Kriprotektorsko djelovanje ß-glukana na miofibrilarne proteine govođeg mesa

Vidaković, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:804847

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Kristina Vidaković

KRIOPROTEKTORSKO DJELOVANJE β-GLUKANA NA MIOFIBRILARNE PROTEINE GOVEĐEG MESA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za tehnologiju mesa i ribe
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnologija mesa i ribe
Tema rada je prihvaćena na VIII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 23. 4. 2015.
Mentor: *Krešimir Mastanjević*, doc. dr. sc.
Pomoć pri izradi:

KRIOPROTEKTORSKO DJELOVANJE β-GLUKANA NA MIOFIBRILARNE PROTEINE GOVEDINE

Kristina Vidaković, 237-DI

Sažetak: U ovom radu pomoću diferencijalne motridbene kalorimetrije (DSC) istraživalo se krioprotektorsko djelovanje β-glukana (w = 0 – 6%) na miofibrilarne proteine uzoraka goveđeg mesa nakon jednomjesečnog skladištenja na -30 °C. Također, odredio se utjecaj dodatka β-glukana (*w* = 0 – 6%) na parametre profila teksture, instrumentalno određene boje i kalo kuhanja uzoraka goveđeg mesa nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju (-30 °C). Uzorci miofibrilarnih proteina su pripremljeni od goveđeg mesa (uglavnom lat. *musculus psoas major*), pomiješani s β-glukanom (*w* = 0 – 6 %), brzo zamrznuti i skladišteni tijekom 30 dana pri -30 °C. Temperature i entalpije denaturacije miofibrilarnih proteina uzoraka goveđeg mesa određene su iz DSC termograma. Povećanjem masenog udjela β-glukana (*w* = 0 - 6%), temperature i entalpije denaturacije su se statistički značajno (P<0,05) povećale. Dodatak β-glukana (*w* = 0 - 6%), je statistički značajno (P<0,05) utjecao i na parametre instumentalno određene boje (svjetlina (L*), crveno (a*), žuto (b*) i bijelina (L – 3b*)). Parametri profila teksture, tvrdoća i otpor žvakanju, su se statistički značajno (P<0,05) povećali dok se gubitak pri kuhanju statistički značajno smanjio (P<0,05) dodatkom β-glukana (*w* = 0 – 6%), dok kohezivnost i elastičnost goveđih miofibrilarnih gelova nisu pokazale statistički značajnu (P>0,05) ovisnost o dodatku β-glukana (*w* = 0 – 6%). Pomak temperature denaturacije prema višim vrijednostima i povećanje entalpije denaturacije te povećanje vrijednosti nekih parametara teksture i instrumentalno određene boje ukazuju na moguće krioprotektorsko djelovanje β-glukana na miofibrilarne proteine goveđeg mesa.

Ključne riječi: DSC, zamrzavanje, krioprotekcija, miofibrilarni proteini goveđeg mesa, β-glukan

Rad sadrži: 51 stranica
18 slika
7 tablica
0 priloga
22 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	dr. sc. *Dragan Kovačević,* red. prof.	predsjednik
2.	dr. sc. *Krešimir Mastanjević,* doc.	član-mentor
3.	dr. sc. *Marko Jukić,* izv. prof.	član
4.	dr. sc. *Daliborka Koceva Komlenić,* izv. prof.	zamjena člana

Datum obrane: 17. srpnja, 2015.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food technologies
Subdepartment of Technology of Meat and Fish
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Technology of Meat and Fish
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. VIII. held on April 23, 2015.
Mentor: *Krešimir Mastanjević*, doc. dr. sc.
Technical assistance:

CRYOPROTECTIVE EFFECT OF β-GLUCANS ON BEEF MYOFIBRLLAR PROTEINS

*Kristina Vidaković,*237-DI

Summary: Cryoprotective effects of β-glucans (w = 0 – 6%) on beef myofibrillar proteins after frozen storage were investigated by the use of Differential scanning calorimetry (DSC). Also influence of frozen storage on texture profile analysis (TPA) parameters, instrumental colour parameters and cooking loss of beef myofibrillar proteins were investigated. Beef myofibrillar proteins samples were prepared from beef meat (mainly lat. *musculus psoas major*), mixed with β-glucans (*w* = 0 – 6 %), quickly frozen and stored for 30 days on -30 °C. Onset temperature of transition (T_o), peak thermal transition (T_p), and endset temperature of transition (T_e), and denaturation enthalpy (ΔH), were evaluated by DSC thermograms. Peak (T_p) thermal transition temperatures and denaturation enthalpies (ΔH) of beef myofibrillar proteins showed significant ($P<0.05$) shift to higher values with the increase of mass fraction of β-glucans. Instrumental colour parameters (lightness (L*), redness (a*), yellowness (b*) and whiteness (L* – 3b*) of beef myofibrillar proteins were significantly ($P<0.05$) affected by addition oat β-glucans. Hardness, gumminess and chewiness increased significantly ($P<0.05$) and cooking loss decreased significantly ($P<0.05$) by addition of β-glucans. Cohesiveness and springiness of beef myofibrillar gels were not significantly ($p > 0.05$) affected by addition of oat β-glucans. Increase in peak thermal transition (T_p), denaturation enthalpies (ΔH), some TPA and instrumental colour parameters indicates possible cryostabilsation effect of β-glucans on beef myofibrillar proteins.

Key words: freezing, cryoprotection, beef myofibrillar proteins, DSC, β-glucan

Thesis contains: 51 pages
18 figures
7 tables
0 supplements
22 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Dragan Kovačević*, PhD, full prof. — chair person
2. *Krešimir Mastanjević*, PhD, assistant prof. — supervisor
3. *Marko Jukić*, PhD, associate prof. — member
4. *Daliborka Koceva Komljenić*, PhD, associate prof. — stand-in

Defense date: July 17, 2015.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Krešimiru Mastanjeviću na susretljivosti, savjetima, uloženom trudu i pomoći oko izrade cjelokupnog diplomskog rada.

Iskreno hvala mojim roditeljima koji su mi prvenstveno omogućili studiranje, te bili potpora u svakom trenutku, dobrom ili lošem. Zahvaljujem prijateljima koji su me savjetovali, podržavali ili pomogli na bilo koji drugi način.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. KONZERVIRANJE MESA ZAMRZAVANJEM 4

2.1.1. Postupci zamrzavanja mesa 4

2.1.2. Utjecaj brzine zamrzavanja na kvalitetu smrznutog mesa 5

2.2. KRIOPROTEKCIJA MIOFIBRILARNIH PROTEINA 6

2.2.1. Miofibrilarni proteini mesa 6

2.2.2. Mehanizam krioprotekcije miofibrilarnih proteina 6

2.2.3. Krioprotektori 7

2.3. B-GLUKANI 8

2.3.1. β-glukan iz zobi 9

2.4. DIFERENCIJALNA MOTRIDBENA KALORIMETRIJA (DSC) 11

2.4.1. DSC toplinskog toka (*eng. Heat-flux DSC*) 12

2.4.2. DSC kompenziranog toplinskog toka (*eng. Power compensation DSC)* 14

2.4.3. Primjena diferencijalne motridbene kalorimetrije (DSC) u analizi proteina 16

2.4.4. Primjena diferencijalne motridbene kalorimetrije (DSC) za određivanje krioprotektorske djelotvornosti zamrznute hrane 16

3. EKSPERIMENTALNI DIO 19

3.1. ZADATAK RADA 20

3.2. MATERIJAL I METODE 20

3.2.1. Priprema uzoraka goveđeg mesa 20

3.2.2. Određivanje a_w, pH i osnovnog kemijskog sastava uzoraka goveđeg mesa 23

3.2.3. Određivanje kala kuhanja 24

3.2.4. Određivanje profila teksture 24

3.2.5. Određivanje koordinata boje u CIE-*L*a*b** sustavu 26

3.2.6. Određivanje temperatura i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina uzoraka goveđeg mesa metodom diferencijalne motridbene kalorimetrije 27

3.2.6.1 Provedba mjerenja 29

3.2.6.2 Određivanje temperatura i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina uzoraka goveđeg mesa 29

3.2.7. Statistička obrada rezultata 31

4. REZULTATI 33

5. RASPRAVA 43

6. ZAKLJUČCI 47

7. LITERATURA 49

Popis oznaka, kratica i simbola

a_w	aktivitet vode
DSC	diferencijalna motridbena kalorimetrija
DTA	diferencijalna termička analiza
SpVV	sposobnost vezivanja vode
T_e	završna temperatura denaturacije
T_o	početna temperatura denaturacije
T_p	temperatura denaturacije
w	maseni udio
ΔH	entalpija denaturacije
ΔH_a	entalpija denaturacije aktina
ΔH_m	entalpija denaturacije miozina

1. UVOD

Zamrzavanje i skladištenje u smrznutom stanju je danas u svijetu jedna od najčešćih metoda konzerviranja hrane kojom se gotovo na neodređeno vrijeme, može održati mikrobiološka i biokemijska stabilnost hrane. Zamrzavanje uzrokuje određene više ili manje ireverzibilne promjene u hrani, koje su izravna ili neizravna posljedica tvorbe leda i u funkciji su brzine zamrzavanja, što je zamrzavanje brže to su te promjene manje i obrnuto.

Jedna od najznačajnijih promjena je denaturacija proteina mesa do koje dolazi nakon gubitka vode (zbog stvaranja kristala leda) iz stanične strukture koja je do tada služila kao svojevrsna mehanička barijera između proteinskih lanaca. Najpodložniji denaturaciji tijekom zamrzavanja i skladištenja u smrznutom stanju su miofibrilarni proteini mesa.

Radi sprečavanja denaturacije i očuvanja sposobnosti želiranja miofibrilarnih proteina tijekom zamrzavanja i skladištenja u smrznutom stanju mesa i ribe, najčešće se dodaju različiti krioprotektori. Krioprotektori su tvari koje u hrani povećavaju maseni udio vezane (nesmrzljive) vode koja pri komercijalnim temperaturama zamrzavanja služi kao mehanička barijera i sprječava koagulaciju funkcionalnih proteina.

β-glukani su sastavljeni od molekula glukoze, koje mogu biti povezane β-(1,3), (1,4) i (1,6) glikozidnom vezom. (1,3), (1,4)- β-D-glukani se najčešće izoliraju iz žitarica, ječma i zobi.

Istraživanja su pokazala da je dodatak β-glukana iz ječma mesnom tijestu uzrokovao povećanje entalpije denaturacije miofibrilanih proteina mesa, što se može značiti da β-glukani ulaze u interakcije s proteinima mesa, dodatno ih hidratiziraju i stabiliziraju (Morin i sur. 2004).

Cilj ovog rada bio je istražiti krioprotektorsko djelovanje β-glukana iz zobi, koja je od svih žitarica najbogatiji izvor ovog dugolančanog polisaharida (4,6 – 4,9%), na miofibrilarne proteine uzoraka goveđeg mesa tijekom jednomjesečnog skladištenja u smrznutom stanju.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KONZERVIRANJE MESA ZAMRZAVANJEM

Zamrzavanje je fizikalna metoda konzerviranja hrane, odnosno proces u kojem se primjenom niskih temperatura stvaraju nepovoljni uvjeti za rast i razmnožavanje mikroorganizama (Herrera i Mackie, 2004.).

Zamrzavanjem se, pod određenim uvjetima, za razliku od hlađenja, mogu konzervirati različite namirnice na duži period, praktički neograničeno (Lovrić, 2003.). Konzerviranje zamrzavanjem temelji se na dva osnovna principa:

- sniženju temperature hrane, pri čemu se svakim sniženjem temperature od 10 °C degradabilni procesi razgradnje hrane uspore 2 – 3 puta,
- kristalizaciji i izdvajanju kemijski čiste vode, što rezultira koncentriranjem intra- i ekstracelularne tekućine, smanjenjem a_w hrane, blagim sniženjem pH, inhibicijom enzimatskih reakcija i razvitka mikroorganizama (Mastanjević, 2010.).

Zamrzavanje sprječava mikrobiološko kvarenje i usporava kemijske i biokemijske promjene koje narušavaju kvalitetu hrane. Unatoč tome neprikladno skladištenje hrane u smrznutom stanju i neprilagođeni uvjeti skladištenja mogu utjecati na strukturu proteina i rezultirati narušavanjem kvalitete krajnjeg proizvoda (Herrera i Mackie, 2004.).

2.1.1. Postupci zamrzavanja mesa

Postupke zamrzavanja mesa prema brzini provedbe procesa dijelimo na sporo zamrzavanje kod kojeg je brzina kretanja zone leda 0,1 – 0,2 cm h^{-1}, brzo zamrzavanje kod kojeg je brzina kretanja zone leda 0,5 – 3 cm h^{-1}, te vrlo brzo zamrzavanje kod kojeg je brzina kretanja zone leda 5 – 10 i više cm h^{-1}.

Optimalna brzina za zamrzavanje mesa je veća od 0,5 cm h^{-1}. Brzina zamrzavanja ovisi o pokretnoj sili koja je rezultat razlike temperature proizvoda i temperature rashladnog uređaja, otporu prijenosu topline koji je rezultat sastava odnosno svojstava proizvoda, njegovih dimenzija, brzine strujanja rashladnog medija, stupnja kontakta između rashladnog medija i proizvoda itd. (Mastanjević, 2010.).

Također postupke zamrzavanja možemo podijeliti i prema načinu odvođenja topline na:

- zamrzavanje strujom rashladnog zraka,
- zamrzavanje kontaktom s hlađenim (metalnim) površinama i
- zamrzavanje imerzijom (uranjanjem) i raspršivanjem.

