

Određivanje antioksidacijskog potencijala dimljenih pršuta u odnosu na status zemljopisnog podrijetla

Ana Gugić Ratković¹, Matea Bosotin¹, Nives Marušić Radovčić^{1*}

Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti antioksidacijsku aktivnost uzoraka dimljenih pršuta, uključujući nezaštićene pršute i Dalmatinske pršute sa zaštićenom oznakom zemljopisnog podrijetla (ZOZP). Pršut je tradicionalni suhomesnati proizvod čija se prehrambena i senzorska vrijednost temelji na složenom procesu sušenja i zrenja, a sve više se prepoznaje i kao izvor bioaktivnih spojeva s potencijalno korisnim fiziološkim učincima. Procjena antioksidacijske aktivnosti u pršutima može biti korisna ne samo za razumijevanje njihovih funkcionalnih svojstava, već i kao dodatni parametar u valorizaciji proizvoda. Antioksidacijska svojstva pršuta povezuju se prvenstveno s prisutnošću bioaktivnih peptida koji nastaju tijekom proteolize mišićnih proteina. Ovi spojevi mogu doprinijeti smanjenju oksidativnog stresa te potencijalno smanjiti rizik od razvoja degenerativnih bolesti. U istraživanju je analizirano ukupno 14 uzoraka pršuta, od čega 9 nezaštićenih i 5 zaštićenih. Antioksidacijska aktivnost određena je u mišiću *biceps femoris* primjenom dviju različitih analitičkih metoda – DPPH i FRAP – koje se temelje na različitim mehanizmima djelovanja slobodnih radikala. DPPH metodom utvrđeno je da se sposobnost neutralizacije slobodnih radikala kretala u rasponu od $10,54 \pm 1,17$ % do $29,20 \pm 1,04$ %. FRAP metodom, kojom se mjeri redukcijski kapacitet, dobivene su vrijednosti apsorbancije u rasponu od $0,28 \pm 0,02$ do $0,88 \pm 0,04$ pri valnoj duljini od 700 nm. Dobiveni rezultati ukazuju na prisutnost izraženog antioksidacijskog potencijala u ekstraktima pršuta. Iako niži u usporedbi sa sintetskim antioksidansima, prirodni spojevi iz pršuta predstavljaju vrijedan izvor antioksidansa. Istraživanje potvrđuje potrebu za daljnjim analizama kako bi se u potpunosti valorizirao funkcionalni potencijal ovih tradicionalnih proizvoda.

Ključne riječi: Dalmatinski pršut, bioaktivni peptidi, antioksidacijska aktivnost, DPPH, FRAP

Uvod

Pršut je trajni suhomesnati proizvod dobiven sušenjem i zrenjem svinjskog buta, karakterističan po bogatom okusu, mirisu i dugotrajnosti. Tradicionalno se proizvodi u mediteranskim zemljama poput Italije, Španjolske, Portugala, Francuske i Hrvatske. Proces njegove proizvodnje temelji se na dugogodišnjoj tradiciji koja se prenosi s generacije na generaciju, pri čemu metode mogu značajno varirati ovisno

o regiji i zemlji podrijetla (Tomić i sur., 2016.).

Osim gastronomske vrijednosti, pršut je prepoznat i kao izvor brojnih bioaktivnih spojeva. Posebno se ističu bioaktivni peptidi s antioksidacijskim djelovanjem koji privlače pozornost zbog svoje sposobnosti inhibicije oksidativnih procesa u hrani. Ovi procesi negativno utječu na senzorska svojstva poput okusa, mirisa i nutritivne vrijednosti, čime

¹Ana Gugić Ratković, mag. ing.; Matea Bosotin, mag. ing.; izv. prof. dr. sc. Nives Marušić Radovčić; Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

*autor za korespondenciju: nmarusic@pbf.hr

posljedično dolazi do smanjenja kvalitete proizvoda. S biomedicinskog aspekta, smatra se da antioksidacijski peptidi doprinose zaštiti organizma od štetnog djelovanja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), čime mogu smanjiti rizik od razvoja određenih degenerativnih bolesti (Gallego i sur., 2017.).

Antioksidacijska svojstva pršuta prvenstveno se povezuju s prisutnošću bioaktivnih peptida koji nastaju tijekom razgradnje mišićnih proteina u procesu proteolize. Tijekom zrenja dolazi do oslobađanja ovih peptida, koji, zajedno s drugim bioaktivnim spojevima – poput koenzima Q10, glutationa, anserina, karnozina, karnitina i drugih – doprinose antioksidacijskom i potencijalno antihipertenzivnom djelovanju pršuta (Marušić i sur., 2013.). Unatoč poznatim biološkim svojstvima navedenih tvari, znanstvena istraživanja i dalje traju kako bi se detaljnije ispitao puni antioksidacijski potencijal pršuta, osobito s obzirom na njihovo stvarno djelovanje u organizmu, koje može odstupati od rezultata dobivenih u laboratorijskim uvjetima.

Za preciznu procjenu antioksidacijske aktivnosti prehrambenih uzoraka, uključujući pršut, uobičajeno je koristiti više različitih analitičkih metoda koje se temelje na različitim mehanizmima djelovanja. Najčešće korištene metode uključuju FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity), DPPH (metoda temeljena na stabilnom radikalu 2,2'-difetil-1-pikrilhidrazilu), ABTS (na temelju radikala 2,2'-azinobis), FC (Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih fenola) te ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Gu i sur., 2012.; George i sur., 2022.). Svaka od navedenih metoda pruža uvid u različite aspekte antioksidacijskog potencijala, stoga se najčešće koriste u kombinaciji kako bi se dobila što potpunija slika o učinkovitosti prirodnih antioksidansa.

