponekad nižim i ponekad gotovo identičnim ekološki dobivenom mesu. Postoji nekoliko točaka opreza za izotope N. Prva je učinkovitost fiksacije atmosferskog dušika koji u leguminoza jako varira s dobi biljke (Devincenzi i sur., 2014.); druga, kultivirani travnjaci mogu biti bogati leguminozama i treća unos organskog dušika povećava biljne vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  u usporedbi s dušikom iz mineralnih gnojiva (Boner i Forstel, 2004.). Iako sustavi ekološke poljoprivrede cijene pašnjačke leguminoze, te također koriste organski stajski gnoj, ova dva čimbenika imaju antagonističke učinke na vrijednosti  $\delta^{15}\text{N}$  u tlu, te posljedično, i u proizvodima koji potječu od životinja koje ih pasu.

### Proteinski biomarkeri

Za tri završna režima hranjenja krava, pašnjak vs. sjenaža vs. sijeno tri mjeseca prije klanja, utvrđena je razlikovna identifikacijska korištenjem proteinskih biomarkera (Gagaoua i sur.,

2017.). Metoda uključuje identifikaciju udjela izoforme teškog lanca miozina - oksidativne (MyHC-IIA) i glikolitičke (MyHC-IIX), proteina stresa  $\alpha\beta$ -kristaline i antioksidativni protein superoksid dismutaza, kojih je bilo više kod obilne hranidbe pašom, što uključuje i intenzivniji rad mišića.

### Spektroskopske metode

Vidljiva spektroskopija (VIS), bliska infracrvena spektroskopija (NIRS) i srednje infracrvena spektroskopija (MIR) su se pokazale obećavajućim pristupima za autentifikaciju proizvoda proizvedenih od životinja hranjenih na paši. Animalni proizvodi se analiziraju pomoću kemometrijske metode za razlikovanje režima hranjenja i točno mogu odrediti razlikovna spektralna područja od našeg interesa. Također ove su metode brze, bez kemikalija i bez otpadnih tvari. Vidljiva spektroskopija (400 do 700 nm) je uspješno provedena analiziranjem s janječim lojem (Prache i Thériez, 1999.), kravljim mlijekom (Nozière i sur., 2006.) i sirom (Andueza i sur., 2013.), te dokazao svoju praktičnu važnost i primjenjivost na mesu janjadi i kravljem mlijeku (Andueza i sur., 2013.; Prache i sur., 2018.). Malo dostupne su usporedive informacije o mišićnom tkivu goveda. Jedina studija koja koristi NIRS na mišićnom tkivu je Cozzolino i sur. (2002.), koji je identificirao razlike u hranidbi s uspješnosti od 82 % i 79 % za uzorke goveda koji su bili na završnom tovu na pašnjaku vs. na silaži kukuruza. Ove spektralne metode zahtijevaju sofisticiranu matematiku, ali su prilično jednostavne i prilagođene za primjenu na terenu, te su na najboljem putu da postanu glavni oslonac prakse u provjeri autentičnosti. Na primjer, VIS mjerenje je dovoljno brzo da ide u korak s brzinom trupova na liniji klanja, a u komercijalnim klaonicama već se pojavljuju i prijenosni NIRS uređaji. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) uspješno je korištena za razlikovanje promjena u metabolijskom profilu mišića goveda i identificiranju različitih vrste proizvodnih sustava u proizvodnji mesa goveda (Monahan i sur., 2018.). U potonjoj studiji razlikovna analiza urina pokazala se dobrom u razlikovanju hranidbenih sustava goveda na otvorenom/pašnjacima vs. zatvorenom/koncentratom, te su kreatinin, glukoza, piruvat, fenilalanin i hipurat identificirani kao razlikovne varijable. Identifikacija proizvodnih sustava na mišićima također je bila moguća, iako ne tako pouzdana kao i kod urina. Identifikacijski metaboliti u mišićnom tkivu, za razlikovanje goveda hranjene koncentratom, su karno-

zin (veća koncentracija) i metilhistidin, malonat i glutamin (niže koncentracije).