2.1.2. Utjecaj brzine zamrzavanja na kvalitetu smrznutog mesa

Brzina zamrzavanja bitno utječe na kvalitetu smrznutog mesa. Tijekom zamrzavanja mesa, neovisno o brzini zamrzavanja, zbog manje koncentracije otopljenih tvari prvo kristalizira ekstracelularna tekućina, a to uzrokuje i njeno koncentriranje, te povećanje osmotskog tlaka zbog čega stanična tekućina difundira izvan stanice i doprinosi rastu ekstracelularnih kristala leda. Gubitak vode iz stanične strukture koja u normalnim uvjetima djeluje kao svojevrsna mehanička barijera između proteinskih lanaca, uzrokuje spontane interakcije proteina koje rezultiraju koagulacijom (denaturacijom) (Mastanjević, 2010.).

Ako meso izlažemo postupku brzog zamrzavanja, nastaje veliki broj nukleusa kristalizacije raspoređenih podjednako intra- i ekstracelularno. Daljnjim sniženjem temperature iz nukleusa nastaje veliki broj malih kristala leda koji u odnosu na velike manje oštećuju stanične membrane, odnosno mišićno tkivo. Mali kristali leda više reflektiraju svjetlost od velikih zbog čega je smrznuto meso svjetlije od mesa izloženog postupku sporog zamrzavanja pri kojem nastaju veliki kristali leda. Ako meso izlažemo sporom postupku zamrzavanja, nastaje mali broj nukleusa rekristalizacije i to uglavnom ekstracelularno. Izdvajanje kemijski čiste vode u obliku kristala leda uzrokuje koncentriranje ekstracelularne tekućine i povećanje osmotskog tlaka zbog čega tekućina difundira van stanice i doprinosi rastu ekstracelularnih kristala leda. Veliki kristali leda značajno mehanički oštećuju stanične membrane i mišićno tkivo općenito, te se voda tijekom odmrzavanja uglavnom ne vraća i ne ugrađuje u stanične strukture. Ireverzibilni gubitak vode iz staničnih struktura rezultira koagulacijom (denaturacijom) proteina. Sa stajalište prehrambene tehnologije interes je provesti brzi postupak zamrzavanja, kojim nastaju ravnomjerno intra- i ekstracelularni raspoređeni mali kristali leda, što je pretpostavka manjih mehaničkih oštećenja tkiva kristalima (Mastanjević, 2010.).

2.2. KRIOPROTEKCIJA MIOFIBRILARNIH PROTEINA

2.2.1. Miofibrilarni proteini mesa

Maseni udjeli osnovnih gradivnih tvari mesa životinja za klanje, peradi i divljači kreću se u sljedećim rasponima: *w* (vode) = 65 – 75%, *w* (proteina) = 16 – 20%, *w* (masti) = 3 – 30%, *w* (ekstrativnih tvari s dušikom) = 1 – 2%. Proteine odnosno mišićne proteine najopćenitije možemo podijeliti na mišićne proteine topljive u vodi i slabim otopinama soli (sarkoplazmatski), mišićne proteine topljive u otopinama soli (miofibrilarni) i mišićne proteine netopljive u vodi i otopinama soli (vezivnotkivni ili proteini strome) (Mastanjević, 2010.).

Miozin i aktin su najznačajniji miofibrilarni proteini mesa. Miozin je najzastupljeniji (50 – 55% miofibrilarnih proteina) strukturni miofibrilarni protein mišića. Miozin je fibrilarni protein α-keratinskog tipa izgrađen po principu α- heliks uzvojnice. Čine ga štapići (*d* = 140 nm; 2*r* = 2 nm) koji imaju globularno spljoštenu glavu. Svaka molekula miozina se sastoji od dvije identične jedinice. Svaka jedinica se sastoji od repa, vrata i glave. U predjelu repa molekula miozina nalazi se veliki broj kiselih i lužnatih aminokiselinskih ostataka što rezultira velikim brojem pozitivnih i negativnih naboja, te zbog toga rep molekule miozina ima veliku sposobnost vezivanja vode (SpVV) u mišiću (75 – 90% od ukupno vezane vode u mišićnom tkivu). Od velikog fiziološkog značaja je i činjenica da miozin nije samo strukturni protein već ima i svojstva enzima za što je odgovorna glava miozina (oslobađanje energije za kontrakciju mišića). Aktin je drugi najvažniji „kontraktilni“ protein miofibrila. To je ujedno i protein koji je poslije miozina najviše prisutan u mišićnom tkivu i to u količini od 11 do 17%. Aktin sadrži veliki udio prolina i nepolarnih aminokiselina što rezultira malim brojem slobodnih bočnih naboja, odnosno malom SpVV (Mastanjević, 2010.).

2.2.2. Mehanizam krioprotekcije miofibrilarnih proteina

Krioprotektorsko djelovanje tvari pripisuje se funkcionalnim hidroksilnim i karboksilnim grupama sposobnim za stvaranje vodikovih mostova s dipolnim molekulama vode i sa disociranim grupama aminokiselinskih ostataka, čime se sprječava proces dehidratacije proteina, intramolekularne reakcije „oslobođenih“ funkcionalnih skupina i stvaranje

nepoželjnih sekundarnih produkata (koagulacija). Migracija vode iz okoline proteinske molekule je usporena ili potpuno zaustavljena, smanjena je površinska napetost vode, zbog čega se usporava rast i ograničava veličina kristala leda, sprječava se prekomjerno koncentriranje otopine, a time i povećanje aktiviteta otopljene tvari (Čunko, 2004.). Predloženi su brojni mehanizmi kojima se objašnjavaju promjene uzrokovane zamrzavanjem i krioprotekcija. Pretpostavlja se da do štetnih promjena, koje su posljedica zamrzavanja dolazi zbog toga što su netopljive komponente neadekvatno zaštićene od vode. Vezana voda je vrlo značajna za cjelovitost stanica, posebno za strukturu i funkcije proteina. Morfološke promjene stanica tijekom zamrzavanja i kristalizacije upućuju na to da su stanične membrane očuvane tijekom sporog zamrzavanja zbog povećanja stabilnosti mrežaste strukture. Oštećenja pri zamrzavanju rezultat su ekstrakcije vezane vode iz važnih staničnih struktura. Ekstrahirana voda koja se veže na rastuće kristale leda uzrokuje dehidrataciju i denaturaciju proteina. Tijekom brzog zamrzavanja kristali leda smješteni intracelularno ne vežu samo slobodnu vodu već i vezanu i na taj način slabe mrežastu strukturu (Herrera i Mackie, 2004.; Xiong, 1997.).

2.2.3. Krioprotektori

Kako bi se spriječila denaturacija i očuvala sposobnost želiranja miofibrilarnih proteina tijekom zamrzavanja i skladištenja mesa i ribe u smrznutom stanju, najčešće se dodaju različiti krioprotektori (Mastanjević, 2010.). Krioprotektori imaju ulogu posrednika pri vezanju vode za proteine i time povećavaju maseni udio vezane (nesmrzljive) vode. Ta voda pri uobičajeno korištenim temperaturama smrzavanja djeluje kao mehanička barijera između lanaca miofibrilarnih proteina i sprječava koagulaciju. Jedan dio krioprotektorskih molekula se otapa jer ima sličnu površinsku napetost onoj na granici vode i leda i tada služi kao nukleus (jezgra) kristalizacije i doprinosi stvaranju velikog broja malih kristala leda. Oni ne uzrokuju značajnija mehanička oštećenja proteina, te je na taj način očuvana kompaktnost i kohezivnost gela proteina. Mnoštvo tvari je bilo testirano sa svrhom da zaštiti proteine mišićnog tkiva od denaturacije i tako poboljšaju tehnološke karakteristike smrznutog mišićnog tkiva. Tvari kao ugljikohidrati, šećerni alkoholi i neke aminokiseline pokazale su visoku krioprotektivnu učinkovitost (Herrera i Mackie, 2004.). Smatra se da su ugljikohidrati najučinkovitiji krioprotektori za miofibrilarne proteine, međutim primjena

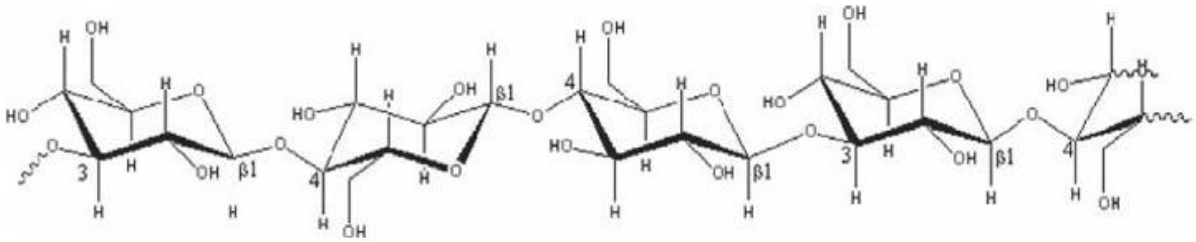
im je ograničena zbog slatkastog okusa (Tomaniak i sur., 1998.). Kao najdjelotvorniji krioprotektori iz skupine disaharida mogu se izdvojiti saharoza i laktoza, a od monosaharida: glukoza, maltoza, fruktoza, galaktoza, ksiloza, riboza i rafinoza. Mogu se primijeniti i glicerol, arabitol, sorbitol i ksilitol iz skupine šećernih alkohola, a od fosfata djelotvorni su tripolifosfati, pirofosfati, tetrapolifosfati i heksametafosfati. Smjesa sorbitola i saharoze (u masenom omjeru 1 : 1) i natrijeva tripolifosfata je smjesa koje se dosta često i učinkovito komercijalno koristi (Lenardić,2006.).

2.3. β-GLUKANI

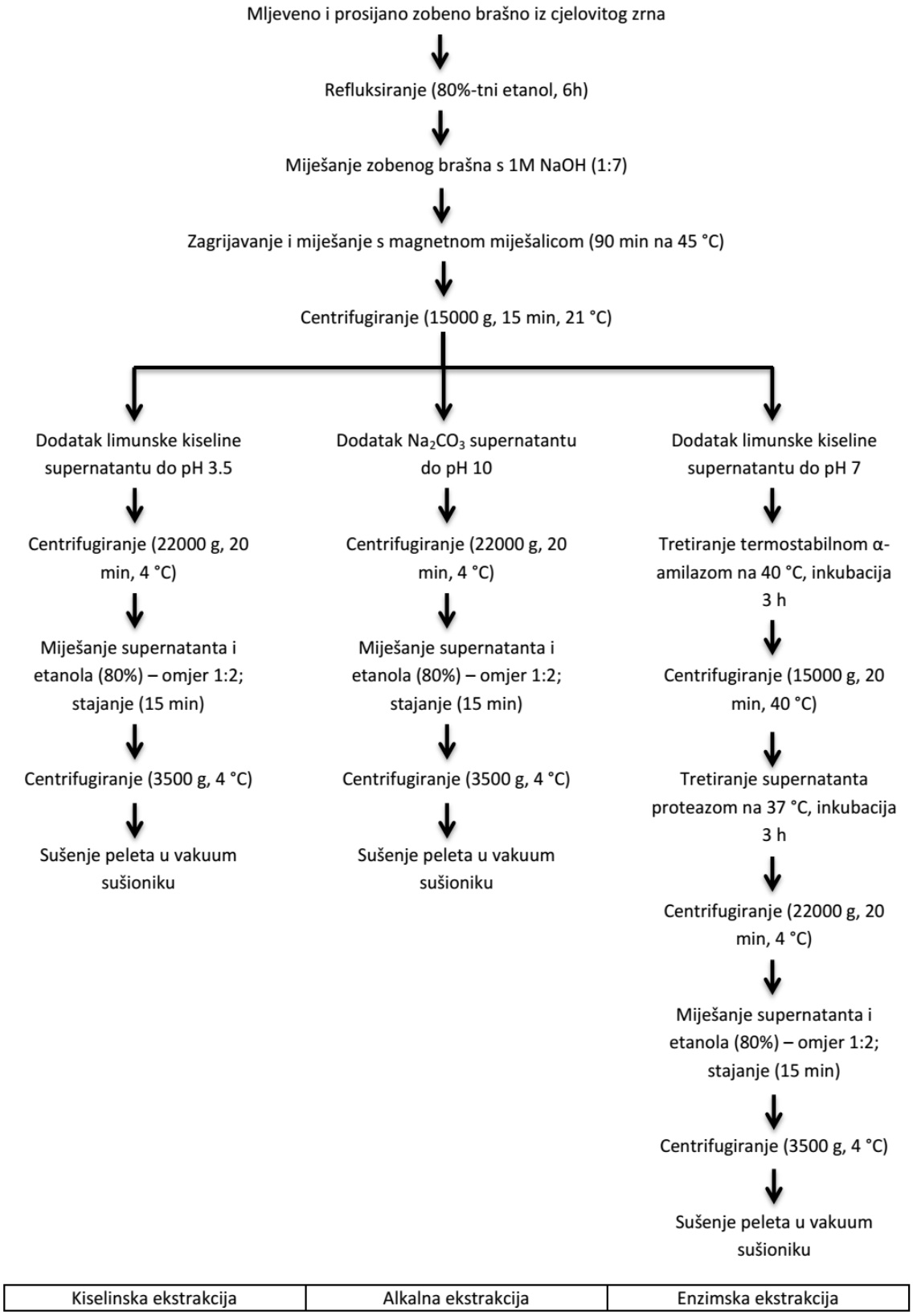
β-glukani su neškrobni polisaharidi, sastavljeni od molekula glukoze, koje mogu biti povezane β-(1,3), (1,4) i (1,6) glikozidnom vezom. (1,3), (1,4)-β D-glukani su netopljivi u vodi, a (1,3),(1,6) su topljivi. (1,3),(1,4)-β-D-glukani se najčešće izoliraju iz žitarica, ječma i zobi. U principu je β-glukan linearni polisaharidi koji se može gledati kao celulozni lanac (70% 4-O-β-D-glukopiranozil jedinica) prekinutih s 3-O-β-D glukopiranozil jedinicama (30%) što dovodi do strukture koju dominantno čine celotrioza i celotetroza međusobno povezane (1→3) vezama (Preedy i sur., 2011.). Nalazi se u bakterijama, algama, kvascima, gljivicama, plijesnima i višim biljkama i zbog toga njihova struktura ovisi o izvoru iz kojeg su izolirani. Premda se nalaze u svim žitaricama, njihova koncentracija je najveća u zobi (od 4,6 do 4,9%) i ječmu (1,8 do 6%), dok ih u pšenici ima mnogo manje (od 0,2 do 1%), te u riži (2%). Široko su rasprostranjeni u prirodi. U biljkama funkcioniraju kao strukturni i energetski rezervni materijal. Topljivi i netopljivi β-glukani imaju korisnu primjenu, najčešće u farmaceutskoj, kemijskoj i kozmetičkoj industriji (1,3),(1,4)-β-D-glukani imaju nisku molekularnu masu, a u dodiru s vodom stvaraju viskoznu, ljepljivu otopinu (Popović, 2012.; Benito Román i sur., 2011.; Pandžić 2013.).