U biološkim sustavima većina molekula je stabilna i ne sadrži nesparene elektrone. Međutim, u kontaktu sa slobodnim radikalima mogu reagirati s njima i pritom se same pretvoriti u radikale, čime se pokreće lančana reakcija (Gutteridge i Halliwell, 1996.). U ljudskom organizmu slobodni radikali neprestano nastaju kao prirodan rezultat metaboličkih procesa. Štoviše, neki slobodni radikali imaju važnu ulogu u normalnim fiziološkim funkcijama (Alugoju i sur., 2014.). U uvjetima urednog metabolizma tijelo posjeduje vrlo učinkovite mehanizme zaštite koji sprječavaju štetno djelovanje tih reaktivnih molekula. Tijekom evolucije aerobni organizmi razvili su složene obrambene sustave protiv poten-

cijalne štete koju slobodni radikali mogu izazvati. Ti mehanizmi uključuju kompleksan antioksidacijski sustav koji neutralizira prooksidanse i slobodne radikale nastale tijekom staničnog disanja, odnosno normalnog aerobnog metabolizma (Žarković i sur., 2001.).

Procjena antioksidacijske aktivnosti u pršutima može biti korisna ne samo za razumijevanje njihovih funkcionalnih svojstava, već i kao dodatni parametar u valorizaciji proizvoda. Stoga je cilj ovog istraživanja bio odrediti antioksidacijsku aktivnost nezaštićenih i zaštićenih uzoraka dimljenih pršuta primjenom DPPH i FRAP metode.

Bioaktivni peptidi

Peptidi s biološkom aktivnošću, dobiveni iz prehrambenih izvora, imaju velik potencijal za primjenu u funkcionalnoj prehrani i dodacima prehrani. Oni su spojevi koji, uz hranjivu vrijednost, mogu pozitivno utjecati na različite tjelesne funkcije. Najčešće se sastoje od 2 do 20 aminokiselina, iako ih neki mogu sadržavati i više (Montoro-García i sur., 2017.). Bioaktivni peptidi se nalaze unutar strukture izvornog proteina i u tom obliku su neaktivni, no mogu se aktivirati razgradnjom proteina pomoću enzima, kemikalija ili mikroorganizama. Među navedenim metodama, enzimatska razgradnja smatra se najdjelotvornijim i najsigurnijim načinom za dobivanje peptida s ciljanom biološkom aktivnošću (Kim i Wijesekara 2010., Di-Bernardini i sur., 2011.). Mogu se osloboditi i tijekom probave unesene hrane u probavnom sustavu. Međutim, kako bi mogli djelovati na organizam, ti peptidi moraju ostati netaknuti tijekom cijelog procesa probave, apsorbirati se u nepromijenjenom obliku prilikom prolaska kroz crijevnu barijeru i dospjeti u krvotok (Mora, 2019.). Bioaktivni peptidi s biološkom aktivnošću, koji potječu iz mesa, mogu se koristiti u razvoju funkcionalne hrane i dodataka prehrani. Istraživanja su pokazala da peptidi iz mesa i ribe imaju sposobnost snižavanja krvnog tlaka kod živih organizama, a osim toga posjeduju antioksidativna svojstva te pokazuju antimikrobno i antiproliferativno djelovanje (Ryan i sur., 2011.; Ryder i sur., 2016.). Jedna od najraširenijih primjena bioaktivnih peptida iz mesa je njihova sposobnost inhibicije ACE enzima. Ta aktivnost prvi put je zabilježena u peptidima izoliranim iz proteina svinjskog skeletnog mišića. U ovom istraživanju proteini skeletnih mišića svinje razgrađeni su pomoću osam različitih enzima, a zatim je ispitana njihova učinkovitost u blokiranju ACE aktivno-

sti. Dobiveni rezultati su potvrdili da je razgradnja pomoću enzima termolizina bila najučinkovitija (Arihara i sur., 2001.). Slična je aktivnost kasnije zabilježena i u peptidima dobivenim iz goveđih proteina (Jang i Lee, 2005.). Prvo provedeno *in vivo* ispitivanje antihipertenzivnog djelovanja peptida RPR iz nebulina te KAPVA i PTPVP iz titina koji su identificirani u probavljenom svinjskom mesu nakon oralne primjene kod štakora. Rezultati ispitivanja su pokazali snažno snižavanje krvnog tlaka u živim organizmima što potvrđuje potencijal svinjskih proteina kao izvora biološki aktivnih peptida prikladnih za primjenu u funkcionalnoj prehrani ili kao nutraceutici (Escudero i sur., 2012.).

U mesu su proučavani brojni prirodni antioksidansi poput tokoferola, ubikvinona, karotenoida, askorbinske kiseline, glutathiona, lipoične kiseline, karnozina, anserina i drugih. Na Slici 1 prikazane su strukture nekih bioaktivnih spojeva prisutnih u pršutima. Utjecaj tehnološkog procesa proizvodnje pršuta na količinu tih spojeva, uključujući kreatin, kreatinin, koenzim Q10, glutation, karnozin, anserin, karnitin, taurin, cistin, cistein i esencijalne aminokiseline – omogućio je procjenu njihove antioksidativne i antihipertenzivne aktivnosti (Marušić i sur., 2013.).