### Funkcionalna genomika

Funkcionalna genomika jedan je od najnovijih pristupa koji se pojavio. Pretpostavka je, da je regulacija ekspresije gena modulirana raznim čimbenicima, uključujući hranjive tvari, te bi profili ekspresije gena mogli donijeti relevantne informacije o pozadini hranidbe i hrane. Analitičke tehnike mobilizirane funkcionalnom genomikom mogu usporediti profile ekspresije gena (transkriptomiju) ili profili ekspresije proteina (proteomika) u uzorcima životinjskog tkiva. Kod bikova koji su hranjeni na pašnjacima ili hranjeni kukuruznom silažom u zatvorenom prostoru, Cassar-Malek i sur. (2009.) utvrdili su nedovoljno izraženost gen za selenoprotein W kod životinja hranjenih na pašnjacima. Komplementarne analize sugerirale su da je to više vezano uz koncentracija/bioraspoloživost selena (niža u travi nego kukuruzna silaža) nego na veće vježbanje mišićnog rada u životinja hranjenih na pašnjacima. Ekspresija selenoproteina W bi stoga mogla predstavljati genski identifikator hranjenja travom. U drugom istraživanju goveda hranjena na otvorenom/paša vs. zatvorena/koncentrirana hrana, Sweeney i sur. (2016.) identificirali su 26 različito izraženih gena. Neki odražavaju metabolizam MK, neki su u pozitivnoj korelaciji s ukupnim sadržajem n-3 MK i profilima ekspresije tri gena (ALAD, EIF4EBP1 i NPNT) čvrsto razlučujući dva sustava hranjenja sa sigurnošću od 95 % - za životinje hranjene na otvorenom/pašnjaku) i za 100 % - za životinje hranjene u zatvorenim prostorima/koncentratom).

## Zaključci

Moguće je identificirati različite sustave hranidbe pomoću analitičkih metoda, koje kvantificiraju specifične spojeve ili spektroskopskim metodama, kao što su one temeljene na optičkim svojstvima proizvoda. Međutim, identifikacija može biti ograničena kada se metode koriste zasebno, a ne iskoristi sinergije između različitih metoda i različitih tkiva koja je vrlo česta. Rezultati dobiveni u manje različitim i u obrocima promjenljivih režima hranjenja, koje je teže okarakterizirati, govore samo u prilog nužnosti kombiniranja različitih metoda i identifikatora. Daljnji argumenti za kombiniranje

različitih identifikatora (i/ili različitih tkiva za mesne proizvode) zbog njihovih uočenih razlika u profilu latencije i/ili postojanosti. Spektrometrijske metode, koje se obično temelje na optičkom svojstvu proizvoda daju obećavajuće performanse, čak i kod složenijih promjena obroka. Kako se ove metode (posebno MIR) već koriste za analizu mlijeka (tj. za tjednu procjenu parametara vezanih uz plaćanje mlijeka), bilo bi moguće koristiti ih i za rutinsku provedbu provjere autentičnosti u vrlo kratkom roku. Međutim, ove metode ne informiraju precizno o temeljnim razlozima za razlike, stoga su potrebna istraživanja u oba pristupa, na analitici s jednim spojem i na temelju spektralne analize. Cijena i jednostavnost implementacije razlikuju se među metodama. Metode temeljene na optičkim svojstvima proizvoda su od posebnog interesa, brze su, bez kemikalija i bez otpada, a neke od njih se već mogu implementirati u industriji hrane, na velikom broju uzoraka pomoću prijenosnih uređaja. Druge metode, kao što su analiza fenola ili hlapljivih spojeva, mnogo su skuplje i teško ih je implementirati, te se mogu koristiti samo na malom broj uzoraka, ali su sigurnije i mogućnost njihove uporabe može spriječiti prijevare. Također se može razmotriti korištenje ovih metoda u fazama, najjednostavnije na velikom broju uzoraka, a najskuplje u krajnjem slučaju na mnogo manjem broj uzoraka ili kao superkontrola. Povratna provjera autentičnosti životinja, povijest hranidbe kroz životinjske proizvode, a posebno provjera autentičnosti mesa od životinja hranjenih travom, suočava se s izazovima svojstveno praksa u uzgoju stoke, uglavnom zbog varijacija u sastavu obroka i varijacijama tijekom proizvodnog života. U velikom dijelu dosadašnjih istraživanja radilo se o dokazivanju koncepta identifikacije i potvrde autentičnosti proizvoda, dok se sada moraju razviti veće baze podataka, kako bi se stekla generičnost i jednostavnost metodologije i uspostavio sustav kontrole proizvoda.

