

Krirotektorsko djelovanje β -glukana na miofibrilarne proteine pilećeg surimija

Friščić, Stjepan

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:109:086384>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Stjepan Friščić

**KRIOPROTEKTORSKO DJELOVANJE β -GLUKANA NA
MIOFIBRILARNE PROTEINE PILEĆEG SURIMIJA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2015.

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 prerade sirovina animalnog podrijetla
Tema rada je prihvaćena na VII. sjednici Fakultetskog vijeća
Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28.4.2015.
Mentor: Krešimir Mastanjević, doc. dr. sc.
Pomoć pri izradi:

KRIOPROTEKTORSKO DJELOVANJE β -GLUKANA NA MIOFIBRILARNE PROTEINE PILEĆEG SURIMIJA

Stjepan Friščić, 222-DI

Sažetak:

Diferencijalnom motridbenom kalorimetrijom (DSC) određivana je krioprotektorska djelotvornost β -glukana na miofibrilarne proteine pilećeg surimija. Također, odredio se utjecaj dodatka β -glukana ($w = 0 - 6\%$) na parametre profila teksture, instrumentalno određene boje i kalo kuhanja uzoraka pilećeg surimija nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Uzorci pilećeg surimija pripremljeni su u laboratorijskim uvjetima od mesa pilećih prsa, pomiješani su u različitim masenim omjerima s β -glukanom ($w = 0 - 6\%$), zamrznuti brzim postupkom i uskladišteni 30 dana na temperaturi od $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Temperature početka denaturacije (T_o), temperature denaturacije (T_p) i temperature završetka denaturacije (T_e) te promjene entalpije denaturacije ΔH određene su iz DSC termograma. Diferencijalna motridbena kalorimetrija (DSC) je pokazala da povećanje masenog udjela β -glukana rezultira statistički značajnim ($P < 0,05$) pomakom temperature denaturacije miozina i aktina prema višim vrijednostima. Povećanje masenog udjela β -glukana rezultiralo je statistički značajnim ($P < 0,05$) povećanjem vrijednosti promjena entalpija denaturacije ΔH miozina i aktina. Dodatak β -glukana ($w = 0 - 6\%$) je statistički značajno ($P < 0,05$) utjecao i na parametre instrumentalno 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 ($w = 0 - 6\%$). Kohezivnost i elastičnost gelova pilećeg surimija nisu pokazale statistički značajnu ($P > 0,05$) ovisnost o dodatku β -glukana ($w = 0 - 6\%$). S obzirom da su vrijednosti promjena entalpija denaturacije ΔH u izravnoj vezi s količinom nedenaturiranih proteina, više vrijednosti ΔH upućuju na moguće krioprotektorsko djelovanje β -glukana na miofibrilarne proteine pilećeg surimija.

Ključne riječi: pileći surimi, krioprotekcija, DSC, β -glukan

Rad sadrži: 54 stranica
21 slika
8 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 Animal-Based Raw Materials
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. VII. held on april 28, 2015.
Mentor: *Krešimir Mastanjević*, PhD, assistant prof.
Technical assistance:

CRYOPROTECTIVE EFFECT OF β -GLUCAN ON MYOFIBRILLAR PROTEINS OF CHICKEN SURIMI

Stjepan Friščić, 222-DI

Summary:

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to study cryoprotective effects of β -glucan on myofibrillar proteins of chicken surimi. Also, influence of β -glucan ($w = 0 - 6\%$) on texture profile analysis parameters, instrumental colour parameters and cooking loss of chicken surimi samples after 30 days of storage in the frozen state ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) was determined. Chicken surimi samples were prepared in the laboratory conditions from chicken breast meat, mixed with different mass fractions of β -glucan ($w = 0 - 6\%$), quickly frozen and stored for 30 days on $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Onset temperature of transition (T_o), peak thermal transition (T_p) and endset temperature of transition (T_e) and denaturation enthalpy (ΔH) were evaluated. Differential scanning calorimetry (DSC) showed a significant ($P < 0,05$) shift to higher values in peak thermal transition temperature (T_p) of myosin and actin as the mass fraction of β -glucan increases. The transitions enthalpies of myosin and actin of chicken surimi samples increased significantly ($P < 0,05$) with the increase of mass fraction of β -glucan. Instrumental colour parameters (lightness (L^*), redness (a^*), yellowness (b^*) and whiteness ($L^* - 3b^*$)) were significantly ($P < 0,05$) affected by addition 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 chicken myofibrillar gels were not significantly ($P > 0,05$) affected by addition β -glucans ($w = 0 - 6\%$). Since the value of denaturation enthalpy is directly related to amount of native proteins, higher values of ΔH indicates to the possible cryoprotective effects of β -glucan on chicken myofibrillar proteins.

Key words: *Chicken surimi, cryoprotection, DSC, β -glucan*

Thesis contains: 54 pages
21 figures
8 tables
0 supplements
22 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Dragan Kovačević</i> , PhD, full prof. | chair person |
| 2. <i>Krešimir Mastanjević</i> , PhD, assistant prof. | Supervisor |
| 3. <i>Marko Jukić</i> , PhD, associate prof. | Member |
| 4. <i>Daliborka Koceva Komljenić</i> , 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 se svom mentoru doc. dr. sc. Krešimiru Mastanjeviću na predloženoj temi te na strpljenju, pomoći i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.