Materijal i metode

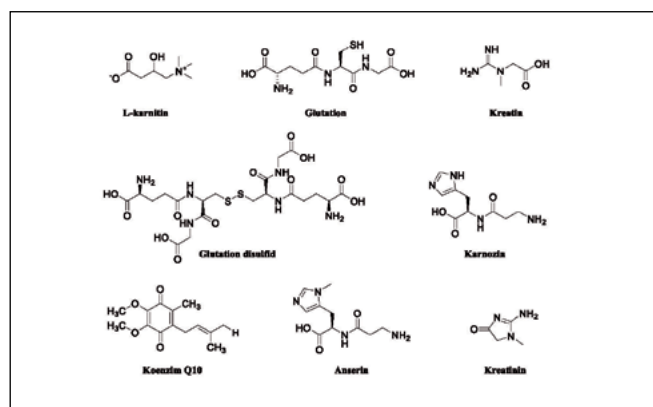
Uzorci

Istraživanjem su obuhvaćeni dimljeni pršuti starosti 18 mjeseci, preuzeti tijekom Nacionalnog sajma pršuta i suhomesnatih proizvoda u Sinju. Istraživanje je provedeno na 14 uzoraka dimljenih pršuta različitih proizvođača podijeljenih u dvije skupine (9

nezaštićenih dimljenih pršuta označeni oznakama A, B, C, D, 2, 3, 10, 17 i 19 te 5 zaštićenih Dalmatinskih pršuta označeni brojevima 9, 12, 14, 16 i 21). U proizvodnji svih analiziranih pršuta korištene su teške pasmine bijelih svinja iz konvencionalnog sustava uzgoja. Za soljenje su korištene sirove stražnje noge svinja težine najmanje 11 kilograma, bez papaka, ali s uključenim zdjeličnim kostima, kožom i potkožnim masnim tkivom. Postupak soljenja morskom soli odvijao se u rashladnim prostorijama pri temperaturama između 2 i 6 °C te relativnoj vlažnosti iznad 80–90 %, u trajanju od 14 do 20 dana, ovisno o masi. Nakon toga uslijedila je faza prešanja, provedena pod istim klimatskim uvjetima, tijekom 7 do 10 dana, čime su pršuti oblikovani u standardni izgled koji omogućuje učinkovitije prodiranje soli. Po završetku prešanja, pršuti su isprani hladnom vodom, ocijeđeni i zatim obješeni u sušare s precizno reguliranim mikroklimatskim uvjetima (temperatura između 12 i 16 °C, dok je relativna vlažnost postupno smanjena s 90 % na 70 %). U fazi sušenja, koja je trajala do 45 dana, uz strujanje zraka brzinom od 0,3 do 2 m/s, pršuti su podvrgnuti hladnom dimljenju (pri temperaturi nižoj od 22 °C) koristeći dim dobiven izgaranjem tvrdog drva ili piljevine bukve (*Fagus sp.*), hrasta (*Quercus sp.*) i grabovine (*Carpinus sp.*). Nakon dimljenja, pršuti su premješteni u zamračene podrumске prostorije, gdje su sazrijevali na stabilnim temperaturama od 12 do 15 °C i relativnoj vlažnosti između 65 i 75 %. Po završetku zrenja, uzeti su uzorci za analizu. Kod pršuta bez PGI oznake korišten je sličan tehnološki postupak, no bez stroge kontrole svakog koraka, što može rezultirati odstupanjima u odnosu na standardiziranu PGI tehnologiju. Uzorci mišića *biceps femoris* su kodirani, vakuumski pakirani, zamrznuti i čuvani na -18 °C do početka istraživanja. Određivanje antioksidacijske aktivnosti provedeno je pomoću DPPH metode i FRAP metode.

Priprema uzoraka

Uzorci *biceps femoris* dimljenog pršuta homogenizirani su u komercijalnom procesoru hrane. Homogeniziranom uzorku (25 g) dodano je 100 mL 0,01 M HCl, u dvije paralele. Uzorci su zatim homogenizirani u uređaju Stomacher tijekom 8 minuta na 4 °C te ostavljeni preko noći pri istoj temperaturi. Nakon toga, 30 mL svakog uzorka prebačeno je u Falcon epruvete i centrifugirano pri 12 000 g tijekom 20 minuta na 4 °C. Dobiveni supernatant filtriran je kroz staklenu vunu. Proteini su precipitirani dodatkom tri volumena otapala i



Slika 1. Strukture bioaktivnih peptida u pršutima
Figure 1 Structures of bioactive peptides in dry-cured hams

uzorci su ostavljeni 20 minuta na 4 °C. Nakon toga su centrifugirani pri 12 000 g tijekom 10 minuta na 4 °C. Dobiveni supernatant korišten je za daljnja određivanja.

DPPH metoda

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti primijenjena je DPPH metoda. Uzorku (200 µL) dodano je 1000 µL etanola i 250 µL otopine DPPH radikala (0,02 % u etanolu). Smjesa je promiješana i inkubirana 60 minuta na sobnoj temperaturi, na tamnom mjestu, zbog osjetljivosti DPPH radikala na svjetlost. Redukcija DPPH radikala određena je spektrofotometrijski pri 517 nm. U svom radikalnom obliku DPPH pokazuje apsorpcijski maksimum na 517 nm, koji se smanjuje djelovanjem antioksidansa. Snižena apsorbanija ukazuje na veću antioksidacijsku aktivnost uzorka.

Test je proveden u tri paralelna mjerenja.