## Literatura

- [1] Abilleira, E., M. Virto, A.I. Nájera, M. Albisu, F.J. Pérez-Elortondo, J.C. Ruiz De Gordo, M. Mertxe De Renobales, L.J.R. Barron (2011): Effects of seasonal changes in feeding management under part-time grazing on terpene concentrations of ewes' milk. *Journal of Dairy Research* 78, 129–135.
- [2] Alfaia, C.P.M., S.P. Alves, S.I.V. Martins, A.S.H. Costa, C.M.G.A. Fontes, J.P.C. Lemos, J.A.M. Prates (2009): Effect of feeding system on intramuscular fatty acids and conjugated linoleic acid isomers of beef cattle, with emphasis on their nutritional value and discriminatory ability. *Food Chemistry* 114, 939–946.
- [3] Andueza, D., C. Agabriel, I. Constant, A. Lucas, B. Martin (2013): Using visible or near infrared spectroscopy (NIRS) on cheese to authenticate cow feeding regimes. *Food Chemistry* 14, 209–214.
- [4] Aurousseau, B., D. Bauchart, E. Calichon, D. Micol, A. Priolo (2004): Effect of grass or concentrate feeding systems and rate of growth on triglyceride and phospholipid and their fatty acids in the m. longissimus thoracis of lambs. *Meat Science* 65, 531–541.
- [5] Bahar, B., F.J. Monahan, A.P. Moloney, P. O'Kiely, C.M. Scrimgeour, O. Schmidt (2005): Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 1937–1942.
- [6] Besle, J.M., D. Viala, B. Martin, P. Pradel, B. Meunier, J.L. Berdague, D. Fraisse, J.L. Lamaison, J.B. Coulon (2010): Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *Journal of Dairy Science* 93, 2846–2856.
- [7] Boner, M., H. Forstel (2004): Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 301–310.
- [8] Butler, G., J.H. Nielsen, M.K. Larsen, B. Rehberger, S. Stergiadis, A. Canevar, C. Leifert (2011): The effects of dairy management and processing on quality characteristics of milk and dairy products. *NJAS – Wageningen Journal of Life Sciences* 58, 97–102.
- [9] Calderon, F., B. Chauveau-Duriot, P. Pradel, B. Martin, B. Graulet, M. Doreau M, P. Nozière (2007): Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma and milk following a shift from hay to diets containing increasing levels of carotenoids and vitamin E. *Journal of Dairy Science* 90, 5651–5664.
- [10] Cassar-Malek, I., C. Jurie, C. Bernard, I. Barnola, D. Micol, J.F. Hocquette (2009): Pasture-feeding of Charolais steers influences skeletal muscle metabolism and gene expression. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60, 83–90.
- [11] Coppa, M., A. Farruggia, P. Ravaglia, D. Pomiés, G. Borreani, A. Le Morvan, A. Ferlay (2015): Frequent moving of grazing dairy cows to new paddocks increases the variability of milk fatty acid composition. *Animal* 9, 604–613.
- [12] Coppa, M., B. Martin, P. Pradel, B. Leotta, A. Priolo, V. Vasta (2011): Effect of a hay-based diet of different upland grazing systems on milk volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 4947–4954.
- [13] Cozzolino, D., D. de Mattos, D.V. Martins (2002): Visible/near infrared reflectance spectroscopy for predicting composition and tracing system of production of beef muscle. *Animal Science* 74, 477–484.