Najveća hvala mojim dragim roditeljima Dragutinu i Marici koji su mi omogućili studiranje i bili uz mene u svim lijepim i teškim trenucima te bratu. Također zahvaljujem svojim prijateljima koji su mi učinili studentske dane nezaboravnim i bili mi podrška kad mi je bilo najteže.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. B-GLUKAN.....	4
2.1.1. Podjela glukana	5
2.1.2. Djelovanje i svojstva β -glukana	6
2.1.3. Izvori i vrste β -glukana.....	6
2.1.4. Utjecaj β -glukana na šećernu bolest.....	7
2.1.5. Utjecaj β -glukana na kardiovaskularni sustav	7
2.1.6. Utjecaj β -glukana na imunološki sustav.....	8
2.1.7. Hrana obogaćena β -glukanima.....	9
2.1.8. Utjecaj obrade hrane na biološku aktivnost β -glukana.....	9
2.2. KRIOPROTEKCIJA I KRIOSTABILIZACIJA MIOFIBRILARNIH PROTEINA TIJEKOM ZAMRZAVANJA I SKLADIŠTENJA U SMRZNUTOM STANJU	10
2.2.1. Zamrzavanje.....	10
2.2.2. Veličina kristala leda.....	10
2.2.3. Krioprotektori	11
2.3. DENATURACIJA MIOFIBRILARNIH PROTEINA PRI NISKIM TEMPERATURAMA.....	14
2.3.1. Miofibrilarni proteini	14
2.4. DIFERENCIJALNA MOTRIDBENA KALORIMETRIJA (DSC)	16
2.4.1. DSC toplinskog toka (" <i>Heat-flux DSC</i> ").....	17
2.4.2. DSC kompenziranog toplinskog toka (" <i>Power compensation DSC</i> ").....	18
2.4.3. Primjena diferencijalne motridbene kalorimetrije (DSC)	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. ZADATAK	21
3.2. MATERIJALI I METODE	21
3.2.1. Priprema uzoraka pilećeg mesa	21

3.2.2.	Određivanje temperature i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina uzoraka pilećeg surimija.....	24
3.2.3.	Određivanje pH vrijednosti i osnovnog kemijskog sastava.....	29
3.2.4.	Određivanje aktiviteta vode (a_w) i profila teksture.....	30
3.2.5.	Određivanje mase uzoraka pilećeg surimija prije i nakon kuhanja	32
3.2.6.	Određivanje koordinata boje u CIE- $L^*a^*b^*$ sustavu	33
3.2.7.	Statistička obrada rezultata.....	34
4.	REZULTATI	35
5.	RASPRAVA	45
6.	ZAKLJUČCI.....	50
7.	LITERATURA	52

Popis oznaka, kratica i simbola

a_w	aktivitet vode
DSC	diferencijalna motridbena kalorimetrija
DTA	diferencijalna termička analiza
T_e	završna temperatura denaturacije
T_o	početna temperatura denaturacije
T_p	temperatura denaturacije
w	maseni udio
PPG	postprandijalna glukoza
ΔH	entalpija denaturacije

1. UVOD

U današnje vrijeme jedna od najčešće korištenih metoda konzerviranja hrane je postupak zamrzavanja i skladištenja u smrznutom stanju pri čemu se, gotovo na neodređeno vrijeme, održava mikrobiološka i biokemijska stabilnost hrane.

Tijekom zamrzavanja mesa, neovisno o brzini zamrzavanja, zbog manje koncentracije otopljenih tvari (npr. mineralnih soli, aminokiselina itd.) prvo kristalizira ekstracelularna tekućina, odnosno T_i ekstracelularne tekućine postiže se pri višim temperaturama zamrzavanja, zbog čega stanična tekućina difundira izvan stanice i doprinosi rastu ekstracelularnih kristala leda. Gubitkom vode iz staničnih struktura koja u normalnim uvjetima djeluje kao svojevrsna mehanička barijera između proteinskih lanaca, dolazi do spontanijih interakcija proteina koje uglavnom rezultiraju koagulacijom (denaturacijom).

Sprečavanje denaturacije i očuvanje sposobnosti želiranja miofibrilarnih proteina tijekom zamrzavanja i skladištenja u smrznutom stanju mesa i ribe, najčešće se postiže dodatkom različitih krioprotektora. Krioprotektori su najčešće ugljikohirati, koji u hrani povećavaju maseni udio vezane (nesmrzljive) vode koja pri komercijalnim temperaturama zamrzavanja služi kao mehanička barijera i sprječava koagulaciju funkcionalnih proteina.

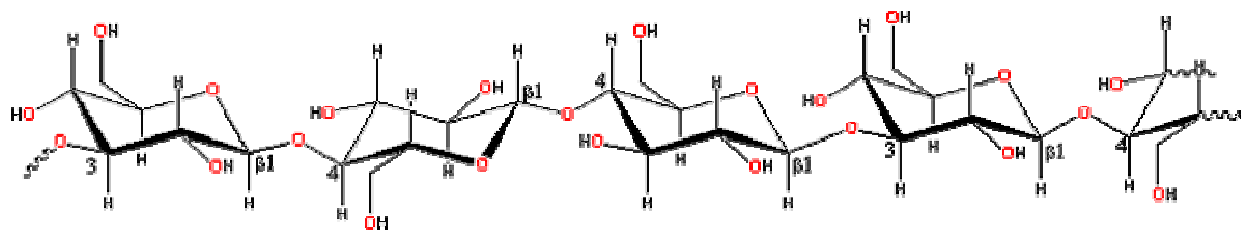
β -glukani su sastavljeni od molekula glukoze, koje mogu biti povezane β -(1,3), (1,4) i (1,6) glikozidnom vezom. (1,3), (1,4)- β -D-glukani se najčešće izoliraju iz žitarica, ječma i zobi. Novija istraživanja su pokazala da dodatak β -glukana iz ječma povećava entalpiju denaturacije miofibrilarnih proteina mesnog tijesta, što može značiti da β -glukani ulaze u interakcije s proteinima mesa, dodatno ih hidratiziraju i stabiliziraju (Morin i sur. 2004).