2.3.1. β-glukan iz zobi

β-glukani se nalaze u vanjskom sloju endosperma i aleuronskom sloju zrna zobi. To je vrijedan funkcionalni sastojak s brojnim industrijskim, ali i prehrambenim, te zdravstvenim primjenama, odnosno prednostima. Iz zrna zobi se mogu izdvojiti postupcima kisele, alkalne ili enzimske ekstrakcije pri čemu je enzimska pokazala najveće iskorištenje i kvalitetu gotovog proizvoda (Ahmad i sur., 2010.).



Slika 1. Kemijska struktura β-glukana iz zobi (Preedy i sur., 2011.).



Slika 2. Ekstrakcija β-glukana iz zobi

2.4. DIFERENCIJALNA MOTRIDBENA KALORIMETRIJA (DSC)

Diferencijalna motridbena kalorimetrija je jedna od najšire korištenih termičkih metoda u analizi hrane (Farkas i Mohácsi-Farkas, 1996.). DSC je diferencijalna tehnika u kojoj se određivanje ponašanja uzorka temelji na usporedbi s referentnom, inertnom tvari koja ne pokazuje nikakvu termičku aktivnost u mjerenom temperaturnom rasponu. Ovako je moguće puno preciznije zabilježiti promjene uzorka u usporedbi s mjerenjem samo apsolutne temperature uzorka.

DSC je tehnika koja mjeri energiju potrebnu za održavanje temperaturne razlike između uzorka i referentnog materijala koji se nalaze u komoricama tijekom zagrijavanja ili hlađenja kontroliranom brzinom (Mastanjević, 2010.). Mjerenje temperaturi se provodi kontinuirano temperaturnim sondama, a grijači prema potrebi osiguravaju toplinu komoricama kako bi temperatura referentnog materijala i ispitivanog uzorka bile jednake. Podaci DSC analiza prikazuju se termogramima koji prikazuju brzinu apsorbirane energije/dovedene energije od strane uzorka u odnosu na referentni materijal u ovisnosti o vremenu ili temperaturi (okoline ili uzorka). Može se provoditi i mjerenje promjene topline oslobođene od strane uzorka kao funkcije vremena u izotermnim uvjetima (konstantna temperatura uzorka) (http://www.msm.cam.ac.uk/phase-trans/2002/Thermal2.pdf).

Zbog sposobnosti mjerenja toplinskog toka reda veličine µW, odnosno zbog velike osjetljivosti DSC metode njezina primjena je gotovo neograničena. Ova instrumentalna metoda može zabilježiti svaku fizikalnu promjenu ili kemijsku reakciju u kojoj dolazi do oslobađanja ili trošenja čak i vrlo malih količina energije.

Kalorimetrija je univerzalna metoda za proučavanje različitih kemijskih reakcija i fizikalnih promjena koje su praćene stvaranjem ili oslobađanjem energije. Kalorimetrijska mjerenja počela su se provoditi već sredinom 18. stoljeća dok se DSC tehnika snažno razvija 70-ih i 80-ih godina prošlog stoljeća. U prošlosti su toplinske metode, a time i DSC bile uglavnom usmjerene na proučavanje polimera. Međutim stalnim usavršavanjem tehnike i automatizacijom, primjena DSC metoda se konstantno proširuje na nova područja primjene (farmaceutska, kemijska, prehrambena i petrokemijska industrija) gdje se ne koristi samo za istraživanje termičkih svojstava nego i za rutinske analize te kontrolu kvalitete uzoraka tijekom proizvodnje, ali i gotovih proizvoda (Mastanjević, 2010.).

Najvažnija primjena DSC-a u istraživanjima vezanim za hranu i njezine sastojke usmjerena je na istraživanja (Farkas i Mohácsi-Farkas, 1996.):

- stabilnosti i denaturacije proteina,
- faznih prijelaza vodenih sustava škrobova,
- toplinske želatinizacije polisaharida,
- faznog ponašanja zamrznutih ugljikohidratnih sustava,
- karakterizacije staklastog prijelaza i kriostabilizacije hrane,
- točke taljenja i stupnja kristalizacije lipida,
- stabilnosti na oksidacijske procese,
- uz odgovarajuće konstrukcijske modifikacije DSC je pouzdana, precizna i relativno brza metoda za određivanje toplinske provodljivosti hrane.

Za dobivanje podataka DSC analizom mogu se koristiti dva različita DSC sustava (http://www.msm.cam.ac.uk/phase-trans/2002/Thermal2.pdf):

DSC toplinskog toka (*eng. Heat-flux DSC*),

DSC kompenziranog toplinskog toka (*eng.Power compensation DSC*).

2.4.1. DSC toplinskog toka (*eng. Heat-flux DSC*)

Prema principu rada DSC – toplinskog toka je slična diferencijalnoj termičkoj analizi (DTA), međutim, osnovna razlika je što s DTA nije moguće provoditi kvantitativna mjerenja, dok je DSC – toplinskog toka pogodna za takva mjerenja, jer sadrži vrlo dobro definiranu termičku otpornost u čeliji (Van der Plaats, 1992.) .

Toplinski tok Q_s prema uzorku potječe od ogrjevne stijenke i referentne tvari:

$$Q_s = Q_{cs} + Q_{rs} = K_{cs}(T_c - T_s) + K_{rs}(T_r - T_s) \quad \left[\mathrm{kJh^{-1}}\right] \tag{1}$$

K_{cs} – koeficijent prijenosa topline između ogrjevne stijenke i uzorka (kJ h^{-1} m^{-2} K^{-1})

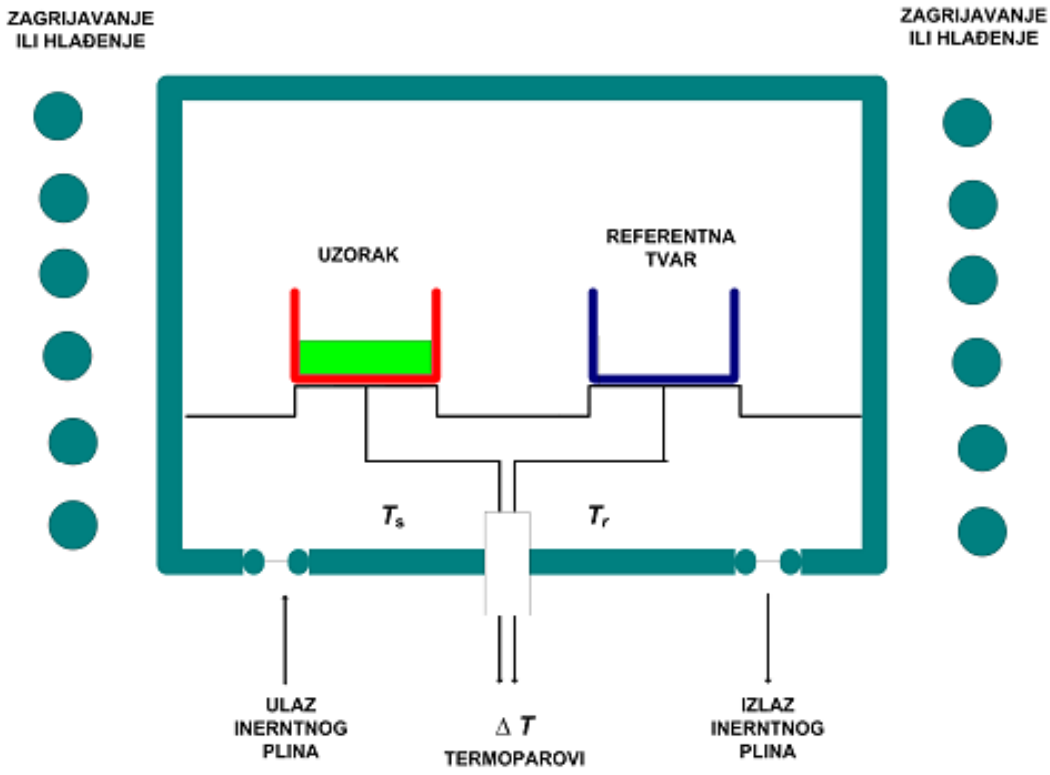
K_{rs} – koeficijent prijenosa topline između referentne tvari i uzorka (kJ h^{-1} m^{-2} K^{-1})

T_c – temperatura ogrjevne stijenke (°C)

T_s – temperatura uzorka (°C)

T_r – temperatura referentne tvari (°C)

Uzorak i referentna tvar se nalaze u malim posudicama smještenim na metalnim pločama. Metalne ploče omogućuju kontrolirani tok topline od izvora topline do uzorka i referentne tvari. Budući da se mjerenje temperature odvija na ovim pločama, odmah ispod posudica, eliminiran je njezin utjecaj na termičku otpornost uzorka. Ovakva izvedba uređaja omogućuje preciznije praćenje promjene entalpije uzorka (Van der Plaats, 1992.).



Slika 3. Shema komore DSC-a toplinskog toka (Mastanjević, 2010.)

2.4.2. DSC kompenziranog toplinskog toka (*eng. Power compensation DSC)*

U odnosu na prethodno opisanu DSC, ovdje su uzorak i referentna tvar potpuno odvojeni jedan od drugog. Obje posudice (s uzorkom i s referentnom tvari) imaju svoj vlastiti izvor topline i temperaturno osjetilo. Pomoću temperaturnog programatora se održava ista temperatura i uzorka i referentne tvari. Da bi se zadržali početni uvjeti, prilikom pojave reakcija u uzorku potrebno je dovoditi (endotermna reakcija) ili odvoditi toplinu (egzotermna reakcija). Pomoću posebnog elektroničkog kruga regulirano je dovođenje i odvođenje topline prema držačima uzoraka, kako bi se temperaturna razlika zadržala na nuli (Van der Plaats, 1992.).

Razlika toplinskog toka ($Q_s - Q_r$) je mjerena kompenzacijom s električnom strujom, pa imamo $Q_{e,r}$ i $Q_{e,s}$ odakle slijedi:

$$\Delta Q_e = (Q_{e,r} - Q_{e,s}) = (C_s - C_r) \cdot dT_r / dt - C_s / K \cdot d(\Delta Q_e) / dt + q \qquad (2)$$

C_s – toplinski kapacitet uzorka i posudice (kJ kg^{-1} K^{-1})

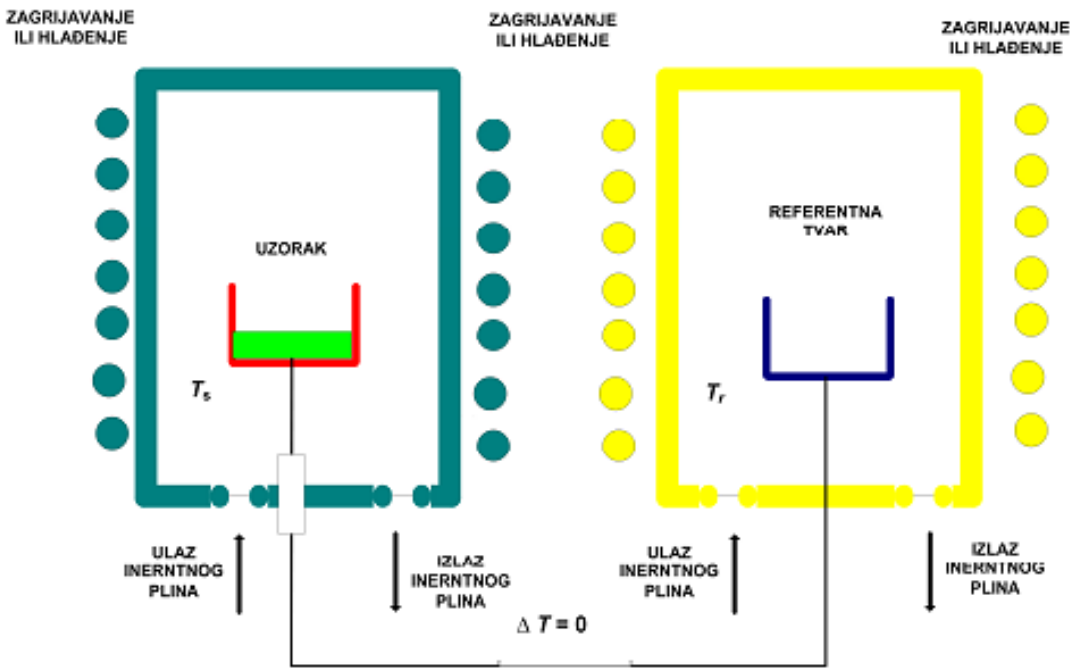
C_r – toplinski kapacitet referentne tvari (kJ kg^{-1} K^{-1})

Uređaji za termoanalize DSC tehnikama se sastoje od osjetljivih dijelova koji imaju sposobnost mjerenja vrlo malih vrijednosti toplinskog toka (μW). Iz tog razloga je primjena ovih uređaja neograničena. Svaka fizikalna promjena ili kemijska reakcija praćena je promjenom entalpije, što ima za posljedicu primanje ili otpuštanje topline.