- [14] Devincenzi, T., O. Delfosse, D. Andueza, C. Nabinger, S. Prache (2014): Dosedependent response of nitrogen stable isotope ratio to proportion of legumes in diet to authenticate lamb meat produced from legume-rich diets. *Food Chemistry* 152, 456–461.
- [15] Dian, P.H.M., D. Andueza, M. Jestin, I.N. Prado, S. Prache (2008): Comparison of visible and near infrared reflectance spectroscopy to discriminate between pasture-fed and concentrate-fed lamb carcasses. *Meat Science* 80, 1157–1164.
- [16] Gagaoua, M., V. Monteils, S. Couvreur, B. Picard (2017): Identification of biomarkers associated with the rearing practices, carcass characteristics and beef quality: an integrative approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 8264–8278.
- [17] Macari S., B. Graulet, D. Andueza, S. Prache (2017): Nitrogen stable isotope and carotenoid pigments signatures as tools to trace back the diet: comparison between two sheep breeds. *Small Ruminant Research* 153, 107–113.
- [18] Moloney, A.P., E.G. O' Riordan, O. Schmidt, F.J. Monahan (2018): The fatty acid profile and stable isotope ratios of C and N of muscle from cattle that grazed grass or grass/clover pastures before slaughter and their discriminatory potential. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 57, 84–94.
- [19] Monahan, F.J., O. Schmidt, A.P. Moloney (2018): Meat provenance: authentication of geographical origin and dietary background of meat. *Meat Science* 144, 2–14.
- [20] Nozière, P., B. Graulet, A. Lucas, B. Martin, P. Grolier, M. Doreau (2006): Carotenoids for ruminants: from forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology* 131, 418–450.
- [21] Prache, S., Y. Huang, D. Andueza (2018): To what extent is a breed-specific database necessary to differentiate meat from pasture-fed and stall-fed lambs using visible spectroscopy? *Animal* 12, 1682–1689.
- [22] Prache, S., N. Kondjoyan, O. Delfosse, B. Chauveau-Duriot, D. Andueza, A. Cornu (2009): Discrimination of pasture-fed lambs from lambs fed dehydrated alfalfa indoors using different compounds measured in the fat, meat and plasma. *Animal* 3, 598–605.
- [23] Prache, S., A. Priolo A., P. Grolier (2003): Effect of concentrate finishing on the carotenoid content of perirenal fat in grazing sheep: its significance for discriminating grass-fed, concentrate-fed and concentrate-finished grazing lambs. *Animal Science* 77, 225–234.
- [24] Prache, S., M. Theriez (1999): Traceability of lamb production systems: carotenoids in plasma and adipose tissue. *Animal Science* 69, 29–36.
- [25] Rouge, P., A. Cornu, A.S. Biesse-Martin, B. Lyan, N. Rochet, B. Graulet (2013): Identification of quinoline, carboline and glycinamide compounds in cow milk using HRMS and NMR. *Food Chemistry* 141, 1888–1894.
- [26] Sweeney, T., A. Lejeune, A.P. Moloney, F.J. Monahan, P. Mc Gettigan, G. Downey, M.T. Ryan (2016): The application of transcriptomic data in the authentication of beef derived from contrasting production systems. *BMC Genomics* 17, 746.
- [27] Vasta, V., A. Priolo (2006): Ruminant fat volatiles as affected by diet. A review. *Meat Science* 73, 218–228.

Dostavljen: 29.11.2021.

Prihvaćeno: 16.12.2021.