U ovom radu diferencijalnom motridbenom kalorimetrijom određene su temperature i entalpije denaturacije proteina uzoraka pilećeg surimija koji su u različitim omjerima pomiješani sa β -glukanom ($w = 0 - 6\%$), nakon jednomjesečnog skladištenja pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. B-GLUKAN

Glukani su heterogena skupina linearnih, dugolančanih, nerazgranatih polisaharida nastalih polimerizacijom monomera D-glukoze glikozidnim vezama. Molekula glukana sastoji se od glavnog lanca građenog od β -(1 $\rightarrow$ 3) povezanih β -D-glukopiranoznih jedinica sa β -(1 $\rightarrow$ 4 i/ili 1 $\rightarrow$ 6) povezanim bočnim lancima različitog rasporeda i dužine. Njihove se biološke aktivnosti međusobno razlikuju ovisno o kemijskoj strukturi, izvoru iz kojeg su izolirani i o primjenjenoj metodi izolacije (Stone, Clarke, 1992). Ovi spojevi mogu biti α - i β -konfiguracije.



Slika 1. β -glukan

β -glukani su polimeri glukoze (β -glukopiranoze) u kojima su glukozne jedinice povezane glikozidnim vezama između hemiacetalnog kisika na C-1 atomu jednog monosaharidnog ostatka i jedne od četiriju hidroksilnih skupina vezanih na C-2, C-3, C-4 ili C-6 atomu drugog monosaharidnog ostatka. β -glukani formiraju „crvolike” cilindrične makromolekule od oko 250.000 glukoznih monomera koji mogu stvarati poprečne veze u prostoru u kojem se nalaze celotrioze jedinice. Tako stvaraju termoreverzibilne beskonačne mreže gelova. Preko 90% β -(1 $\rightarrow$ 4) veza su između celotriozil i celotetraozil jedinica koje su pak povezane pojedinačnim β -(1 $\rightarrow$ 3) vezama.

Desetljećima poznati kao sastavnice stanične stijenke nekih patogenih bakterija, pekarskog kvasca, brojnih vrsta gljiva, morskih stelnjaka (smeđe i dijatomejske alge) te biljaka (posebice trave), uglavnom su istraživani na laboratorijskim glodavcima (ali i na brojnim vrstama beskralješnjaka i kralješnjaka, uključujući i čovjeka) radi utvrđivanja njihovih potencijala za uporabu u humanoj medicini. Tako se primjerice u tradicijskoj medicini u Japanu još od 1980. godine rabe β -glukani izdvojeni iz dviju vrsta gljiva (šitake i maitake) za liječenje tumora (Špoljarić, Fumić i suradnici, 2011).

Primjena različitih β -glukana je u medicini i farmaciji te u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Mogu se koristiti i u veterinarskoj medicini i proizvodnji krmiva. Najčešće spominjano svojstvo β -glukana je imunostimulacija. Broj različitih β -glukana je veliki skoro

kao i broj izvora korištenih za njihovu izolaciju, a unatoč brojnim istraživanjima nemoguće je reći da je samo jedan određeni glukan optimalni imunomodulator (Vetvicka, 2001).

Prema nekim autorima, najaktivniji su razgranati β -1,3-D-glukani, koji se ponekad nazivaju (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glukani, a često se u literature skraćeno navode samo kao (1 $\rightarrow$ 3)- β -glukani. Svi oni imaju zajedničku strukturu, glavni lanac, koji se sastoji od (1 $\rightarrow$ 3)- povezanih β -D-glukopiranozil jedinica, uzduž kojega su nasumce smještene β -D-glukopiranozil jedinice vezane 1 $\rightarrow$ 6- vezama. Strukture i konformacije ovih polimera variraju, kao i njihove aktivnosti (V. Petravić-Tominac, V. Zechner-Krpan i suradnici, 2009).

Za biološku aktivnost ove skupine spojeva važni su različiti fizikalno - kemijski čimbenici kao što su npr. primarna struktura, molna masa, razgranatost, konformacija, naboj polimera, topljivost, dimenzija čestica netopljivih β -glukana (Tziabanos, 2000, Vetvicka, 2001).

2.1.1. Podjela glukana

U glukane ubrajamo:

- celulozu (β -1 $\rightarrow$ 4-glukan),
- laminarin (β -1 $\rightarrow$ 3- i β -1 $\rightarrow$ 6-glukan),
- kurdlan (β -1 $\rightarrow$ 3-glukan),
- krizolaminaran (β -1 $\rightarrow$ 3-glukan),
- fikarin (β -1 $\rightarrow$ 3-glukan),
- pululan (α -1 $\rightarrow$ 4- i α -1 $\rightarrow$ 6-glukan),
- škrob (α -1 $\rightarrow$ 4- i α -1 $\rightarrow$ 6-glukan),
- glikogen (α -1 $\rightarrow$ 4- i α -1 $\rightarrow$ 6-glukan),
- dekstran (α -1 $\rightarrow$ 6-glukan),
- lentinan i lihenin.

Ove strukturne razlike makromolekula glukana mogu imati značajan utjecaj na njihovu biološku djelotvornost. Primjerice, razlike u dužini polisaharidnih lanaca, razmjer njihova grananja i dužina tih grana određuju različitost u iscrpcima koji se mogu izdvojiti iz različitih izvora, kao i različitost u molekularnim masama.

2.1.2. Djelovanje i svojstva β -glukana

In vitro istraživanja su pokazala da β -glukani velike molekularne mase (npr. zimosan) mogu izravno aktivirati leukocite na fagocitozu, citotoksičnost i mikrobicidnost, dok oni manje i vrlo male molekularne mase (npr. gluklan fosfat i laminarin) pokazuju biološku aktivnost *in vivo*, ali su njihovi učinci na stanice domaćina nejasni ili ih nema (V. Petravić-Tominac, V. Zechner-Krpan i suradnici, 2009).

Glukani su otporni na enzimsku i kiselinsku razgradnju u ustima i netopivi su u vodi (zimosan). Uglavnom se rabe kao zamjena mastima, a prepoznati su i kao protuinfekcijska i protutumorska sredstva, ali i po drugim učincima na zdravlje (snižavanju kolesterola i triglicerida i normalizaciji razine šećera u krvi) i reparativne/regenerativne procese (V. Petravić-Tominac, V. Zechner-Krpan i suradnici, 2009).