Rezultati DSC analize prikazuju se krivuljama pri čemu se na x-osi uvijek nalazi temperatura, a na y-osi toplinski tok. DSC dijagrami pridonose optimizaciji toplinskih procesa, budući da se utjecaji okoline i procesnih uvjeta mogu mjeriti i suvislo interpretirati. Toplinski tok odgovara prenesenoj energiji i mjeri su watima (W) ili miliwatima (mW), a ukoliko se mjeri prenesena energija u vremenu mjerna jedinica je mW s ili J.

Prenesena energija odgovara promjeni entalpije uzorka. Toplinski efekti (taljenje, kristalizacija, kemijske reakcije) koji se očituju u vidu pikova karakterizirani su promjenama entalpije i temperaturnim rasponom (Van der Plaats, 1992.).

U slučajevima kada uzorak apsorbira energiju promjena entalpije naziva se endotermna, a kada uzorak oslobađa energiju taj proces naziva se egzotermna promjena entalpije. Prema ICTA standardima (*eng*. *Nomenclature Committee of the International Confederation for Thermal Analysis* tj. Međunarodno udruženje za toplinsku analizu), endotermna reakcija ima vrh okrenut prema dolje, a egzotermna prema gore dok je prema DIN standardima suprotno, te se prilikom prezentacije treba naglasiti prema kojem standardu se interpretira DSC krivulja (Mastanjević, 2010.).



Slika 4. Shema komore DSC-a kompenziranog toplinskog toka.

2.4.3. Primjena diferencijalne motridbene kalorimetrije (DSC) u analizi proteina

Pri analizi proteina pomoću DSC-a važno je poznavati svojstva proteina jer se ovom metodom proučavaju njihove konformacijske promjene do kojih je došlo pod djelovanjem različitih čimbenika. Proučavaju se termička denaturacija tkivnih proteina, enzima i utjecaj različitih dodataka na svojstva proteina.

Tijekom termičke obrade namirnica dolazi do promjena na proteinima kao što su denaturacija tj. gubitak prirodne strukture. U povoljnim uvjetima se denaturirani polipeptidi mogu nakupljati i stvarati trodimenzionalnu strukturu gela. Ova pojava je poželjna jer je struktura gela takva da osigurava teksturu i služi kao medij koji zadržava ostale sastojke. Na DSC termogramu toplinsku denaturaciju proteina uočavamo kao endotermni vrh, jer je raspadanje intermolekularnih vodikovih veza endotermna reakcija. Suprotno tome, pucanje hidrofobnih veza je egzotermna reakcija što može utjecati na određivanje ukupne entalpije (ΔH) (Jovanovac, 2009.).

Ako želimo procijeniti potrebnu toplinsku energiju za denaturaciju proteina za proračun vrijednosti entalpije (ΔH) može nam poslužiti površina ispod prijelaznog vrha. Temperaturu denaturacije moguće je odrediti sa prijelaza, a najčešće se uzima kao temperatura vrha. Međutim, na temperaturu denaturacije i entalpiju utječu različiti aditivi, što otežava određivanje procesnih uvjeta kao i određivanje sadržaja i vrste aditiva u ispitivanoj namirnici (Farkas i Mohácsi-Farkas, 1996.).

2.4.4. Primjena diferencijalne motridbene kalorimetrije (DSC) za određivanje krioprotektorske djelotvornosti zamrznute hrane

Za proučavanje smrznutih prehrambenih proizvoda, vrlo je prikladna metoda nisko temperaturne DSC sa pripadajućim termogramima. Metoda nam omogućuje procjenjivanje sličnosti između sintetičkih amorfnih polimera i staklasto formiranih vodenih sustava. Zajedno sa drugim termoanalitičkim tehnikama čini važan element u proučavanju sastojaka hrane u tehnologiji kriostabilizacije, s obzirom na kemijsku stabilnost i stabilnost teksture smrznute namirnice (Farkas i Mohácsi-Farkas, 1996.).

Za praćenje intenziteta denaturacije miofibrilarnih proteina tijekom zamrzavanja i skladištenja u smrznutom stanju primjenjuje se usporedba entalpije endotermne reakcije denaturacije izoliranih miofibrilarnih proteina (ΔH) tijekom zagrijavanja u temperaturnom intervalu od 10 do 100 °C, te uspoređivanje temperatura na kojima se denaturacije događaju. Zamrzavanjem i skladištenjem u smrznutom stanju dolazi do smanjenja vrijednosti entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina. Vrijednosti entalpije koja opisuje toplinsku denaturaciju izoliranog miozina i aktina je rezultat uvjeta skladištenja, masenog udjela i vrste dodanih krioprotektora (Mastanjević, 2010.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK RADA

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

- pripremiti uzorke goveđeg mesa postupkom višestrukog ispiranja destiliranom vodom,
- odrediti a_w, pH i osnovni kemijski sastav uzoraka goveđeg mesa,
- diferencijalnom motridbenom kalorimetrijom odrediti krioprotektorski učinak β-glukana na miofibrilarne proteine goveđeg mesa nakon skladištenja 30 dana pri -30 °C,
- odrediti profil teksture i kalo kuhanja uzoraka gelova miofibrilarnih proteina goveđeg mesa pomiješanih s β-glukanom (w = 0 – 6%), nakon 30 dana skladištenja pri -30 °C,
- odrediti koordinate boje uzoraka goveđeg mesa pomiješanih s β-glukanom (w = 0 – 6%) u CIE-*L*a*b** sustavu, nakon 30 dana skladištenja pri -30 °C.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Priprema uzoraka goveđeg mesa

Za pripremu uzoraka korišteno je meso goveđeg bifteka (pisane pečenice) (lat. *Psoas major M*) kupljeno na tržnici u Osijeku. Uzorci su pripremljeni u laboratorijskim uvjetima prema modificiranom postupku koji su predložili Yang i Frnoning s obzirom da je pri postupku ispiranja mesa korištena destilirana voda umjesto vode iz pipe (Mastanjević, 2010.). Priprema je provedena u 3 faze (**Slika 5**).

1. Faza

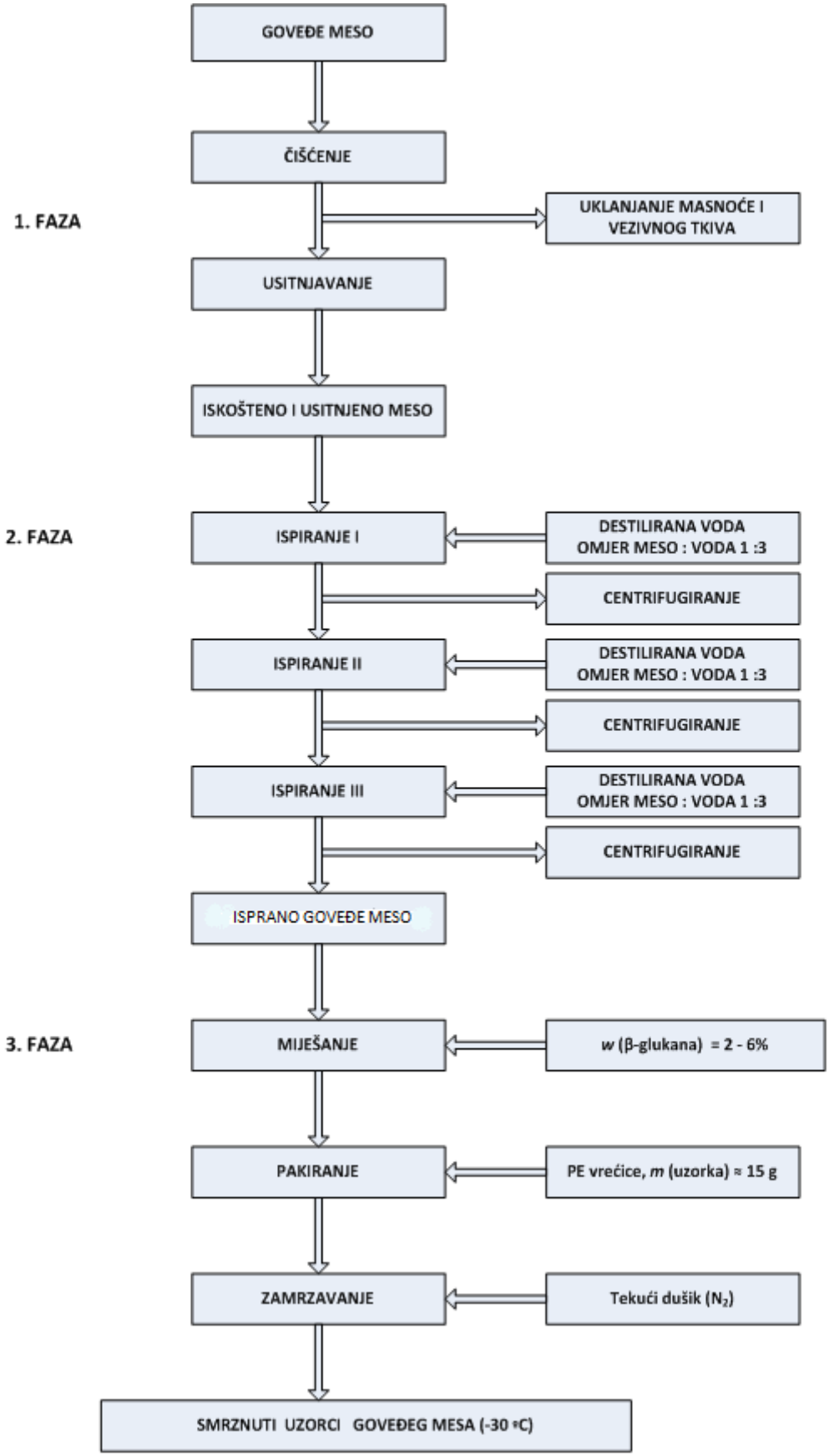
Meso je iskošteno i odstranjena je preostala masnoća i veće nakupine vezivnog tkiva. Nakon toga meso je usitnjeno strojem za mljevenje (usitnjavanje) mesa, propuštanjem u dva navrata, kroz rešetku s otvorima promjera $2r$ = 2 - 4 mm. Veće iskorištenje sirovine može se postići povećanjem promjera, ali se time u uzorcima smanjuje maseni udio proteina.

2. Faza

Usitnjeno goveđe meso se u drugoj fazi ispire s destiliranom vodom. Iako se ispiranjem usitnjenog goveđeg mesa smanjuje iskorištenje sirovine, doprinosi se stabilnosti miofibrilarnih proteina, te osiguravaju bolja želirajuća svojstva ispranog mesa. Usitnjeno se meso 15 minuta ispire destiliranom vodom i miješa pri umjerenoj brzini miješanja (250 okretaja min^{-1}) pri +4 °C zbog sprečavanja pulpizacije smjese. Za miješanje je korištena propelerska miješalica Tehtnica Železniki UM-405. Omjer mesa i vode tijekom ispiranja iskustveno je optimiziran i iznosi 1:3. Kako ne bi došlo do slučajne agregacije denaturiranih proteinskih molekula (koagulacije), te da bi se one pravilno orijentirale i vezale formirajući trodimenzionalnu gel strukturu, potrebno je da se protein - protein interakcije odvijaju što sporije, odnosno pri nižim temperaturama. Iz tog razloga se destilirana voda tijekom ispiranja održavala na +4 °C dodatkom kristala leda. Nakon 15 minuta miješanja smjesa se ostavlja da miruje 1 minutu. Nakon mirovanja sa površine se uklanja nakupljena mast. Nakon toga smjesa se centrifugira 15 minuta na 800 · *g* pri +4 °C. Za centrifugiranje uporabljena je Heraus Multifuge centrifuga. Postupak se ponavlja tri puta.

3. Faza

U trećoj fazi se isprano goveđe meso uzrokuje i miješa s β-glukanom iz zobi u različitim masenim omjerima. Maseni udjeli β-glukana kretali su se u rasponu od 0 – 6%, a pripremljen je i uzorak bez dodataka. Nakon pripreme, uzorci su zatvoreni u polietilenske vrećice zbog sprečavanja dehidratacije, očuvanja mase i kvalitete uzoraka ispranog goveđeg mesa. Uzorci su označeni i zamrznuti u struji tekućeg dušika (-196 °C), te uskladišteni pri -30 °C do provedbe analize.



Slika 5. Shema tijeka pripreme uzoraka goveđeg mesa

3.2.2. Određivanje a_w, pH i osnovnog kemijskog sastava uzoraka goveđeg mesa

Osnovni kemijski sastav (maseni udio vode, proteina, masti i kolagena) uzoraka goveđeg mesa određen je pomoću Food Scan Meat Analyser-a tvrtke Foss (**Slika 6)** prema AOAC metodi 2007.4. pH vrijednosti svih uzoraka goveđeg mesa mjerene su uređajem pH/Ion 510 – Bench pH/Ion/mV meter (Eutech Instruments Pte Ltd/Oakton Instruments, USA)**,** prema ISO normi 2917:1999 (HRN ISO 2917, 2000), te uputama proizvođača (pH/Ion 510 Instruction Manual). Aktivitet vode (a_w) je određen pomoću Rotronic Hygrolab 3 – Multi-channel Humidity & Water Activity Analyser (Rotronic AG, Bassersdorf, Švicarska) (**Slika 7**) pri sobnoj temperaturi (20 ± 2 °C). Sva određivanja su provedena u tri paralele.