## Methods of identification of beef produced by pasture feeding

### Abstract

Beef obtained by feeding on pasture is a premium product, with improved nutritional and sensory characteristics, which has stimulated great interest in methods of identification and verification of authenticity that guarantee claims of the origin of such meat. This paper provides an overview of current knowledge on the identification of the authenticity of beef fed, predominantly, on grass, that is, on the grazing method of production. A number of analytical methods have been developed, alone or in combination, involving analyzes of the elemental or molecular constituents of animal products and combined with chemometry, which have proved useful in distinguishing different feeding systems while verifying the authenticity of beef kept on pasture. Some of these analyzes include the determination of the composition of fatty acids, volatile and phenolic compounds, carotenoids, stereoisomers, protein markers and other bioactive compounds. The application of spectroscopic methods in the identification of the origin of beef is described, as well as modern functional genomics, as one of the latest approaches in the identification of meat produced on pasture. For identification methods to be generally accepted and standardized in the changing feeding conditions and availability of different feeds they need to be reliable and accurate, and existing ones are still being actively researched and upgraded. The paper presents a series of analyzes with their possibilities of identification and potential limitations, which most often refer to many variables of agrotechnics on the pasture areas and their influence on feed composition, cattle breed differences, nutrition management, and many individual and interconnected relationships of the meals and the animals that eat it, all through the obtained results of the composition of the produced beef on pasture. Animal authentication, the history of feeding through animal products, and in particular the authenticity of meat from grass fed animals, faces challenges inherent in livestock practices, mainly due to variations in ratio composition and variations during production. Most of the described research focused on proving product identification systems, while in the future more resources should be invested in the development of common databases with the results of standardized methods, so that they can be analyzed and thus have the simplest possible application of analytical methods and secure animal product control system.

**Key words:** beef, feeding, grazing, identifiers

## Methoden zur Identifizierung von Rindfleisch aus Weideaufzucht

### Zusammenfassung

Rindfleisch aus Weidehaltung ist ein hochwertiges Produkt mit verbesserten ernährungsphysiologischen und sensorischen Eigenschaften, das großes Interesse an Methoden zur Identifizierung und Überprüfung der Echtheit geweckt hat, welche die Herkunftsangaben für solches Fleisch garantieren. Dieser Beitrag gibt einen Überblick über den aktuellen Wissensstand zur Identifizierung der Echtheit von Rindfleisch, das überwiegend mit Gras gefüttert wurde, d.h. von Rindfleisch aus der Weidehaltung. Es gibt mehrere Laboranalysen zur Feststellung der Echtheit von deklarierten Mahlzeiten. Bei einigen von ihnen werden nur einzelne Elemente und chemische Verbindungen bestimmt, während andere komplexer sind und die Ergebnisse mehrerer Analysen zum Nachweis der Herkunft der Futtermittel kombinieren. Damit die Identifizierungsmethoden unter den sich ändernden Fütterungsbedingungen und der Verfügbarkeit verschiedener Futtermittel allgemein akzeptiert und standardisiert werden können, müssen sie zuverlässig und genau sein, wobei die bestehenden Methoden immer noch aktiv erforscht und verbessert werden. Der Beitrag stellt eine Reihe von Analysen mit ihren Identifizierungsmöglichkeiten und potenziellen Einschränkungen vor, die sich meist auf viele Variablen der Agrotechnik auf den Weideflächen und deren Einfluss auf die Futterzusammensetzung, die Unter-



schiede zwischen den Rinderrassen, das Ernährungsmanagement und viele individuelle und miteinander verknüpfte Beziehungen zwischen den Mahlzeiten und den Tieren beziehen, und zwar durch die erzielten Ergebnisse der Zusammensetzung des durch Weidefütterung erzeugten Rindfleisches. Die meisten der beschriebenen Forschungsarbeiten konzentrierten sich auf den Nachweis von Produktidentifikationssystemen, während in Zukunft mehr Ressourcen in die Entwicklung gemeinsamer Datenbanken mit den Ergebnissen standardisierter Methoden investiert werden sollten, damit diese analysiert werden können und man somit über eine möglichst einfache Anwendung von Analysemethoden und ein sicheres Kontrollsystem für tierische Produkte verfügt.