2.1.3. Izvori i vrste β -glukana

Postoje brojni izvori u prirodi iz kojih su izdvojeni β -glukani. β -glukani su desetljećima poznati u znanosti kao sastojci (polisaharidi) brojnih biljnih vrsta, posebice iz porodice trava (*Gramineae*).

Posije vrsta, kao što su ječam, zob, raž i pšenica, sadrže od 1% do 7% β -glukana. U kineskoj tradicijskoj medicini poznate su biljne vrste *Astragalus membranaceus* (*Leguminosae*) i *Cnidium officinale* (*Umbelliferae*) iz kojih su izdvojeni β -glukani. Također ih sadrže i brojne vrste morskih algi. Tako su glukani izdvojeni iz vrsta smeđih algi – laminarija (*Laminaria digitata* i *L. hyperborea*) nazvani fikarin, laminarin i fukoidan, a pričuvni glukani koje proizvode vrste dijatomejskih algi (*Skeletonema costatum*, *Chaetoceros mülleri*, *C. debilis*, *Thalassiosira weissfloggi*, *T. pseudonana*) nazvani su krizolaminarani. Treba istaknuti da su morski ekosustavi, posebice morske alge, najbogatiji izvor glukana iz razloga jer su još uglavnom nedirnuti ili samo neznatno korišteni. Među morskim algama su i brojni arhetipovi prilagođenih na život u ekstremnim uvjetima (Vetvicka i Yvin, 2004., Vetvicka i sur., 2007).

Različiti oblici glukana izdvojeni su i iz pivskog i pekarskog kvasca te brojnih vrsta gljiva. Stanična stijenka pekarskog kvasca sastoji se od tri sloja: unutarnjeg koji je građen od netopivog β -glukana (30 – 35%), srednjeg građenog od topivog β -glukana (20 - 22%) i vanjskog glikoproteinskog dijela (30%) (Tokunaka i sur., 2000).

U istraživanjima najčešće rabljeni β -glukani iz pekarskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* su gluklan fosfat, PGG-glukan i zimosan.

Miceliji vrsta gljiva šitake (*Lentinus edodes*), maitake (*Grifola frondosa*), šizofilan (*Shizophyllum commune*), bijele truleži (*Sclerotinia sclerotiorum*) i njezinih srodnika (*S. glaucum* i *S. rolfii*), potom plemenite pečurke ili šampinjona (*Agaricus bisporus*) i njezinih srodnika (*A. blazei*, *A. sylvaticus*), kovrčaste kokice (*Sparassis crispa*), bukovače (*Pleurotus ostreatus*) i mešimakobu gljive (*Phellinus linteus*), sadrže β -glukane nazvane prema njihovim izvorima: lentinan, grifolan, šizofilan, SSG-glukan, skleroglukan ili manan. Makromolekule β -glukana su, uz glikoproteine i hitin, sastavnice stanične stijenke tih vrsta gljiva (Špoljarić, Fumić i suradnici, 2011).

Sastavnice stanične stijenke nekih patogenih vrsta gljivica, kao što su *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum* i *Candida albicans* također su β -glukani.

β -glukani (posebice kurdlan) izdvojeni su i iz stanične stijenke bakterije *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, kao i iz brojnih drugih bakterijskih vrsta i njihovih mutanata. Glukani nisu nađeni u životinja.

2.1.4. Utjecaj β -glukana na šećernu bolest

Istraživanja pokazuju da β -glukani mogu pomoći pri ograničavanju porasta glukoze u krvi nakon obroka. Postoji nekoliko čimbenika koji utječu na ovo djelovanje, kao što su npr. doza, oblik hrane te veličina samog β -glukana. Veličina doze se pokazala od iznimne važnosti u djelovanju β -glukana na razinu šećera u krvi. U odnosu na ostala vlakna, relativno male količine β -glukana su potrebne za smanjenje postprandijalne glukoze (PPG) kod zdravih ljudi, ali i ljudi oboljelih od šećerne bolesti. PPG je koncentracija glukoze u krvi nakon obroka (<http://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/bioloski-aktivne-tvari/beta-glukan/>).

2.1.5. Utjecaj β -glukana na kardiovaskularni sustav

Prema istraživanjima β -glukani mogu smanjiti ukupne količine kolesterola u krvi, posebno oni izolirani iz ječma i zobi. Vrijednosti variraju i ovise o uzetoj dozi. Potrebno je napomenuti da se prestankom njihovog uzimanja razine kolesterola vraćaju na početne vrijednosti. Također, pojedina istraživanja pokazuju da β -glukani nemaju učinak na HDL kolesterol, dok druga nalaze povezanost u smislu povećanja razina HDL kolesterola. Smatra se da potrebna doza za djelovanje β -glukana na razinu kolesterola u krvi iznosi od 3 g na više. Točan mehanizam djelovanja β -glukana na metabolizam kolesterola se još ne zna. Pretpostavka je da povećavaju izlučivanje kolesterola iz probavnog trakta, tj. da povećavaju sintezu žučne kiseline.

β -glukani mogu smanjiti i krvni tlak. Posebno su se učinkoviti pokazali oni izolirani iz zobi te Shiitake i Maitake gljiva. Doze koje su se pokazale učinkovite u snižavanju krvnog tlaka se kreću između 6 g i 8 g dnevno. Dosadašnja istraživanja su provedena sa hranom koja sadrži β -glukan, a ne sa čistim β -glukanom.