Postotak inhibicije DPPH radikala (% inhibicije DPPH) izračunat je prema sljedećoj formuli (Bersuder i sur., 1998.):

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = (\text{Apsorbancija kontrole} - \text{Apsorbancija uzorka}) / \text{Apsorbancija kontrole} * 100$$

FRAP metoda

Za određivanje reduktivnog potencijala korištena je FRAP metoda. Uzorak (0,25 mL) pomiješan je s 0,25 mL fosfatnog pufera (200 mM, pH 6,6) i 0,25 mL otopine kalijeva fericijanida (10 mg/mL). Za slijepu probu korištena je destilirana voda (0,25 mL) umjesto uzorka, a za pozitivnu kontrolu 0,25 mL otopine BHT-a (1 mg/mL). Svi uzorci inkubirani su na 50 °C tijekom 20 minuta. Nakon inkubacije dodano je 0,25 mL otopine triklorooctene kiseline (TCA, 100 mg/mL), a smjesa je zatim centrifugirana pri 2500 rpm tijekom 10 minuta. Dobiveni supernatant (0,5 mL) pomiješan je s 0,5 mL destilirane vode i 0,1 mL otopine željezova(III) klorida (1 mg/mL). Smjesa je inkubirana 10 minuta u tami, a zatim je izmjerena apsorbanija pri 700 nm (Huang i sur., 2006.).

Rezultati i rasprava

Bioaktivni peptidi predstavljaju specifične fragmente proteina koji imaju sposobnost povoljno djelovati na ljudsko zdravlje, ponajprije zahvaljujući svojim antioksidativnim svojstvima. Ovi spojevi pomažu u neutralizaciji slobodnih radikala, čime doprinose očuvanju staničnih funkcija i smanjenju rizika od razvoja brojnih bolesti. Hrana boga-

ta proteinima, poput mlijeka, jaja, povrća i mesa, glavni je izvor bioaktivnih peptida koji se oslobađaju tijekom probave ili različitih tehnoloških procesa obrade hrane. Među mesnim proizvodima, pršut se ističe kao vrijedan izvor različitih bioaktivnih tvari. Osim bioaktivnih peptida, pršut sadrži i druge spojeve korisnih svojstava, uključujući kreatin, kreatinin, koenzim Q10, glutation, karnozin, anserin, karnitin, taurin, cistin, cistein te brojne esencijalne amino-kiseline. Ove komponente imaju dokazano antioksidativno i antihipertenzivno djelovanje, što znači da mogu pomoći u smanjenju oksidativnog stresa, regulaciji krvnog tlaka i općenito pridonijeti boljem zdravlju kardiovaskularnog sustava. Zdravstvene koristi konzumacije hrane koja sadrži bioaktivne peptide, uključujući i pršut, obuhvaćaju snižavanje krvnog tlaka i razine kolesterola, sprječavanje nastanka krvnih ugrušaka (antitrombotski učinak), te poboljšanu apsorpciju važnih minerala. Spojevi poput karnozina i glutationa djeluju kao snažni antioksidansi koji štite stanice od oštećenja izazvanih slobodnim radikalima i sprječavaju oksidaciju lipida, čime čuvaju funkcionalnost stanica i tkiva (Marušić i sur., 2013.).

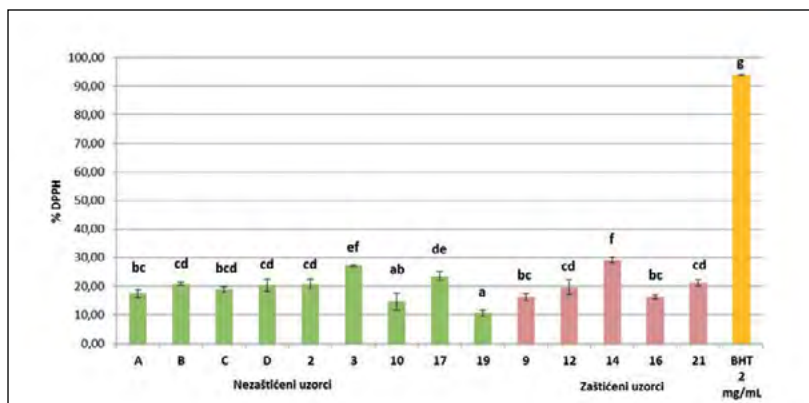
Pršuti su među potrošačima visoko cijenjeni zbog svojih jedinstvenih organoleptičkih svojstava koja se razvijaju tijekom procesa zrenja, a rezultat su složenih biokemijskih reakcija poput proteolize i lipolize. Proteoliza se odvija djelovanjem prirodnih mišićnih enzima – endopeptidaza i egzopeptidaza – koji razgrađuju proteine u manje peptide i slobodne aminokiseline, ključne za konačnu teksturu i okus pršuta (Toldrá i sur., 2000.). Zbog tih procesa, pršuti predstavljaju i vrijedan izvor bioaktivnih peptida s potencijalnim pozitivnim učinkom na zdravlje. Ti su peptidi, najčešće dugi između 2 i 20 aminokiselina, inicijalno neaktivni u strukturi matičnih proteina, a tijekom prerade se oslobađaju djelovanjem endogenih ili egzogenih enzima, čime stječu sposobnost fiziološkog djelovanja (Lafarga i Hayes, 2014.; Udenigwe i Aluko, 2012.).

Znanstvena istraživanja provedena na španjolskim vrstama pršuta identificirala su bioaktivne peptide u vodenim ekstraktima koji su pokazali sposobnost inhibicije angiotenzin I-konvertirajućeg enzima (ACE-I) u *in vitro* uvjetima, dok su neka ispitivanja na modelima s hipertenzijom potvrdila i *in vivo* antihipertenzivno djelovanje (Gallego i sur., 2020.). Nadalje, ekstrakti peptida iz pršuta pokazali su snažnu antioksidacijsku aktivnost, što dodatno potvrđuje njihov potencijal kao funkcionalne komponente

u prehrani (Escudero i sur., 2013.; Xing i sur., 2016.; Zhu i sur., 2013.). Slijedom navedenog, cilj ovog rada bio je ispitati antioksidacijsku aktivnost hrvatskih dimljenih pršuta.