**Schlüsselwörter:** Rindfleisch, Fütterung, Weidehaltung, Identifikatoren

## Los métodos de identificación de la carne de vacuno del pastoreo

### Resumen

La carne de res producida en pastoreo es un producto premium, con características nutricionales y sensoriales mejoradas, lo que ha despertado un gran interés en métodos de identificación y verificación de la autenticidad que garanticen declaraciones sobre el origen de dicha carne. Este trabajo da una revisión del conocimiento actual sobre la identificación de la autenticidad de la carne de res alimentada predominantemente de pasto, es decir, sobre los métodos de la producción en pastoreo. Hay una serie de análisis de laboratorio para identificar la autenticidad de las comidas declaradas. Algunos de ellos implican la determinación solamente de los elementos individuales y compuestos químicos, mientras que otros son más complejos y combinan los resultados de múltiples análisis para probar el origen de la alimentación animal. Para estar generalmente aceptados y estandarizados en las condiciones cambiantes de alimentación y la disponibilidad de diferentes alimentos, los métodos de identificación deben ser confiables y precisos, y los existentes aún están bajo investigación y actualización. El trabajo presenta una serie de análisis con sus posibilidades de identificación y posibles limitaciones, que en la mayoría de los casos se refieren a una serie de variables de agrotécnicas de áreas agrícolas y su impacto en la composición de los alimentos, las diferencias de razas, el manejo del ganado, el manejo nutricional, de las relaciones individuales e interrelaciones de los alimentos y de los animales que lo consumen, a través de los resultados obtenidos de la composición de la carne producida en pastoreo. La mayoría de las investigaciones descritas tuvo como el objetivo probar sistemas de identificación de productos, mientras que en el futuro debería invertir más recursos en el desarrollo de bases de datos comunes con los resultados de los métodos estandarizados para poder analizarlos y así tener la aplicación más simple de los métodos analíticos y un sistema de control seguro para productos animales.

**Palabras claves:** carne de res, nutrición, pastoreo, identificadores

## Metodi di identificazione della carne bovina di animali allevati al pascolo

### Riassunto

La carne bovina di animali alimentati al pascolo è un prodotto “premium”, dalle caratteristiche nutritive e organolettiche migliorate, il che ha acceso un grande interesse per i metodi di identificazione e verifica dell'autenticità con cui si garantiscono le dichiarazioni sull'origine di tale carne. Questo studio offre una panoramica sulle attuali conoscenze circa l'identificazione dell'autenticità della carne di bovini alimentati, prevalentemente, con erba, ovvero sia di bovini allevati al pascolo. Nella identificazione dell'autenticità dei pasti dichiarati esiste tutta una serie di analisi di laboratorio. Alcune di esse includono soltanto l'accertamento di certi elementi e composti chimici, mentre altre sono più comp-

lesse e, nel processo di accertamento dell'origine del mangime per gli animali, combinano i risultati di più analisi. Affinché i metodi di identificazione siano genericamente accettati e standardizzati nelle condizioni variabili di alimentazione e di accessibilità di differenti mangimi, devono essere affidabili ed esatti, per cui quelli esistenti sono ancora attivamente studiati e integrati. Nello studio si fa riferimento ad una serie di analisi con le loro possibilità d'identificazione e i loro potenziali limiti, che più spesso si riferiscono ad una serie di variabili agrotecniche delle superfici coltivabili ed il loro impatto sulla composizione del mangime di cui gli animali si nutrono, sulle differenze di razza del bovino, sul management alimentare e su una serie di rapporti singoli e reciproci tra i pasti e gli animali che se ne nutrono, il tutto attraverso i risultati ottenuti della composizione della carne bovina prodotta da animali al pascolo. La maggior parte dello studio descritto si è occupata di provare il sistema di identificazione del prodotto, mentre in futuro si dovrebbero investire maggiori risorse nello sviluppo di comuni banche dati con i risultati dei metodi standardizzati, in modo tale da poterli analizzare e, così facendo, disporre dell'applicazione più semplice possibile dei metodi analitici e un sistema sicuro di controllo dei prodotti d'origine animale.

**Parole chiave:** carne bovina, alimentazione, pascolo, identificatori