2.1.6. Utjecaj β -glukana na imunološki sustav

Prema istraživanjima, β -glukani mogu modulirati naš stečeni i urođeni imunitet. To je njihovo najpoznatije svojstvo. Oni djeluju tako što mogu potaknuti funkcionalnu aktivnost makrofaga i aktivirati antimikrobnu aktivnost neutrofila. Makrofag je stanica imunološkog sustava koja uklanja patogene i otpadne tvari iz našeg organizma procesom fagocitoze. Proces započinje vezanjem na makrofage preko staničnog receptora (dektin-1), koji se nalazi i na membranama neutrofila te dendritičnih stanica. Makrofazi dalje nose β -glukane do slezene, koštane srži te limfnih čvorova, a u unutrašnjosti makrofaga β -glukani se raspadaju na manje fragmente. Ti mali fragmenti β -glukana se postupno otpuštaju iz makrofaga i preuzimaju ih granulociti (neutrofili i dendritične stanice). Neutrofili su najbrojnije bijele krvne stanice u organizmu i važan su stanični obrambeni odgovor protiv bakterija i gljivica. Na njih se β -glukani vežu preko specifičnog receptora koji se naziva komplementarni receptor 3 (CR3). Mogu se i direktno vezati na taj receptor koji se nalazi i na limfocitima te stanicama ubojicama (eng. Natural Killer Cells). Vezanje β -glukana na spomenute receptore aktivira odgovor imunskog sustava tako što pokreće lančanu reakciju kojom se oslobađaju razne aktivne tvari i aktiviraju ostale stanice imunološkog sustava.

β -glukani utječu i na kemotaksiju, odnosno povećavaju brzinu kretanja imunoloških stanica (makrofaga) prema promijenjenom tkivu i patogenima. Strukturno drugačiji β -glukani imaju različit afinitet prema navedenim receptorima. Veći i složeniji β -glukani imaju veću sposobnost modulirati imunski odgovor. β -glukani dobiveni iz kvasca, (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6), imaju veći biološki utjecaj na naš imunitet, nego oni dobiveni iz zobi ili ječma (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4). Treba naglasiti da je većina ispitivanja provedena s grubim ekstraktima β -glukana pa se utjecaj drugih spojeva u ekstraktu nemože isključiti. β -glukane ne možemo nazvati stimulatorima imuniteta, već modulatorima, s obzirom da je imunološki sustav izuzetno kompliciran i nije u potpunosti razjašnjen. Možemo samo reći da β -glukani mogu utjecati, tj. modulirati naš imunološki sustav, ali ne i da ga poboljšavaju. Treba napomenuti i da tijekom procesa fagocitoze nastaju slobodni radikali te da je potrošnja vitamina C povećana. Stoga je potreban dodatan vitamin C.

2.1.7. Hrana obogaćena β -glukanima

Radi nedovoljnog unosa vlakana, danas je sve veći trend obogaćivanja hrane različitim vrstama vlakana, uključujući i β -glukanima. β -glukan se vrlo često dodaje hrani kao funkcionalna komponenta, zahvaljujući svom izuzetno korisnom učinku na zdravlje.

To potvrđuju i zdravstvene tvrdnje koje se smiju navoditi na hrani kojoj je dodan, ali pod strogo definiranim uvjetima. Osim što povećava prehrambenu vrijednost hrane kojoj je dodan, β -glukan može poboljšati i njena senzorička svojstva. β -glukanima se obogaćuje čitav niz namirnica, kao što su žitarice, kruh, tjestenina i drugi pekarski proizvodi. S druge strane, obogaćivanje jogurta ili sira β -glukanima rezultira narušavanjem njihovih senzoričkih svojstava, unatoč tome što poboljšavaju druga reološka svojstva.

β -glukani su od posebnog značaja u proizvodnji niskomasnih mesnih proizvoda.

Zbog svoje sposobnosti da oponašaju masnoće, mogu se koristiti kao zamjena za mast, ali je prethodno potrebno provesti studije o njihovom utjecaju na senzoričke i reološke osobine mesnih proizvoda kojima su dodani (<http://www.inpharma.hr/>).

2.1.8. Utjecaj obrade hrane na biološku aktivnost β -glukana

Tijekom obrade hrane mijenjaju se fizikalna, kemijska i fiziološka svojstva vlakana. Nekoliko tehnika obrade hrane (kuhanje, smrzavanje i skladištenje) utječe na fizikalno - kemijska svojstva β -glukana. Tijekom obrade hrane može doći do promjena u molekularnoj masi, a time i topljivosti, rezultirajući promjenom fiziološke aktivnosti β -glukana. Za primjer, molekularna masa β -glukana u prerađenoj hrani koja sadrži zob manja je u odnosu na neprerađenu hranu.

Također, iako je topljivost β -glukana na početku obrade hrane povećana (jer opada stupanj polimerizacije) ona se u konačnici smanjuje jer dolazi do stvaranja netopljivih agregata β -glukana. Tijekom obrade proizvoda, kao što je zobena kaša, dolazi do gotovo neznatnih promjena u molekularnoj masi β -glukana. S druge strane, studije su pokazale da u proizvodima koji su sastavljeni od više vrsta žitarica dolazi do smanjenja molekularne mase što se pripisuje djelovanju enzima β -glukanaze, porijeklom iz pšeničnog brašna koje se koristilo u proizvodnji ispitivanih proizvoda. Zamrzavanje također utječe na topljivost β -glukana. Jedino ostaje nejasno utječu li navedene fizikalno-kemijske promjene uzrokovane

obradom hrane značajno na utvrđene pozitivne zdravstvene učinke koji se propisuju β -glukanu (<http://www.inpharma.hr/>).

2.2. KRIOPROTEKCIJA I KRIOSTABILIZACIJA MIOFIBRILARNIH PROTEINA TIJEKOM ZAMRZAVANJA I SKLADIŠTENJA U SMRZNUTOM STANJU

2.2.1. Zamrzavanje

Zamrzavanje je fizikalna metoda konzerviranja hrane, tj. proces u kojem se primjenom niskih temperature stvaraju nepovoljni uvjeti za rast i razmnožavanje mikroorganizama.

Proces zamrzavanja sprječava mikrobiološko kvarenje i minimizira kemijske i biokemijske promjene koje narušavaju kvalitetu hrane. Neprikladno skladištenje hrane u smrznutom stanju i neprilagođeni uvjeti skladištenja mogu utjecati na strukturu proteina i narušiti kvalitetu krajnjeg proizvoda (Herrera, Mackie, 2004).