Antioksidativni peptidi mogu imati pozitivan učinak na organizam jer štite stanice od oksidativnog stresa, uzrokovanog djelovanjem slobodnih

radikala i/ili reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), koji su povezani s razvojem brojnih bolesti. Učinkovitost peptida kao antioksidansa, kao i mehanizam njihovog djelovanja, u velikoj mjeri ovise o veličini, sastavu i rasporedu aminokiselina u sekvenci, kao i o njihovoj strukturi i stupnju hidrofobnosti (Gallego i sur., 2020.).



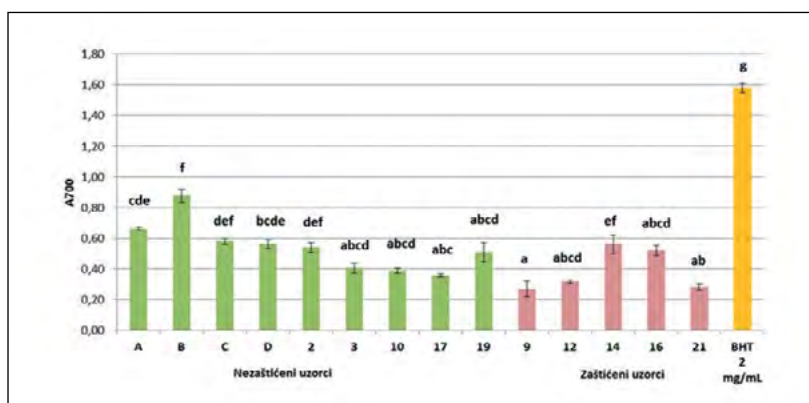
*Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$)
 Different letters indicate statistically significant differences between the obtained values ($p < 0.05$)

Slika 2. Antioksidacijska aktivnost uzoraka nezaštićenih dimljenih i zaštićenih Dalmatinskih pršuta određena DPPH metodom

Figure 2 Antioxidant activity of unprotected smoked and protected Dalmatinski pršut samples determined by the DPPH method

U ovom istraživanju, antioksidacijska aktivnost nezaštićenih dimljenih i zaštićenih Dalmatinskih pršuta određena je dvjema metodama: DPPH (procjena sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala) i FRAP (mjerjenje reducirajuće sposobnosti željeza), kako bi se utvrdio njihov potencijal zaštite od oksidacijskih procesa. Rezultati DPPH metode

prikazani su na Slici 2. Pokazano je da se sposobnost neutralizacije slobodnih radikala među uzorcima kretala u rasponu od $10,54 \pm 1,17$ % do $29,20 \pm 1,04$ %, ovisno o uzorku. Ova metoda temelji se na smanjenju intenziteta ljubičaste boje DPPH otopine, što je posljedica redukcije stabilnih radikala.



*Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između dobivenih vrijednosti ($p < 0,05$)
 Different letters indicate statistically significant differences between the obtained values ($p < 0.05$)

Slika 3. Antioksidacijska aktivnost uzoraka nezaštićenih dimljenih i zaštićenih Dalmatinskih pršuta određena FRAP metodom

Figure 3 Antioxidant activity of unprotected smoked and protected Dalmatinski pršut samples determined by the FRAP method

Za usporedbu, sintetski antioksidans BHT (butilirani hidroksitoluen), često korišten u prehrambenoj industriji, pri koncentraciji od 2 mg/mL pokazao je visoku antioksidacijsku učinkovitost od $93,85 \pm 0,12$ %, što služi kao referentna vrijednost za usporedbu s prirodnim antioksidansima iz pršuta. Iako su vrijednosti kod prirodnih uzoraka niže, njihov učinak i dalje je značajan, osobito s obzirom na prehrambe-

no porijeklo.

Rezultati FRAP metode, prikazani na Slici 3, pokazali su vrijednosti apsorbancije pri 700 nm u rasponu od $0,28 \pm 0,02$ do $0,88 \pm 0,04$. Ova metoda mjeri sposobnost spojeva da reduciraju Fe^{3+} u Fe^{2+} , čime se posredno ocjenjuje antioksidacijska moć uzoraka. Sintetski antioksidans BHT, u istoj koncentraciji, pokazao je višu apsorbanciju ($1,58 \pm 0,03$).

Tablica 1. Antioksidacijska aktivnost zaštićenih i nezaštićenih pršuta

Table 1 Antioxidant activity of protected and unprotected dry-cured ham

	Nezaštićeni/Unprotected	Zaštićeni/Protected	p-vrijednost/ p-value
% DPPH	$19,34 \pm 1,14$	$20,72 \pm 1,70$	0,491
FRAP/ A700	$0,55 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,07$	0,120

Rezultati prikazani u Tablici 1 pokazuju nešto viši kapacitet inhibicije DPPH radikala kod zaštićenih pršuta ($20,72 \pm 1,70$ %) u odnosu na nezaštićene ($19,34 \pm 1,14$ %), no razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,491$). Slično tome, rezultati FRAP testa pokazali su višu redukcijsku sposobnost kod nezaštićenih pršuta ($0,55 \pm 0,04$ A700) u usporedbi sa zaštićenima ($0,43 \pm 0,07$ A700), ali i ta razlika nije bila statistički značajna ($p = 0,120$). Dobiveni rezultati upućuju na to da oznaka zemljopisnog podrijetla kod zaštićenih pršuta nije imala značajan utjecaj na ukupnu antioksidacijsku aktivnost proizvoda.