Slika 6. FoodScan Meat Analyser



Slika 7. Rotronic - HygroLab 3 – Multi-channel Humidity Water Activity Analyser

3.2.3. Određivanje kala kuhanja

Uzorci goveđeg mesa pripremljeni postupkom višestrukog ispiranja su stavljeni u plastične epruvete unutarnjeg promjera 10 mm. Nakon odmrzavanja, epruvete s uzorcima, su se zagrijavale 25 minuta u vodenoj kupelji na 80 °C. Došlo je do nastanka gela, a epruvete s nastalim gelom su ohlađene u hladnoj vodi dok se unutar uzorka nije postigla temperatura od približno 20 °C. Nakon hlađenja, skladištene su na 4-6 °C do sljedećeg dana. Kalo kuhanja je izračunat kao razlika u masi između uzorka prije kuhanja i nakon kuhanja, odnosno nakon uklanjanja nastalog gela **(3)**. Kalo kuhanja je izražen kao postotak na masu početnog uzorka.

$$\text{kalo kuhanja} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100(\%) \quad (3)$$

m_1 – masa uzoraka prije kuhanja,

m_2 – masa uzoraka nakon kuhanja

3.2.4. Određivanje profila teksture

Teksturalni profil uzoraka goveđeg mesa određen je uređajem Universal TA-XT2i Stable Micro Systems Texture Analyzer **(Slika 8)** opremljenog cilindričnom sondom P/75**.** Uzorci su narezani na komade debljine 1,5 cm i pritisnuti kompresijskom pločom promjera 75 mm, dva puta, do 60% njihove visine prema sljedećim parametrima:

- kalibracija visine: 25 mm,
- brzina prije mjerenja: 5 mm/s,
- brzina mjerenja: 5 mm/s,
- brzina nakon mjerenja: 5 mm/s,
- dubina prodiranja cilindra: 9 mm (60%),
- vrijeme zadržavanja između dvije kompresije: 5 s,
- potrebna sila za početni signal: 5 g.

Analiza teksture provedena je pri sobnoj temperaturi. Računalni program zapisuje krivulju promjene sile potrebne za kompresiju uzorka u određenom vremenu prema sljedećim parametrima:

- brzina kretanja glave uređaja od 5 mm s^{-1},
- brzina zapisa testa od 5 mm s^{-1}.

Iz dobivenih rezultata očitani su sljedeći parametri:

- čvrstoća – visina prvog pika izražena u jedinicama sile (N) ili mase (g), predstavlja najveću silu potrebnu za kompresiju uzorka
- kohezivnost – predstavlja snagu unutrašnjih veza materijala potrebnih da zadrže uzorak koherentnim pri deformaciji, a definirana je omjerom površina ispod drugog i prvog pika,
- elastičnost – predstavlja tzv. trenutnu elastičnost, sposobnost uzorka da se vrati u početnu formu, odnosno oblik nakon prestanka djelovanja sile deformacije, tj. nakon deformacije pri prvoj kompresiji, a definirana je omjerom površine ispod krivulje tijekom prve dekompresije i površine ispod krivulje tijekom prve kompresije,
- odgođena elastičnost – omjer visina uzorka do koje se on vraća tijekom vremena koje prođe između kraja prve kompresije i početka druge kompresije i početne visine uzorka,
- otpor žvakanju – predstavlja energiju koju je potrebno utrošiti za žvakanje uzorka, odnosno otpor uzorka žvakanju, a izračunava se kao umnožak čvrstoće, kohezivnosti i odgođene elastičnosti i izražava u jedinicama sile (N) ili mase (g).

Izračun parametara teksturalnog profila proveden je pomoću softverskog sustava Texture Exponent for Windows (version 1.0) Stable Micro Systems.



Slika 8. Stable Micro Systems TA-XT2i analizator teksture

3.2.5. Određivanje koordinata boje u CIE-*L*a*b** sustavu

Instrumentalno određivanje boje provedeno je uređajem MiniScan®XE Plus spectrocolorimeter (Hunter Associates Laboratory, Inc., Virginia, USA), (angle 10°, illuminant D65) **(Slika 9).** Uređaj je prije početka rada kalibriran hvatačem svjetlosti i bijelom keramičkom pločom (L*0 = 93,01, a*0 = -1,11 i b*0 = 1,30). Tijekom ispitivanja su određene sljedeće koordinate boje u CIE-*L*a*b** sustavu: (L*) - koordinata svjetline (lightness): 0 (crna) - 100 (bijela); a* - koordinata obojenja (redness - greenness): (+a* = crveno, - a* = zeleno); te b* koordinata obojenja (yellowness - blueness): (+b* = žuto, - b* = plavo), dok je vrijednost W, odnosno bjelina (whiteness) izračunata preko izraza *L* - 3b**. Mjerenje boje uzoraka goveđeg mesa provedeno je pri sobnoj temperaturi (20 ± 2 °C), sva mjerenja provedena su sedam puta.

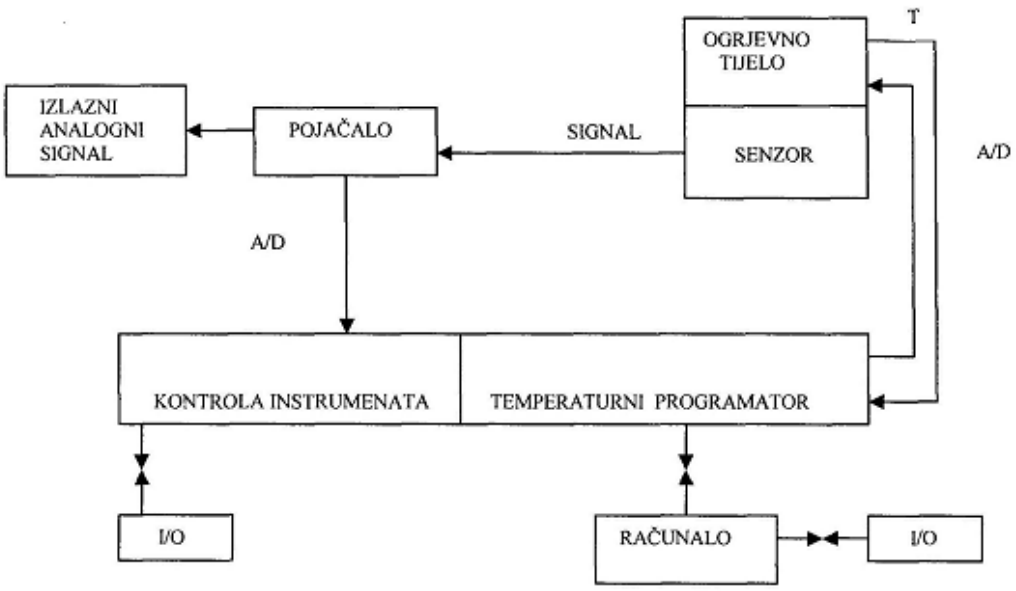


Slika 9. Hunter-Lab Mini ScanXE

3.2.6. Određivanje temperatura i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina uzoraka goveđeg mesa metodom diferencijalne motridbene kalorimetrije

Za određivanje temperatura i entalpija denaturacije uzoraka korišten je kalorimetar tvrtke MettlerToledo model 822e (**Slika 11**), a mjerenja su provedena u atmosferi dušika čistoće 5.0.

Zajednička karakteristika tehnika termičke analize je da se svojstva uzorka mjere u funkciji njegove temperature. Iz toga proizlazi da svi uređaji za termičku analizu imaju vrlo sličnu osnovnu strukturu (Jovanovac, 2009.) koja je prikazana blok dijagramom na **Slici 10**.



Slika 10. Blok shema uređaja za termičku analizu

Uređaj je opremljen keramičkim senzorom FRS 5 s 56 termoparova (Au/Au/Pd), te omogućuje izvođenje dinamičkih mjerenja u temperaturnom području od -150 do 500 °C i bazira se na DSC metodi toplinskog toka. Opremljen je STARe software-om, odnosno s pet različitih programa koji su međusobno povezani preko baze podataka:

- instalacijski program (*eng. install window*) koji sadrži sistemsku konfiguraciju i module pomoću kojih se definira mjerno područje, kalibracijski materijali, plinovi i posudice koje su u primjeni,
- kontrolni modul program (*eng. module control window*) prikazuje modul povezan sa software-om, koji radi izravno preko kompjutera te pokazuje eksperiment koji je u tijeku te omogućava kreiranje jednostavnih metoda i eksperimenata za rutinske analize,
- program za različite metode (*eng. method window*) koji omogućuje kreiranje temperaturnih programa mjerenja,
- program za izvođenje eksperimenta (*eng. experiment window*) koji služi za odabir metode mjerenja s unosom podataka specifičnim za eksperiment (ime uzorka, masa uzorka, priprema uzorka),
- evaluacijski program (*eng. evaluation window*) koji služi za analizu krivulja, tj. obradu rezultata.



Slika 11. DSC kalorimetar tvrtke Mettler-Toledo model 822e

Mjerenje se provodi tako da se eksperimentalni parametri unose u temperaturni program za pojedine segmente (korake) u mjernom modulu. Tijekom mjerenja, mjerni podaci se kontinuirano šalju iz DSC 822e modula prema računalu. Podaci su prezentirani kao „on-line" krivulje u kontrolnom modul programu.

3.2.6.1 Provedba mjerenja

Za mjerenje temperatura i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina uzoraka goveđeg mesa upotrijebljene su odvage uzoraka od 15 ± 2 mg. Prije svakog mjerenja smrznuti uzorci su ostavljeni preko noći u hladnjaku na +4 °C radi odmrzavanja. Uzorci goveđeg mesa izvagani su u standardnu aluminijsku posudicu (40 µL) čija precizna izrada, te čvrsto i ravno dno osiguravaju odličan kontakt između senzora i posudica i niski temperaturni gradijent. Odmah nakon hermetičkog zatvaranja posudice provedeno je DSC mjerenje. Za određivanje temperatura i entalpija denaturacije uzorci su bili podvrgnuti temperaturnom programu zagrijavanja od 25 do 95 °C s brzinom zagrijavanja od 10 °C min^{-1}. Kontrola pouzdanosti instrumenta (modula), koja određuje razliku izmjerene i određene referentne vrijednosti temperature ili toplinskog toka ispitivanog referentnog materijala rađena je s indijem prije svakog mjerenja te nakon punjenja kontejnera s komprimiranim i tekućim dušikom. U radu je korištena opcija hlađenja s tekućim dušikom (kontejner od 100 L, Messer, Frankfurt). U ovom istraživanju mjerenja su provedena nakon jednomjesečnog skladištenja na -30 °C, a sva mjerenja su provedena u tri paralele.

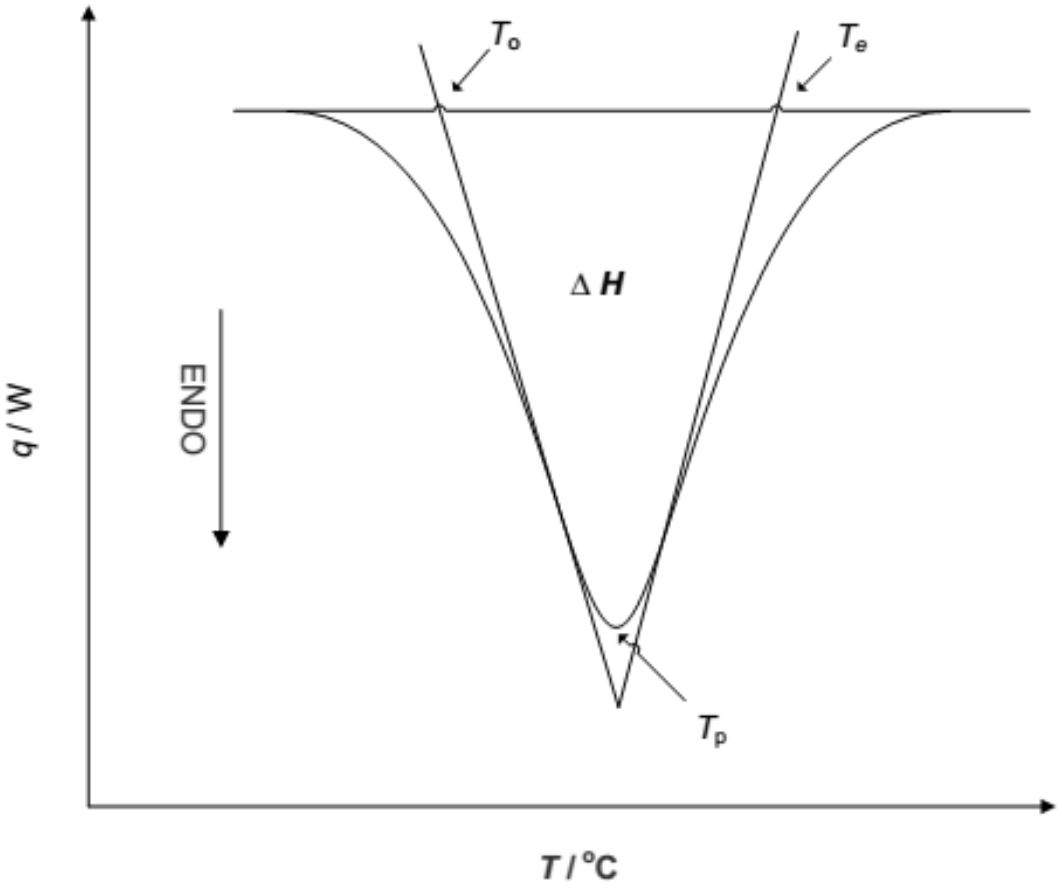
3.2.6.2 Određivanje temperatura i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina uzoraka goveđeg mesa

U programu za evaluacije STARe software-a, nalaze se numeričke evaluacije i grafički postupci pomoću kojih se obrađuju rezultati. Područje evaluacije može se odabrati crtanjem okvira u području u kojem se želi napraviti evaluacija ili pomoću „auto limita", koji omogućava automatsko određivanje termičkih promjena. Numeričke evaluacije obuhvaćaju početne i krajnje točke određenih promjena, integracije s različitim baznim linijama, temperature vrha (pika) krivulje sa i bez ekstrapolacije, itd. Na taj način se vrlo precizno mogu odrediti entalpije različitih promjena i mjeriti temperature reakcija. DSC uređaj

omogućava pouzdano otkrivanje i najmanjih odstupanja od bazne linije kao početaka termičkih procesa. Bazna linija predstavlja dio DSC krivulje u kojem se ne odvijaju termičke promjene. Budući da vrsta bazne linije određuje dobivene rezultate i prema tome mora biti pažljivo odabrana (ovisno o termičkom efektu ili promjeni koja se ispituje, odnosno dijelu krivulje koji se želi evaluirati) (Mastanjević, 2010.). Pik (vrh) krivulje određen je:

- temperaturom pika (T_p) - temperatura koja odgovara maksimalnoj defleksiji DSC krivulje,
- početnom (*eng. onset*) temperaturom (T_o) - temperatura kod koje je prisutno prvo odvajanje defleksija (savijanje) krivulje od bazne linije,
- završnom temperaturom (*eng. endset*) (T_e) - temperatura sjecišta ekstrapolirane bazne linije i uzlazne krivulje pika (**Slika 12**) (Mastanjević, 2010.).