Konzerviranje zamrzavanjem se temelji na dva osnovna principa: sniženju temperature namirnice i kristalizaciji i izdvajanju kemijski čiste vode. Za svakih 10 °C sniženja temperature degradabilni procesi razgradnje hrane usporavaju se dva do tri puta. Kristalizacijom dolazi do koncentriranja intracelularne i ekstracelularne tekućine, smanjenja aktiviteta vode (a_w) i blagog sniženja pH. Temperature zamrzavanja dovode do reverzibilne anabioze mikroorganizama (Kovačević, 2001).

2.2.2. Veličina kristala leda

Veličina kristala leda koji se nalaze u materijalu nakon završetka procesa zamrzavanja od značajnog je utjecaja za kvalitetu proizvoda, a u direktnoj je ovisnosti o broju molekula nastalih tokom procesa zamrzavanja: manji broj nukleusa rezultira manjim brojem većih kristala i obrnuto, što je veći broj jezgri, bit će veći broj sitnih kristala. Pošto je nukleacija funkcija pothlađivanja, veličina kristala bit će funkcija brzine zamrzavanja, tj. brzine odvođenja topline (Lovrić, 2003).

Sporo zamrzavanje uzrokuje veća oštećenja u strukturi mišića, rezultirajući smanjenjem topljivosti miofibrilarnih proteina i smanjenjem sposobnosti vezanja vode te povećanjem gubitka na masi kod odmrzavanja.

Pri brzom zamrzavanju nastaje veliki broj nukleusa kristalizacije, tj. malih kristala leda smještenih uglavnom intracelularno (Lovrić, 2003).

To rezultira sljedećim:

- uslijed prelaska vode u led i nastanka razlike tlaka intracelularne i ekstracelularne tekućine neznatna količina vode migrira izvan stanice, velika količina molekula vode ostaje zadržana u staničnim strukturama i služi kao mehanička barijera te sprječava interakcije proteinskih lanaca, tj. koagulaciju,

- mali kristali leda uzrokuju manja mehanička oštećenja tkiva u odnosu na velike,

- brzo se prelazi temperaturni interval u kojem više od 90% vode prelazi u led i u kojem su aktivni enzimi koji uzrokuju degradacijske promjene hrane (Lovrić, 2003).

Ključni faktori koji utječu na kvalitetu smrznutog mesa su: podrijetlo mesa, uvjeti hlađenja i zamrzavanja te zaštita i uvjeti skladištenja smrznutog mesa (Perez-Chabela, Mateo-Oyague, 2004). Tako npr. kod istovrsne hrane, kao što je riba ili meso, veličina i broj nastalih kristala ovisit će i o tome dali je zamrzavanje provedeno u prerigor ili postrigor stanju, a što je opet povezano sa stanjem vode u tom materijalu (odnos "slobodne" i "vezane" vode) (Lovrić, 2003).

Voda izvan mišićnih vlakana najprije se zamrzne, tada se intracelularna voda nastoji istisnuti iz mišićnog vlakna uslijed osmotskog tlaka i tako povećava koncentraciju otopljenih tvari. Posljedica toga je oštećenje mišićnih proteina koje se povećava sa produženjem vremena skladištenja i sniženjem temperature skladištenja smrznutog mesa. Dodatak krioprotektora je bitan kako bi se smanjila strukturna oštećenja tijekom zamrzavanja mesa i skladištenja u smrznutom stanju. Krioprotektori se čak mogu injektirati u žive životinje prije klanja (Perez-Chabela, Mateo-Oyague, 2004).

2.2.3. Krioprotektori

Krioprotetsko 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 dehidracije proteina, intramolekularne reakcije "oslobođenih" funkcionalnih skupina i stvaranje nepoželjnih sekundarnih produkata (koagulacija).

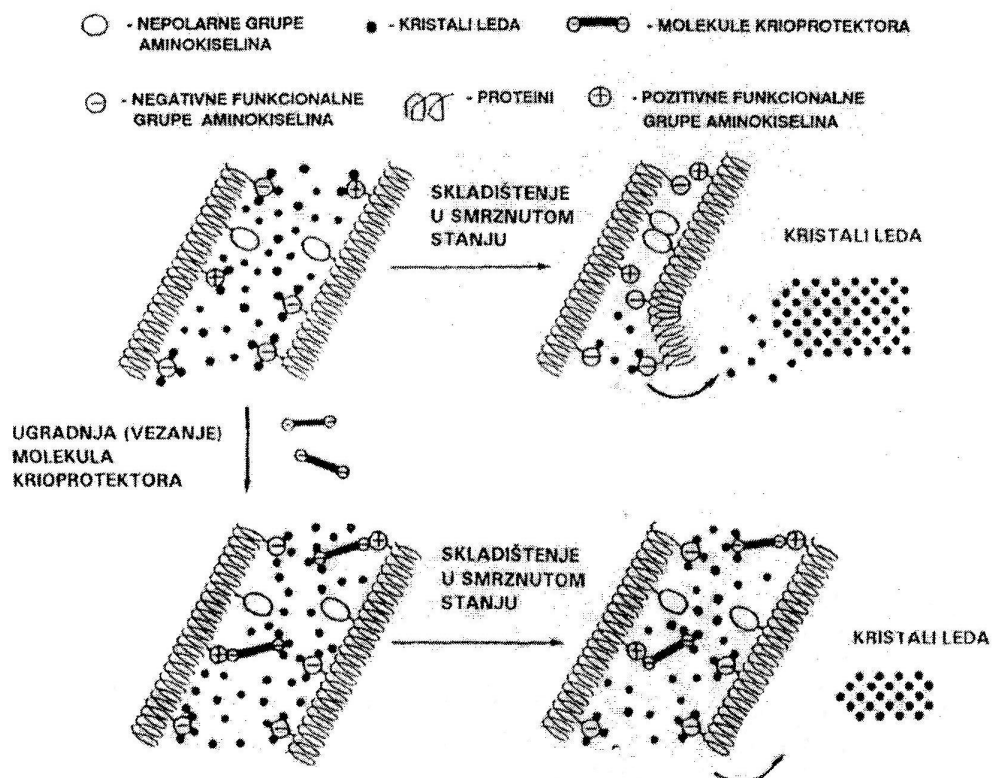
Migracija vode iz okoline proteinske molekule je usporena ili potpuno zaustavljena, smanjena je površinska napetost vode, zbog čega se usporava rast i ograničava veličina kristala leda,

spriječava se prekomjerno koncentriranje otopine, a time i povećanje aktiviteta otopljene tvari (Čunko, 2004).