U kontekstu prethodnih istraživanja posebno se ističe rad Marušić i sur. (2013.) koji su analizirali antioksidacijski potencijal različitih bioaktivnih spojeva u pršutu – uključujući karnozin, anserin, glutatation (u reduciranoj i oksidiranoj formi), koenzim Q10, karnitin, kreatin i kreatinin – pomoću DPPH metode. Rezultati su pokazali da karnozin, kreatinin, reducirani glutatation i anserin imaju izraženu sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, pri čemu se reducirani glutatation posebno istaknuo kao najsnažniji antioksidans. On ima ključnu ulogu u održavanju redoks ravnoteže u stanicama, sudjeluje u detoksikaciji organizma i uklanjanju slobodnih radikala, što je od presudne važnosti za zdravlje stanica. Rezultati ovog rada upućuju na prisutnost spojeva s potencijalno korisnim biološkim djelovanjem u dimljenim pršutima. Međutim, za potpuniju i precizniju procjenu antioksidacijskog potencijala pršuta potrebno je provesti dodatna istraživanja usmjerena na izolaciju i identifikaciju pojedinačnih peptida i drugih bioak-

tivnih komponenti, kako bi se utvrdila njihova specifična antioksidacijska svojstva i doprinos ukupnoj aktivnosti proizvoda.

Zaključak

Rezultati provedenog istraživanja potvrđuju da pršut, osim što je cijenjen zbog svojih organoleptičkih svojstava, sadrži niz bioaktivnih spojeva s dokazanim antioksidativnim i potencijalno korisnim fiziološkim učincima. Iako prirodni uzorci pršuta pokazuju nižu antioksidacijsku aktivnost u usporedbi sa sintetskim antioksidansom BHT-om, njihovo biološko podrijetlo i mogućnost djelovanja u organizmu bez štetnih posljedica čine ih vrijednim izvorom prirodnih antioksidansa. Metode korištene u ispitivanju – DPPH i FRAP – pokazale su da postoji razlika u antioksidacijskom potencijalu između različitih uzoraka pršuta, što ukazuje na potrebu za daljnjom analizom. Iako su postignuti rezultati obećavajući, za dublje razumijevanje i potpunu valorizaciju zdravstvenog učinka bioaktivnih peptida u pršutu potrebna su dodatna istraživanja, posebno ona koja bi se usredotočila na djelovanje pojedinačnih peptida u biološkim sustavima.

U konačnici, pršut se može smatrati namirnicom koja, osim nutritivne vrijednosti, ima i funkcionalna svojstva, čime se otvara prostor za njegovu primjenu u kontekstu funkcionalne hrane s potencijalno povoljnim učinkom na ljudsko zdravlje.

References

- [1] Alugoju P., B. D. Jestadi, L. Periyasamy (2014): Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem*, 30 (2014), 11–26 <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- [2] Arihara K., Y. Nakashima, T. Mukai, S. Ishikawa, M. Itoh (2001): Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci*, 57 (2001), 319–324 [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00108-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00108-X)
- [3] Bersuder, P., M. Hole, G. Smith (1998): Antioxidants from heated histidine-glucose model system. I. Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high performance liquid chromatography. *J Am Oil Chem. Soc*, 75 (1998), 181–187 <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0030-y>
- [4] Di Bernardini R, P. Harnedy, D. Bolton, J. Kerry, E. O'Neill, A. M. Mullen, M. Hayes (2011): Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chem*, 124 (2011), 1296–1307 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.004>
- [5] Escudero, E., F. Toldra, M. A. Sentandreu, H. Nishimura, K. Arihara (2012): Antihypertensive activity of peptides identified in the in vitro gastrointestinal digest of pork meat. *Meat Sci*, 91 (2012), 382–384 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.007>
- [6] Escudero, E., L. Mora, P. D., Fraser, M. C. Aristoy, F. Toldrá (2013): Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Food Chem*, 138(2–3) (2013), 1282–1288. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.133>.
- [7] Gallego, M., L. Mora, M. Hayes, , M. Reig, F. Toldrá, (2017): Effect of cooking and in vitro digestion on the antioxidant activity of dry-cured ham by-products. *Food Res Int*, 97 (2017) 296–306 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.027>
- [8] Gallego, M., L. Mauri, M.C. Aristoy, F. Toldrá, L. Mora (2020): Antioxidant peptides profile in dry-cured ham as affected by gastrointestinal digestion, *J Funct Foods*, 69 (2020), 103956, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103956>.
- [9] George J., D. Edwards, S. Pun, D. Williams (2022): Evaluation of Antioxidant Capacity (ABTS and CUPRAC) and Total Phenolic Content (Folin-Ciocalteu) Assays of Selected Fruit, Vegetables, and Spices. *Int J Food Sci*, 48 (2022), 1–18 <https://doi.org/10.1155/2022/2581470>
- [10] Gu, L., M. Zhao, W. Li, L. You, J. Wang, H. Wang, J. Ren (2012): Chemical and cellular antioxidant activity of two novel peptides designed based on glutathione structure. *Food Chem Toxicol*, 50 (2012), 4085–4091 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.028>
- [11] Gutteridge, J.M.C.; B. Halliwell (1996): Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford University Press, New York, USA, 90–96.
- [12] Huang, S.J., S. Y. Tsai, J. L. Mau (2006): Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agrocybe cylandrea*. *LWT* 39 (2006), 378–386 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.02.012>
- [13] Jang A., M. Lee (2005): Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Sci*, 69 (2005), 653–661 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.10.014>
- [14] Kim S. K, I. Wijesekara (2010): Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. *J Funct Foods*, 2 (2010), 1–9 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003>
- [15] Lafarga, T., M. Hayes (2014): Bioactive peptides from meat muscle and by-products: Generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Sci*, 98(2) (2014), 227–239. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.036>.
- [16] Marušić, N., C. M. Aristoy, F. Toldrá (2013): Nutritional pork meat compounds as affected by ham dry-curing. *Meat sci*, 93 (2013), 53–60 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.07.014>
- [17] Montoro-García, S., M.P. Zafrilla-Rentero, F.M. Celdrán-de Haro, J.J. Piñero-de Armas, F. Toldrá, L. Tejada-Portero, J. Abellán-Alemán (2017): Effects of dry-cured ham rich in bioactive peptides on cardiovascular health: A randomized controlled trial. *J Funct Foods*, 38 (2017), 160–167 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.012>
- [18] Mora, L., M. C. Aristoy, F. Toldrá (2019): Bioactive Peptides. Reference Module in Food Science. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22397-4>
- [19] Ryan, J., T., R. P. Ross, D. Bolton, G. F. Fitzgerald, C. Stanton (2011): Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 3 (2011), 765–791 <https://doi.org/10.3390/nu3090765>
- [20] Ryder, K., A. E. D. Bekhit, M. McConnell, A. Carne (2016): Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: generation of peptides using commercial microbial proteases. *Food Chemistry*, 208 (2018), 42–50 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.121>
- [21] Toldrá, F., M. C. Aristoy, M. Flores (2000): Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Res Int*, 33(3–4) (2000), 181–185. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00032-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00032-6).
- [22] Tomić, M., A. Segarić, L. Kozačinski, B. Njari, J. Pleadin, D. Alagić, Ž. Cvrtić Fleck (2016): Kakvoća pršuta. *Meso*, 18 (2016) 241–246
- [23] Udenigwe, C. C., R. E. Aluko (2012): Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *J Food Sci*, 77(1) (2012), R11–R24. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>.
- [24] Žarković, N., I. Lončarić, A. Čipak, G. Jurić, W. Wonisch, S. Borović, G. Waeg, T. Vuković, K. Tarković (2001): Patofiziološke značajke sekundarnih glasnika slobodnih radikala i oksidativni stres. Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa. Priručnik Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet i Hrvatsko društvo farmakologa, Medicinska naklada, Zagreb, 13–32.
- [25] Xing, L. J., Y. Y. Hu, H. Y. Hu, Q. F. Ge, G. H. Zhou, W. G. Zhang (2016): Purification and identification of antioxidative peptides from dry-cured Xuanwei ham. *Food Chem*, 194 (2016), 951–958. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.101>.
- [26] Zhu, C. Z., W. G. Zhang, Z. L. Kang, G. H. Zhou, X. L. Xu (2014): Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua jam. *Meat Sci*, 96 (2014), 783–789. doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.004.