Entalpija različitih promjena u analiziranom uzorku dobiva se integriranjem površine vrha (pika) krivulje (**Slika 12**). S obzirom na vrlo malu masu uzorka koji se koriste u DSC analizi (10 do 20 mg) postoji problem reproducibilnosti rezultata te je neophodna dobra homogenizacija uzorka i provedba više paralelnih mjerenja (Mastanjević, 2010.).



Slika 12. Određivanje početne (T_o), završne (T_e) i temperature vrha (T_p) te entalpije (ΔH) neke promjene u uzorku

3.2.7. Statistička obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ponavljanja ± standardna devijacija. Analiza varijance (one-way ANOVA) i potom Fischer-ov LSD test najmanje značajne razlike (engl. least significant difference) provedeni su upotrebom programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK. SAD), a statistički značajne razlike izražene su na razini vjerojatnosti od 95% ($p < 0,05$).

4. REZULTATI

Rezultati istraživanja, odnosno provedbe eksperimentalnog dijela diplomskog rada:

1. Određivanje osnovnog kemijskog sastava, a_w i pH uzoraka goveđeg mesa (**Tablica 1**)
2. Određivanje pH vrijednosti uzoraka goveđeg mesa pomiješanog s različitim masenim udjelima β-glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C (**Tablica 2**)
3. Određivanja kala kuhanja uzoraka goveđeg mesa (**Tablica 3; Slika 13**)
4. Određivanje profila teksture gelova uzoraka goveđeg mesa (**Tablica 4**)
5. Instrumentalno određivanje boje uzoraka goveđeg mesa (**Tablica 5**)
6. Određivanje temperatura denaturacije (T_o, T_p, T_e) i entalpija denaturacije (ΔH) miozina i aktina uzoraka goveđeg mesa primjenom DSC-a (**Tablica 6, Tablica 7; Slika 14, 15, 16, 17**)

Tablica 1. Osnovni kemijski sastav, a_w i pH uzoraka goveđeg mesa.

Gradivna tvar/parametar	Maseni udio (%)
Voda	83,40 ± 0,02
Proteini	15,38 ± 0,18
Masti	1,37 ± 0,02
Kolagen	0,98 ± 0,04
pH	6,85 ± 0,04
a_w	0,97 ± 0,01

Prikazani rezultati su srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Tablica 2. pH vrijednosti uzoraka goveđeg mesa pomiješanog s različitim masenim udjelima β-glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C

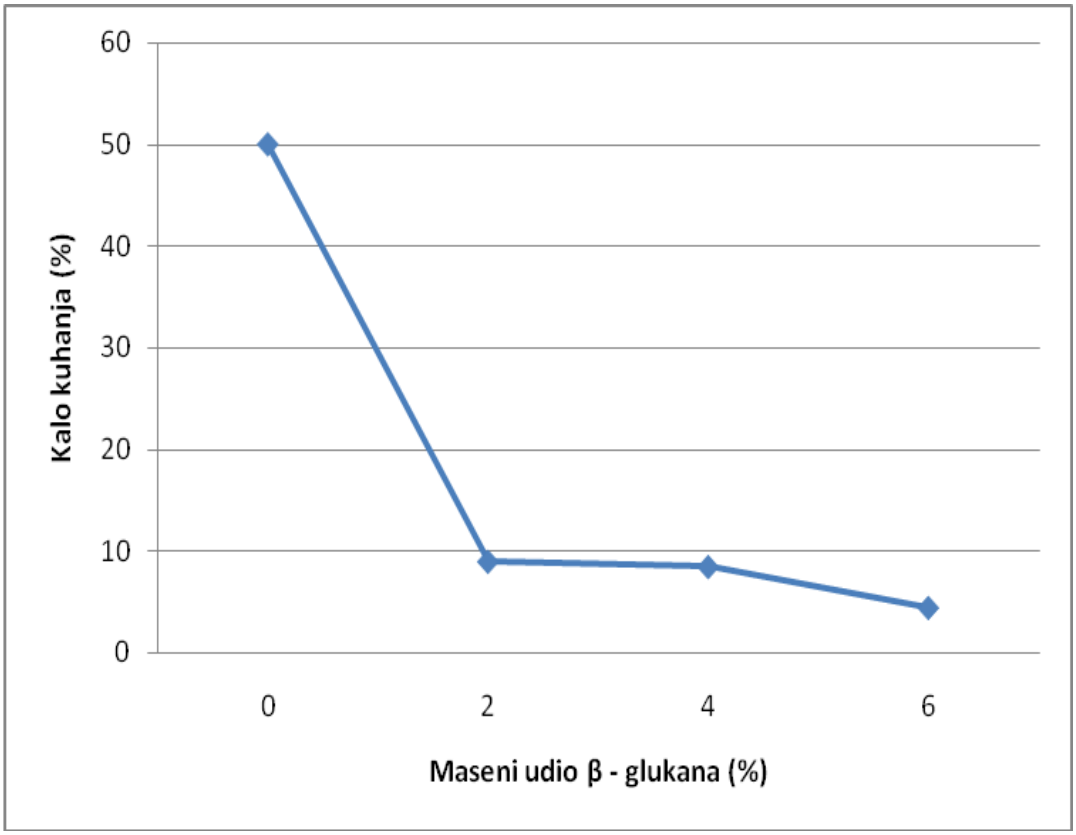
w β-glukana (%)	pH
0	5,95 ± 0,01
2	5,91 ± 0,01
4	5,92 ± 0,01
6	5,79 ± 0,02

Prikazani rezultati su srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Tablica 3. Kalo kuhanja uzoraka goveđeg mesa pomiješanog s različitim masenim udjelima β-glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C

***w* β-glukana (%)**	***m*$_1$ (g)**	***m*$_2$ (g)**	***Δm*(g)**	**kalo kuhanja (%)**
0	32,67b ± 0,73	16,34c ± 0,87	16,33a ± 0,05	49,98a± 1,23
2	31,73c ± 0,57	28,87b ± 0,60	2,86b ± 0,28	9,01b ± 0,25
4	36,24a ± 0,20	33,16a ± 0,18	3,08c± 0,02	8,5b ± 0,01
6	33,72b ± 0,03	32,21a ± 0,07	1,.51d ± 0,04	4,48c ± 0,11

Prikazani rezultati su srednja vrijednost ± standardna devijacija; razlike vrijednosti unutar stupca označene istim slovom (a, b, c) nisu statistički značajne ($p < 0,05$).



Slika 13. Grafički prikaz kala kuhanja uzoraka goveđeg mesa pomiješanog s različitim masenim udjelima β-glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C

Tablica 4. Profil teksture uzoraka goveđeg mesa pomiješanog s različitim masenim udjelima β-glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C

w β-glukana (%)	Tvrdoća (g)	Elastičnost	Kohezivnost	Otpor žvakanju (g)
0	3160,44a ± 141,80	0,95a ± 0,01	0,72a ± 0,03	2160,92a ± 98,42
2	1840,86ab ± 61,99	0,91a ± 0,07	0,51ab ± 0,01	1021,09ab ± 31,45
4	1092,04b ± 18,21	0,87a ± 0,01	0,38b ± 0,01	362,62b ± 14,85
6	1261,58b ± 75,79	0,86a ± 0,10	0,46ab ± 0,21	521,84b ± 75,05

Prikazani rezultati su srednja vrijednost ± standardna devijacija; razlike vrijednosti unutar stupca označene istim slovom (a, b) nisu statistički značajne ($p < 0,05$).

Tablica 5. Instrumentalno određivanje boje uzoraka goveđeg mesa pomiješanog s različitim masenim udjelima β-glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C

w β-glukana *(%)*	*L**	*a**	*b**	*W*
0	70,87c ± 0,61	4,62a ± 0,39	16,82a ± 0,31	20,41b ± 1,34
2	75,15b ± 0,66	3,11b ± 0,13	15,71b ± 0,24	28,04a ± 1,19
4	74,74b ± 0,38	2,63c ± 0,10	15,90b ± 0,11	28,31a ± 0,26
6	76,02a ± 0,43	2,58c ± 0,18	15,83b ± 0,21	27,25a ± 0,79

Prikazani rezultati su srednja vrijednost ± standardna devijacija; razlike vrijednosti unutar stupca označene istim slovom (a, b, c) nisu statistički značajne ($p < 0,05$).

Tablica 6. Temperature denaturacije (T_o, T_p, T_e) i entalpija denaturacije (ΔH) miozina uzoraka goveđeg mesa pomiješanog s različitim masenim udjelima β-glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C

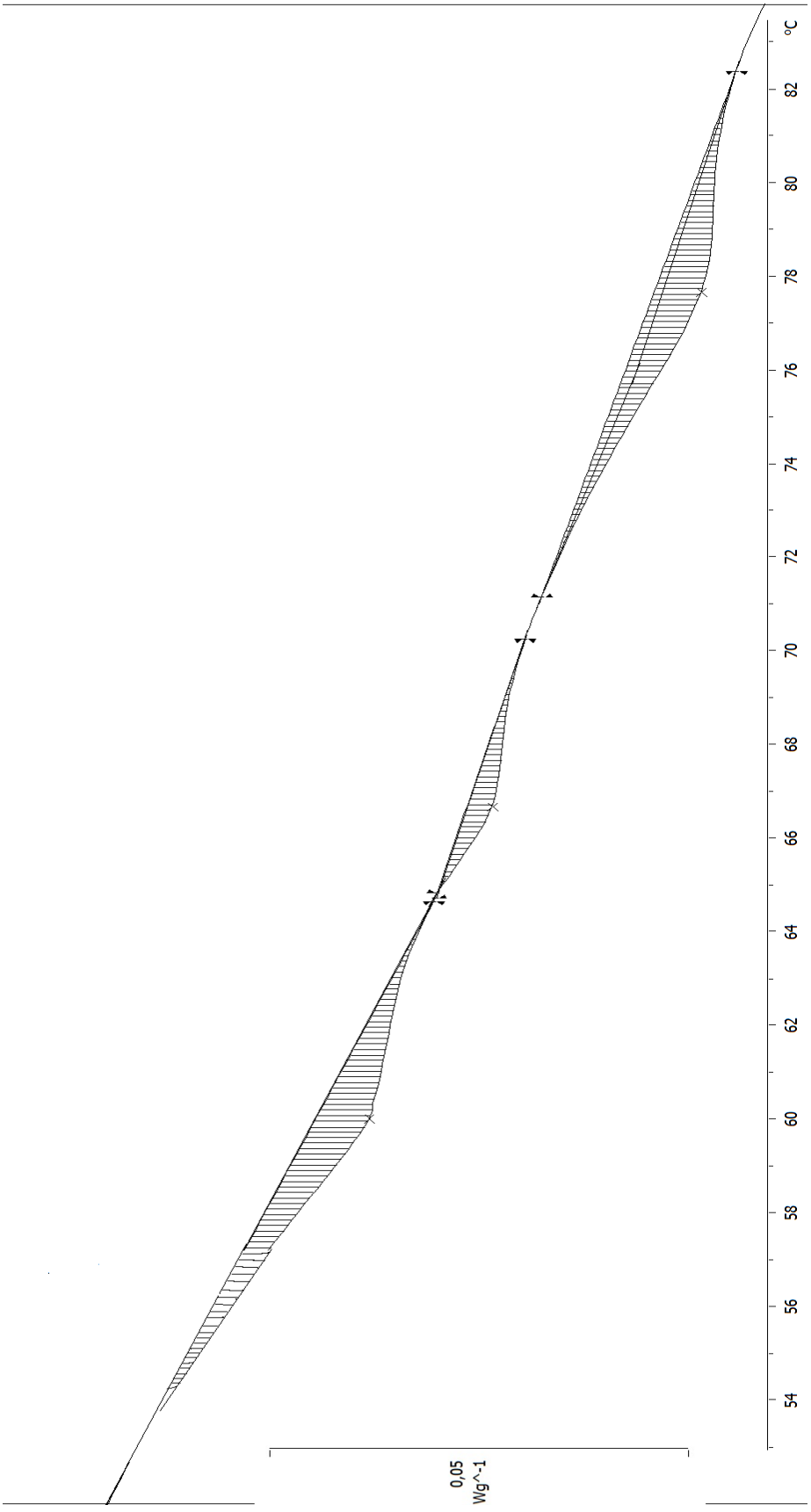
***w* β-glukana (%)**	**T_o (°C)**	**T_p (°C)**	**T_e (°C)**	**ΔH_m (J g^{-1})**
0	57,62a ± 0,04	59,62c ± 0,12	64,57b ± 0,33	0,21b ± 0,02
2	55,25c ± 0,01	59,89c ± 0,17	63,26c ± 0,01	0,23b ± 0,03
4	56,44b ± 0,16	60,78b ± 0,15	69,42a ±0,05	0,26b ± 0,01
6	56,45b ± 0,31	61,26a ± 0,11	69,54a ± 0,05	0,32a ± 0,02

Prikazani rezultati su srednja vrijednost ± standardna devijacija; razlike vrijednosti unutar stupca označene istim slovom (a, b, c) nisu statistički značajne ($p < 0,05$).