Krioprotektori služe kao posrednici pri vezanju vode za protein pri čemu se povećava udio vezane (nesmrzljive) vode, koja na uobičajenim temperaturama skladištenja ne smrzava. Slobodna voda pri niskim temperaturama djeluje kao mehanička barijera između lanaca miofibrilarnih proteina i sprječava spontanu koagulaciju. Jedan dio krioprotektorskih molekula se otapa zbog površinske kristalizacije i služi kao jezgra kristalizacije, stvarajući veliki broj malih kristala leda koji ne uzrokuju mehanička oštećenja (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 netopive 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 dehidraciju 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. Mnoštvo tvari je bilo testirano sa svrhom da zaštiti proteine mišićnog tkiva od denaturacije i tako poboljšaju tehnološke karakteristike smrznutog mišićnog tkiva. Tvari kao što su ugljikohidrati, šećerni alkoholi i neke aminokiseline pokazale su visoku krioprotektivnu učinkovitost (Herrera, Mackie, 2004). Smatra se da su ugljikohidrati najučinkovitiji krioprotektori za miofibrilarne proteine, međutim primjena im je ograničena zbog slatkastog okusa (Jovanovac, 2009). Disaharidi, kao saharoza i trehaloza, su prirodni krioprotektori. β -glukan se pokazao kao učinkovit krioprotektor za različite biološke materijale. Najefikasnijim inhibitorom denaturacije proteina tijekom zamrzavanja i skladištenja u smrznutom stanju pokazala se smjesa saharoze, sorbitola i natrijeva-trifosfata (Kovačević, 2001).



Slika 2. Shema modela denaturacije i krioprotekcije proteina tijekom skladištenja surimija pri niskim temperaturama

2.3. DENATURACIJA MIOFIBRILARNIH PROTEINA PRI NISKIM TEMPERATURAMA

2.3.1. Miofibrilarni proteini

Maseni udio osnovnih gradivnih tvar mesa životinja za klanje, peradi i divljači kreću se u slijedećim rasponima: w (vode) = 65 – 75%, w (proteina) = 16 – 20%, w (masti) = 3 – 30%, w (ekstraktivnih tvari s dušikom) = 1 – 2%. Kemijski sastav mesa životinja za klanje, peradi i divljači nakon *rigor mortis*-a, ali prije degradativnih promjena *post mortem* prikazan je u **Tablici 1.** (Mastanjević, 2010).

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) (**Tablica 1.**).

Tablica 1. Kemijski sastav mesa životinja za klanje, peradi i divljači nakon *rigor mortis*-a

GRADIVNA TVAR	%
VODA	75
PROTEINI	19
1.)MIOFIBRILARNI	11,5
-Miozin I (H- i L-meromiozini i nekoliko lakih sastojaka asociranih sa njima)	5,5
-Aktin I	2,5
-Konektin (titin)	0,9
-Protein N2 linije (nebulin)	0,3
-Tropomiozini	0,6
-Troponini, C, I i T	0,6

- α , β , γ aktinini	0,5
-miomezin (protein M-pruge) i C-protein	0,2
-desmin, filamin, F- i I- protein, itd.	0,4
2.) SARKOPLAZMATSKI	5,5
-glicerinaldehid fosfat dehidrogenaza	1,2
-aldolaza	0,6
-kreatin kinaza	0,5
-drugi glikolitički enzimi	2,2
-mioglobin	0,2
-hemoglobin i drugi nespecifični ekstracelularni protein	0,6
3.) VEZIVNOTKIVNI I ORGANELE	2
Kolagen	1
Elastin	0,05
mitohondriji (uključujući cikrome i netopljive enzime); itd.	0,95
LIPIDI	2,5
1.) neutralni lipidi, fosfolipidi, masne kiseline, supstance topljive u masti	2,5
UGLJIKOHIDRATI	1,2

1) mliječna kiselina	0,9
2) glukoza-6-fosfat	0,15
3) glikogen	0,1
4) glukoza, drugi proizvodi glikolitičke razgradnje u tragovima	0,05

2.4. DIFERENCIJALNA MOTRIDBENA KALORIMETRIJA (DSC)

Diferencijalna motridbena kalorimetrija pripada grupi termičkih analiza. Prema definiciji internacionalnog saveza za termičke analize i kalorimetriju (International Confederation of Thermal Analysis and Calorimetry, ICTAC), termičke analize su skupina instrumentalnih metoda kojima se mjeri ovisnost određenog fizičkog svojstva tvari o temperaturi ili vremenu, pri čemu je uzorak tijekom mjerenja podvrgnut kontroliranom temperaturnom programu (Van der Plaats, 1992).

Metode pomoću kojih se određuju topline fizičkih i kemijskih procesa općenito se nazivaju *kalorimetrijske metode*. Uz pomoć kalorimetrijskih mjerenja određuju se toplinski kapaciteti tvari i sustava, promjena entalpija kemijskih reakcija i procesa kao što su fazni prijelazi (kristalizacija, taljenje, sublimacija, isparavanje) i dr.