Determination of the antioxidant potential of smoked prosciutto in relation to geographical origin status

Abstract

The aim of this study was to determine the antioxidant activity of smoked dry-cured ham samples, including both unprotected smoked hams and certified Dalmatian hams with a Protected Geographical Indication (PGI). Dry-cured ham is a traditional product whose nutritional and sensory value is based on a complex process of drying and ripening, and it is increasingly recognized as a source of bioactive compounds with potentially beneficial physiological effects. The assessment of antioxidant activity in dry-cured hams can be useful not only for understanding their functional properties but also as an additional parameter for product valorization. The antioxidant properties of dry-cured ham are primarily attributed to the presence of bioactive peptides formed during proteolysis of muscle proteins. These compounds may help reduce oxidative stress and potentially lower the risk of developing degenerative diseases. In total, 14 ham samples were analyzed, including 9 unprotected and 5 PGI-certified products. Antioxidant activity was measured in the biceps femoris muscle using two complementary analytical methods – DPPH and FRAP – each based on different mechanisms of free radical interaction. The DPPH method showed that the radical scavenging capacity ranged from $10.54 \pm 1.17\%$ to $29.20 \pm 1.04\%$. Using the FRAP method, which measures the reducing power of the sample, absorbance values ranged from 0.28 ± 0.02 to 0.88 ± 0.04 at a wavelength of 700 nm. The results indicate a notable antioxidant potential in the ham extracts. Although their activity is lower compared to synthetic antioxidants, the natural origin of these compounds and their possible biological effectiveness without harmful side effects make dry-cured ham a valuable source of natural antioxidants. This study highlights the need for further investigations to fully evaluate the functional potential of these traditional products.

Keywords: Dalmatian dry-cured ham, bioactive peptides, antioxidant activity, DPPH, FRAP

Bestimmung des antioxidativen Potenzials von geräuchertem Rohschinken in Abhängigkeit vom geografischen Herkunftstatus

Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, die antioxidative Aktivität von geräucherten Rohschinkenproben zu bestimmen, darunter sowohl ungeschützte Rohschinken als auch zertifizierte dalmatinische Schinken mit geschützter geografischer Angabe (g.g.A.). Geräucherter Rohschinken ist ein traditionelles Produkt, dessen Nährwert und sensorischer Wert auf einem komplexen Trocknungs- und Reifungsprozess beruht und das zunehmend als Quelle bioaktiver Verbindungen mit potenziell positiven physiologischen Wirkungen anerkannt wird. Die Bewertung der antioxidativen Aktivität von geräuchertem Rohschinken kann nicht nur für das Verständnis seiner funktionellen Eigenschaften nützlich sein, sondern auch als zusätzlicher Parameter für die Aufwertung des Produkts. Die antioxidativen Eigenschaften von geräuchertem Rohschinken werden in erster Linie auf das Vorhandensein bioaktiver Peptide zurückgeführt, die bei der Proteolyse von Muskelproteinen entstehen. Diese Verbindungen können dazu beitragen, den oxidativen Stress zu verringern und das Risiko der Entstehung degenerativer Krankheiten zu senken. Insgesamt wurden 14 Schinkenproben analysiert, darunter 9 ungeschützte und 5 IGP-zertifizierte Produkte. Die antioxidative Aktivität wurde im Muskel Biceps femoris mit zwei komplementären Analysemethoden - DPPH und FRAP - gemessen, die jeweils auf unterschiedlichen Mechanismen der Interaktion mit freien Radikalen beruhen. Die DPPH-Methode zeigte, dass die Radikalfängerkapazität zwischen $10,54 \pm 1,17\%$ und $29,20 \pm 1,04\%$ lag. Bei Anwendung der FRAP-Methode, die die Reduktionskraft der Probe misst, lagen die Absorption-