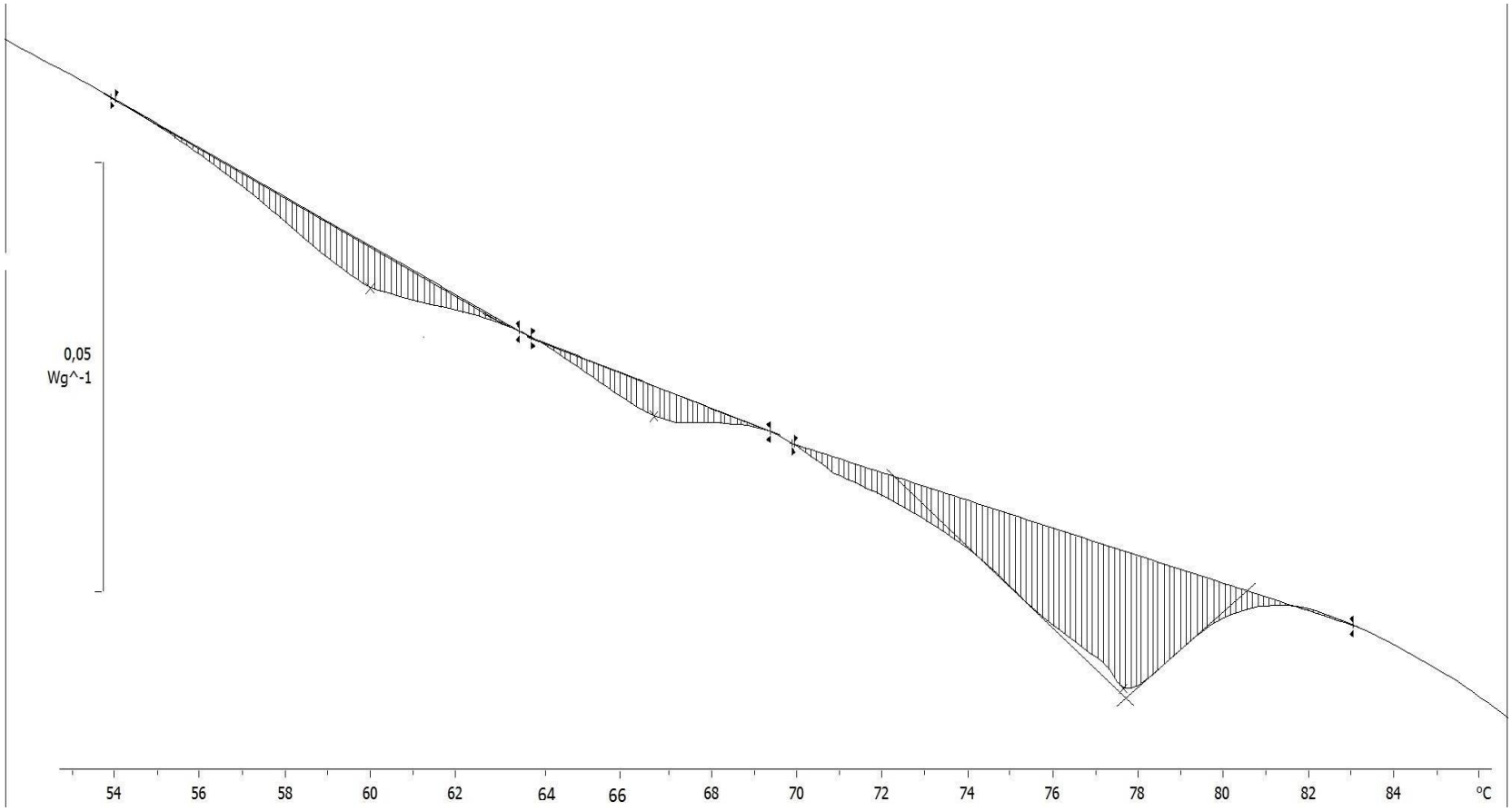
Tablica 7. Temperature denaturacije (T_o, T_p, T_e) i entalpija denaturacije (ΔH) aktina uzoraka goveđeg mesa pomiješanog s različitim masenim udjelima β-glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C

***w* β-glukana (%)**	**T_o (°C)**	**T_p (°C)**	**T_e (°C)**	**ΔH_a (J g^{-1})**
0	70,71c ± 0,08	77,38b ± 0,04	82,63a ± 0,12	0,10a ± 0,01
2	70,93c ± 0,15	77,41b ± 0,01	80,63b ± 0,08	0,09a ± 0,01
4	71,68b ± 0,05	77,43b ± 0,13	81,07c ± 0,03	0,08a ± 0,01
6	72,29a ± 0,03	77,70a ± 0,03	81,47b ± 0,08	0,08a ± 0,01

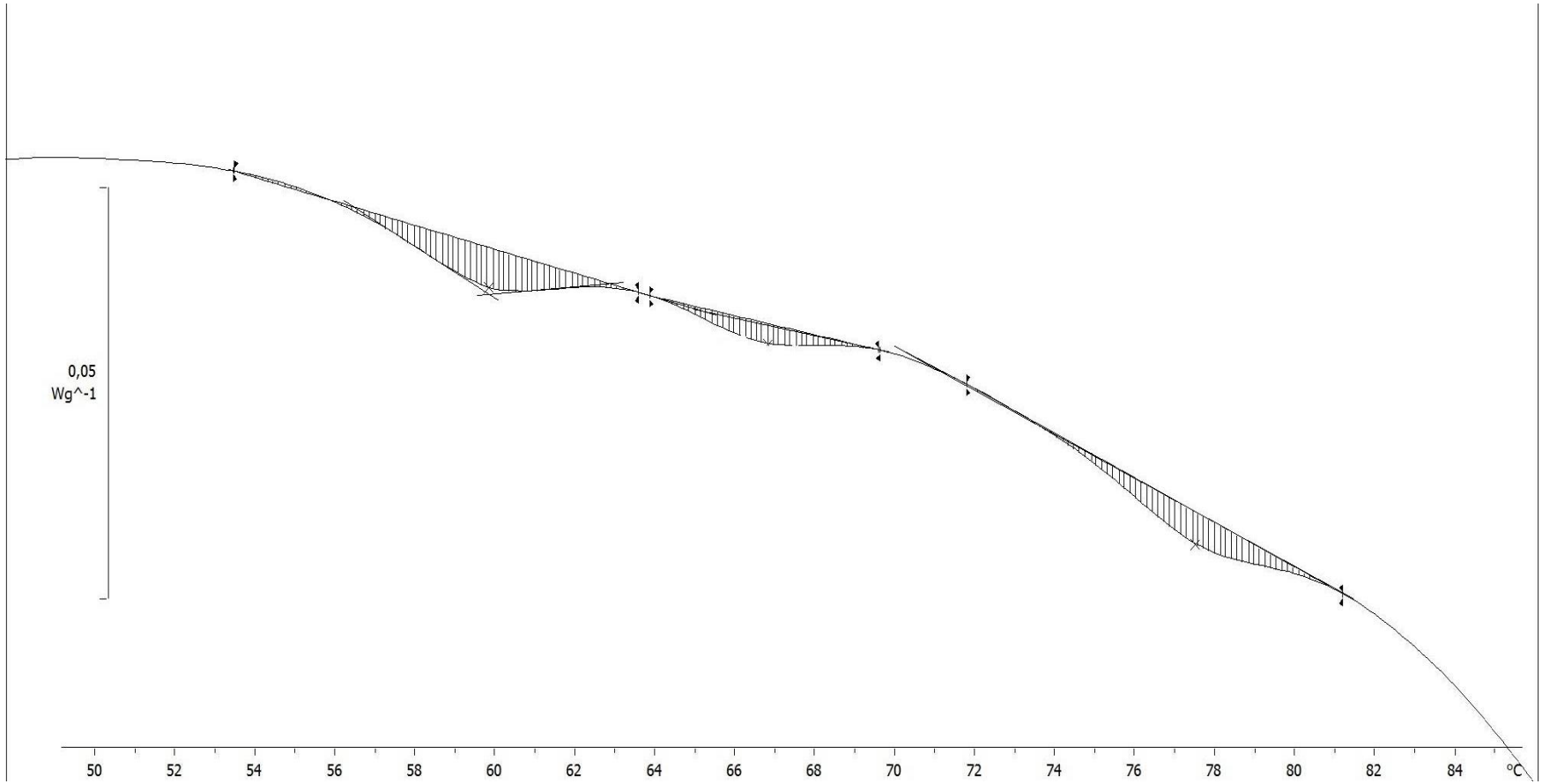
Prikazani rezultati su srednja vrijednost ± standardna devijacija; razlike vrijednosti unutar stupca označene istim slovom (a, b, c) nisu statistički značajne ($p < 0,05$).



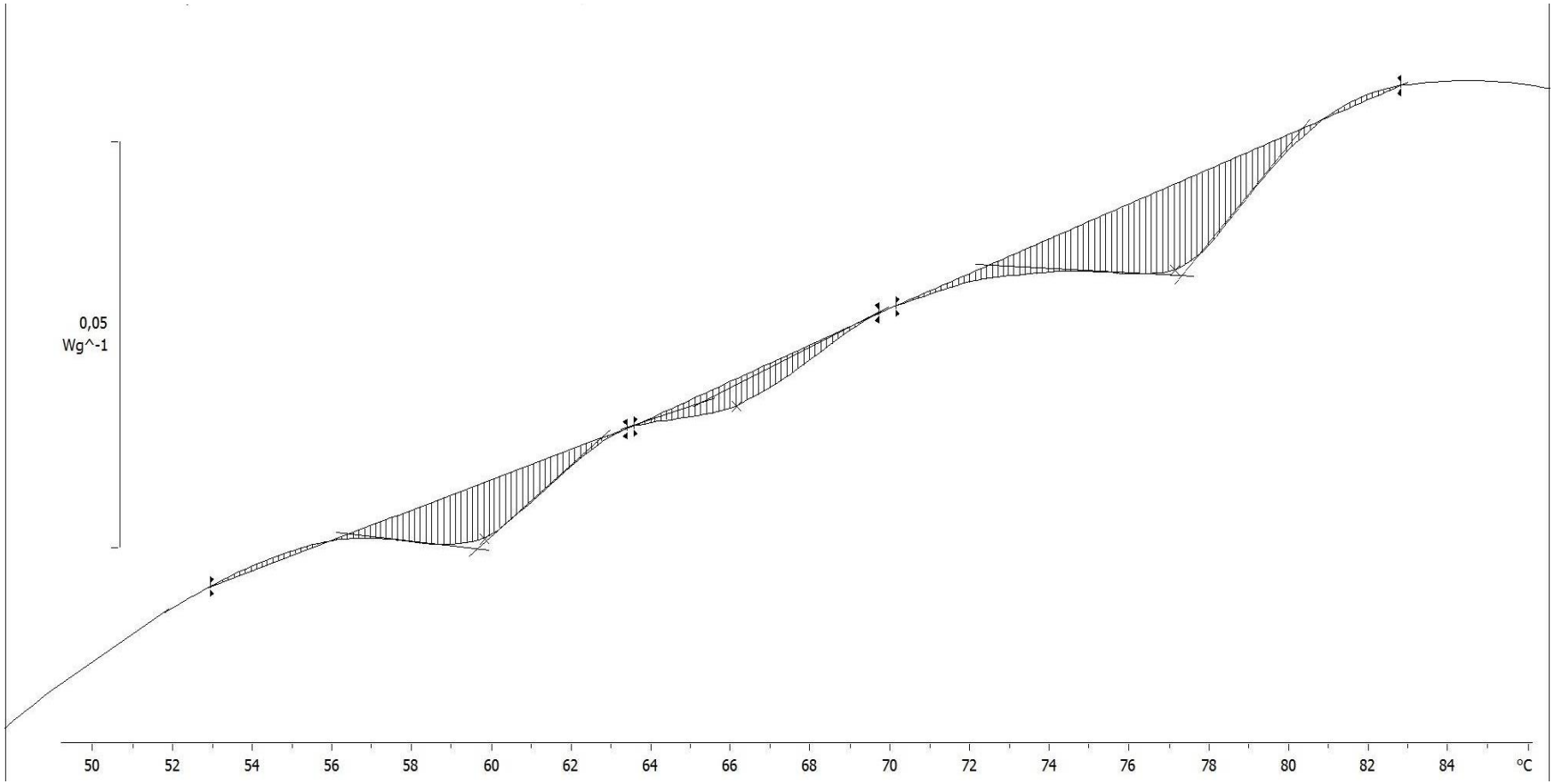
Slika 14. DSC termogram uzoraka goveđeg mesa nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C



Slika 15. DSC termogram uzoraka goveđeg mesa pomiješanih s β-glukanom (w = 2%) nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C



Slika 16. DSC termogram uzoraka goveđeg mesa pomiješanih s β-glukanom (w = 4%) nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C



Slika 17. DSC termogram uzoraka goveđeg mesa pomiješanih s β-glukanom (w = 6%) nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C

5. RASPRAVA

Rezultati mjerenja pH vrijednosti uzoraka goveđeg mesa prikazani su u **Tablici 1,** također je prikazan osnovni kemijski sastav mesa, te aktivitet vode. U **Tablici 2** su rezultati mjerenja pH vrijednosti uzoraka goveđeg mesa s različitim masenim udjelima β-glukana (w = 0 – 6%) nakon 30 dana skladištenja pri -30 °C. Kao što je prikazano, porast masenog udjela β-glukana nije statistički značajno (P > 0,05) utjecao na pH vrijednost uzoraka goveđeg mesa.

Kalo kuhanja goveđeg mesa s različitim masenim udjelima β-glukana (w = 0 – 6%) nakon 30 dana skladištenja pri -30 °C, izračunat kao postotak početne mase uzoraka (mase prije kuhanja), prikazan je u **Tablici 3** dok je na **Slici 13** prikazana je grafička ovisnost kala kuhanja o masenom udjelu β-glukana. Porast masenog udjela β-glukana u uzorcima (w = 0 – 6%) rezultirao je statistički značajnim (P < 0,05) smanjenjem kala kuhanja.

Rezultati dobiveni analizom profila teksture uzoraka gelova miofibrilarnih proteina goveđeg mesa pomiješanih s β-glukanom nakon 30 dana skladištenja pri -30 ^{o}C prikazani su u **Tablici 4**. Vidljivo je da je povećanje masenog udjela β-glukana u uzorcima doveo do statistički značajnog (P < 0,05) porasta vrijednosti parametara tvrdoće i otpora žvakanju ispitivanih uzoraka, dok nije imalo statistički značajan (P < 0,05) utjecaj na vrijednosti elastičnosti i kohezivnosti.

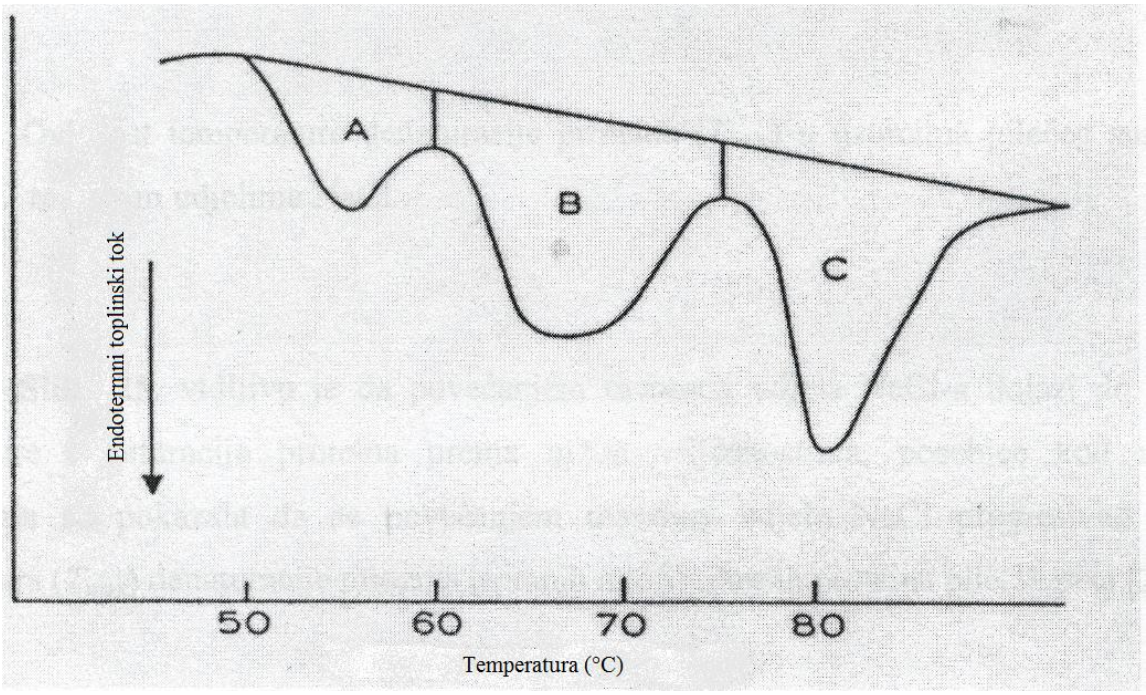
Tablica 5 prikazuje rezultate instrumentalnog određivanje boje uzoraka goveđeg mesa s različitim masenim udjelima β-glukana (w = 0 – 6%) nakon 30 dnevnog skladištenja pri -30 ^{o}C. Mjerene su L*, a* i b* koordinate, dok je vrijednost W izračunata izrazom L* - 3b*. Općenito zahtjevi koji se odnose na gelove miofibrilarnih proteina uključuju visoku svjetlinu (L*) i bjelinu (W) te nisku vrijednost žute obojenosti (b*)(Tabilo-Munizaga i Barbosa-Canovas, 2004). Dodatak β-glukana rezultirao je porastom vrijednosti svjetline (L*) i bjeline (W) uzoraka.

DSC mjerenja su provedena s uzorcima goveđeg mesa temperaturnom rasponu od 25 do 95 ^{o}C s brzinom zagrijavanja od 10 ^{o}C min^{-1}. Nakon pripreme uzorcima goveđeg mesa dodan je

β-glukan u masenim udjelima koji se kreću od 0 do 6%. Uzorci su zamrznuti brzim postupkom u struji tekućeg dušika i uskladišteni 30 dana pri -30 °C nakon čega su provedena DSC mjerenja.

Konstrukcijsko rješenje DSC uređaja omogućava brzu i efikasnu kontrolu parametara koji definiraju način i uvjete mjerenja. Velika osjetljivost mjerenja i neposredno (*on-line*) praćenje računalom omogućava jednostavno prikupljanje i obradu podataka te grafičku interpretaciju rezultata.

Termogrami analiziranih uzoraka goveđeg mesa s dodatkom β-glukana u masenim udjelima od 0 do 6% prikazani su na **Slikama 14 – 17**. Sukladno standardnom DSC-termogramu mišićnog tkiva (**Slika 18**) pikovi u termogramima (**Slike 14 – 17**). predstavljaju endotermne reakcije denaturacije miozina i aktina. (Bircan i Barringer, 2002.; Aktas i sur., 2005.; Fernandez-Martin, 2007.).



Slika 18. Standardni DSC – termogram mišićnog tkiva (A - entalpija denaturacije miozina, B - entalpija denaturacije sarkoplazmatskih proteina i kolagena, C -entalpija denaturacije aktina).

Iz DSC termograma (**Slika 14 – 17)** određene su temperature denaturacije miofibrilarnih proteina (T_p). Temperature denaturacije miozina i aktina uzoraka goveđeg mesa s obzirom na maseni udio β-glukana (w = 0 - 6%) pokazuju linearno povećanje od 59,62°C do 61,26°C i od 77,38 °C do 77,80°C (**Tablica 6, Tablica 7**).

Vrijednosti entalpije, određene su pomoću STAR^e *software-a*, te predstavljaju integriranu površinu ispod vrha DSC termograma (**Slika 14 – 17**). Vrijednosti entalpija denaturacije (ΔH) miozina i aktina uzoraka goveđeg mesa pomiješanih s β-glukanom (w = 0 – 6%) nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30°C su prikazane u **Tablici 6** i **Tablici 7**. Povećanjem masenog udjela β-glukana u uzorcima goveđeg mesa (w = 0 – 6%) entalpije denaturacije (ΔH) miozina i aktina su se statistički značajno ($P < 0,05$) povećale (**Tablica 6**, **Tablica 7)**. Budući da su vrijednosti entalpija denaturacije (ΔH) izravno povezane s količinom nativnih proteina, više vrijednosti entalpija denaturacije (ΔH) upućuju na zaključak da β-glukan sukladno mehanizmu krioprotekcije, ulazi u interakcije s miofibrilarnim proteinima goveđeg mesa, što rezultira povećanjem masenog udjela nesmrzljive vode, višim temperaturama denaturacije T_p i većim vrijednostima entalpije denaturacije miofibrilarnih proteina. Veći maseni udio vezane vode u uzorcima rezultira boljim očuvanjem miozina i aktina tijekom zamrzavanja i skladištenja u smrznutom stanju, odnosno većom entalpijom denaturacije.

6. ZAKLJUČCI

DSC termogrami uzoraka goveđeg mesa sastojali su se od pikova karakterističnih za mišićno tkivo i opisuju endotermne reakcije denaturacije miozina i aktina.

DSC analize pokazale su statistički značajno ($P < 0,05$) povećanje vrijednosti temperatura denaturacije (T_p) te povećanje vrijednosti entalpija denaturacije (ΔH) miozina i aktina u uzorcima goveđeg mesa pomiješanog s različitim masenim udjelima β-glukana ($w = 0 – 6\%$). Povećanja navedenih vrijednosti su ovisna, odnosno, funkcija povećanja masenog udjela β-glukana u uzorcima goveđeg mesa. Linearno povećanje temperatura denaturacije (T_p) i povećanje vrijednosti entalpija denaturacije (ΔH) miozina i aktina rezultat su krioprotektorskog djelovanja β-glukana.

Entalpije denaturacije miozina uzoraka goveđeg mesa pri svim masenim udjelima β-glukana pokazuju značajnije povećanje u odnosu na entalpije denaturacije aktina što navodi na zaključak da β-glukan ima bolji krioprotektorski učinak na miozin.

Osim porasta vrijednosti temperatura denaturacije (T_p) i povećanja vrijednosti entalpija denaturacije (ΔH) miozina i aktina, porastom udjela β-glukana došlo je i do statistički značajnog ($P < 0,05$) porasta nekih parametara profila teksture (tvrdoća i otpor žvakanju), te porasta parametara instrumentalnog određivanja boje (L^*, W) što također ukazuje na interakciju β-glukana s miofibrilarnim proteinima, odnosno krioprotektorsko djelovanje.

7. LITERATURA

1. Ahmad A, Anjum FM, Zahoor T, Nawaz H, Ahmed Z: Extraction and characterization of β-D-glucan from oat for industrial utilization. *International Journal of Biological Macromolecules* 46:304-309, 2010.

2. Aktas N, Aksu MI, Kaya M: Changes in myofibrillar proteins during processing of pastirma (Turkish dry meat product) produced with commercial starter cultures. *Food Chemistry* 90:649-654, 2005.

3. Benito Román O, Alonso E, Lucas S: Optimization of the b-glucan extraction conditions from different waxy barley cultivars. *Journal of Cereal Science* 53:271-276, 2011.

4. Bircan C, Barringer SA: Determination of protein denaturation of muscle foods using the dielectric properties. *Journal of Food Science* 67:202-205, 2002.

5. Čunko D: Određivanje entalpije pilećeg surimija diferencijalnom motridbenom kalorimetrijom. *Diplomski rad.* Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2004.

6. Farkas J, MohacsiFarkas C: Application of differential scanning calorimetry in food research and food quality assurance. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 47:1787-1803, 1996.

7. Fernandez-Martin F: Bird muscles under hydrostatic high pressure/temperature combinations - A DSC evaluation, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 87:285-290, 2007.

8. Herrera JR, Mackie IM: Cryoprotection of frozen stored actomyosin or formed rainbow trout by some sugars and polyols. *Food Chemistry* 84:91-97, 2004.

9. http://www.msm.cam.ac.uk/phase-trans/2002/Thermal2.pdf (17. 6. 2015.)

10. Jovanovac B: Krioprotektorsko djelovanje trehaloze na miofibrilarne proteine pilećeg mesa. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2009.

11. Kovačević D, Mastanjević K: Cryoprotective effect of trehalose on washed chicken meat, *Journal of Food Science. Technol.* 51(5):1006–1010, 2014.

12. Lenardić M: Djelovanje κ – karagena na početnu temperaturu zamrzavanja surimija srdele. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2006.

13. Lovrić T: Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inžženjerstva, Hinus, Zagreb, 2003.

14. Mastanjević K: Određivanje krioprotektorske djelotvornosti trehaloze na različite uzorke mesa. *Doktorski rad.* Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.

15. .Morin, LA, Temelli, F, McMullen, L: Interactions between meat proteins and barley (Hordeum spp.) β-glucan within a reduced-fat breakfast sausage system. *Meat Science* 68: 419–430, 2004.

16. Pandžić S: Beta glukan - dodatak prehrani i funkcionalna komponenta hrane. *Završni rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.

17. Popović T: Određivanje β-glukana u domaćim sortama ječma. *Diplomski rad.* Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2012.

18. Preedy VR, Watson RR, Patel VB: Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention, Elsevier Inc., San Diego, USA, 2011.

19. Tabilo-Munizaga G, Barbosa-Canovas, GV: Color and textural parameters of pressurized and heat-treated surimi gels as affected by potato starch and egg white. *Food Research International* 37:767–775, 2004.

20. Tomaniak A, Tyszkiewicz I, Komosa J: Cryoprotectans for frozen red meats. *Meat Science* 50:365-371, 1998.

21. Van der Plaats G: The Practice of Thermal Analysis. *Mettler Toledo*, 1992.

22. Xiong YL: Protein Denaturation and Functionality Losses. U: *Quality in frozen food*. M. C. Erikson, Y.-C. Hung (ur.), Chapamn&Hall, New York, 111-13, 1997.