swerte zwischen $0,28 \pm 0,02$ und $0,88 \pm 0,04$ bei einer Wellenlänge von 700 nm. Die Ergebnisse deuten auf ein beachtliches antioxidatives Potenzial der Schinkenextrakte hin. Obwohl ihre Aktivität im Vergleich zu synthetischen Antioxidantien geringer ist, machen der natürliche Ursprung dieser Verbindungen und ihre mögliche biologische Wirksamkeit ohne schädliche Nebenwirkungen den geräucherten Rohschinken zu einer wertvollen Quelle für natürliche Antioxidantien. Diese Studie unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen, um das funktionelle Potenzial dieser traditionellen Produkte vollständig zu bewerten.

Schlüsselwörter: Dalmatinischer geräucherter Rohschinken, bioaktive Peptide, antioxidative Aktivität, DPPH, FRAP

Determinación del potencial antioxidante de jamones curados ahumados en función del estatus de indicación geográfica

Resumen

El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antioxidante en muestras de jamones curados ahumados, incluyendo jamones sin protección geográfica y jamones dalmatas con indicación geográfica protegida (IGP). El jamón curado es un producto cárnico tradicional cuyo valor nutricional y sensorial se basa en un complejo proceso de secado y maduración, y cada vez se reconoce más como fuente de compuestos bioactivos con posibles efectos fisiológicos beneficiosos. La evaluación de la actividad antioxidante en jamones puede ser útil no sólo para comprender sus propiedades funcionales, sino también como un parámetro adicional en la valorización del producto. Las propiedades antioxidantes del jamón se asocian principalmente con la presencia de péptidos bioactivos, generados durante la proteólisis de las proteínas musculares. Estos compuestos pueden contribuir a la reducción del estrés oxidativo y potencialmente disminuir el riesgo de enfermedades degenerativas. En el estudio se analizaron un total de 14 muestras de jamón curado: 9 sin IGP y 5 con IGP. La actividad antioxidante se determinó en el músculo Biceps femoris utilizando dos métodos analíticos diferentes: DPPH y FRAP, basados en distintos mecanismos de acción de los radicales libres. Con el método DPPH, la capacidad de neutralización de radicales libres osciló entre el $10,54 \pm 1,17\%$ y el $29,20 \pm 1,04\%$. Con el método FRAP, que mide la capacidad reductora, se obtuvieron valores de absorbancia entre $0,28 \pm 0,02$ y $0,88 \pm 0,04$ a una longitud de onda de 700 nm. Los resultados obtenidos indican la presencia de un notable potencial antioxidante en los extractos de jamón curado. Aunque inferior al de antioxidantes sintéticos, los compuestos naturales presentes en el jamón representan una fuente valiosa de antioxidantes. La investigación confirma la necesidad de realizar análisis adicionales para valorar plenamente el potencial funcional de estos productos tradicionales.

Palabras claves: jamón dalmata, péptidos bioactivos, actividad antioxidante, DPPH, FRAP

Determinazione del potenziale antiossidante dei prosciutti affumicati rispetto all'origine geografica

Riassunto

Questo studio è stato condotto con l'obiettivo di determinare l'attività antiossidante dei campioni di prosciutti affumicati, compresi prosciutti non protetti e prosciutti di Dalmazia (Dalmatinski pršut) con denominazione di origine protetta (DOP). Il prosciutto è un prodotto tradizionale di salumeria la cui qualità nutrizionale e sensoriale si basa su un complesso processo di asciugatura e stagionatura, ed è sempre più riconosciuto come fonte di composti bioattivi con potenziali effetti fisiologici benefici. La valutazio-

ne dell'attività antiossidante nei prosciutti può essere utile non solo per comprendere le loro proprietà funzionali, ma anche come parametro aggiuntivo per la valorizzazione del prodotto. Le proprietà antiossidanti del prosciutto sono principalmente associate alla presenza di peptidi bioattivi generati durante la proteolisi delle proteine muscolari. Questi composti possono contribuire a ridurre lo stress ossidativo e possono potenzialmente diminuire il rischio di sviluppo di malattie degenerative. Nel presente studio sono stati analizzati in totale 14 campioni di prosciutto, di cui 9 non protetti e 5 protetti. L'attività antiossidante è stata determinata nel muscolo bicipite femorale (biceps femoris) mediante due diversi metodi analitici – DPPH e FRAP – basate su differenti meccanismi di azione dei radicali liberi. Con il metodo DPPH è stato rilevato che la capacità di neutralizzare i radicali liberi variava tra il $10,54 \pm 1,17\%$ e il $29,20 \pm 1,04\%$. Con il metodo FRAP, che misura il potere riducente, sono stati ottenuti valori di assorbanza compresi tra $0,28 \pm 0,02$ e $0,88 \pm 0,04$ a una lunghezza d'onda di 700 nm. I risultati ottenuti indicano la presenza di un marcato potenziale antiossidante negli estratti di prosciutto. Sebbene inferiore rispetto agli antiossidanti sintetici, i composti naturali presenti nel prosciutto rappresentano una preziosa fonte di antiossidanti. La ricerca conferma la necessità di ulteriori analisi al fine di valorizzare appieno il potenziale funzionale di questi prodotti tradizionali.

Parole chiave: Prosciutto di Dalmazia, peptidi bioattivi, attività antiossidante, DPPH, FRAP