Među najznačajnije instrumente koji se koriste za termičke analize spada diferencijalni motridbeni kalorimetar (engl. DSC-Differential Scanning Calorimetry) koji se najviše koristi od svih termo-analitičkih instrumenata.

Diferencijalna motridbena kalorimetrija (DSC) je tehnika koja se zasniva na mjerenju razlike toplinskog toka između uzorka i referentne tvari, odnosno energije koja je potrebna da razlika temperature između uzorka i referentne tvari bude nula, tijekom zagrijavanja ili hlađenja uzorka, kontroliranom brzinom. Bliska tehnika ovoj je diferencijalna toplinska analiza (DTA). Dok je osnovni zadatak kalorimetrije mjerenje promjena entalpije, prouzročenih egzotermnim ili endotermnim transformacijama u ispitivanom uzorku, DTA mjerenja se provode s ciljem

dobivanja ovisnosti temperaturne razlike analiziranog uzorka i referentne tvari o temperaturi ili vremenu.

DSC mjeri termičke promjene u funkciji:

-vremena: održavajući temperaturu konstantnom (izotermno), kako referentnog, tako i analiziranog uzorka,

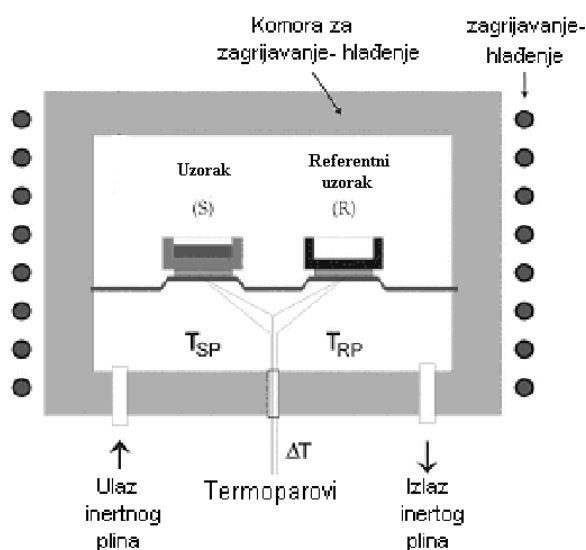
-temperature: na taj način da se i uzorak i referentna tvar griju istom brzinom zagrijavanja (dinamički).

Postoje dvije tehničke izvedbe DSC instrumenta (Van der Plaats, 1992):

- DSC toplinskog toka ("*Heat-flux DSC*") i
- DSC kompenziranog toplinskog toka ("*Power compensation DSC*").

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

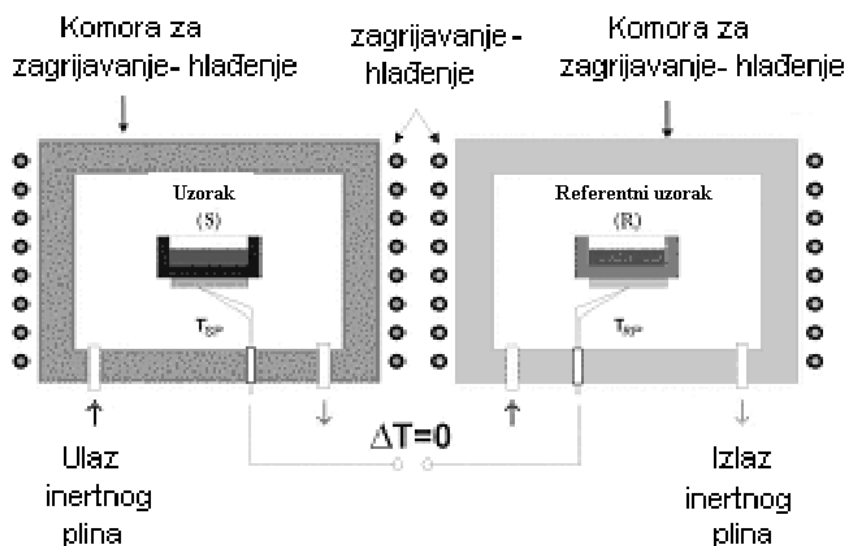
Izvedba DSC uređaja koji radi na principu protoka topline (eng. *heat flux*) vrlo je slična DTA tehnici, zbog čega se nekada zvala kvantitativni DTA (**Slika 3.**). Razlika je u tome što se pomoću DTA ne mogu provoditi kvantitativna mjerenja, dok je ovom tehnikom to moguće, zahvaljujući definiranom termičkom otporu komore.



Slika 3. Shema "heat-flux" DSC komore

2.4.2. DSC kompenziranog toplinskog toka ("Power compensation DSC")

Za razliku od DSC toplinskog toka, u "power compensation DSC" su uzorak i referentni uzorak smješteni u odvojenim komorama sa temperaturnim senzorima i sustavom za kontrolirano grijanje i hlađenje.



Slika 4. Shema "power compensation" DSC komore

2.4.3. Primjena diferencijalne motridbene kalorimetrije (DSC)

DSC se primjenjuje kod istraživanja/određivanja (Van der Plaats, 1992):

- termofizičkih svojstava - specifični toplinski kapacitet, koeficijent ekspanzije, točka taljenja,
- faznih prijelaza, odnosno promjena strukture - kristalizacija, taljenje, isparavanje, sublimacija, staklasti prijelaz, polimorfizam, tekući fazni prijelaz (tekući kristali),
- kemijskih reakcija,
- analize sastava (npr. voda, tekući sastojci, pepeo) i čistoće materijala.

Za DSC mjerenja mogu se koristiti posudice za uzorke izrađene od različitih materijala (aluminij, zlato, platina, staklo) i različitih konfiguracija, za rad pod uvjetima stalnog tlaka ili volumena.

Slijedeći razvoj instrumenata dostatne osjetljivosti posebno mjesto zauzima primjena ove tehnike pri istraživanju komponenata hrane i procesa tijekom toplinske obrade hrane.

U višekomponentnom sustavu kakav je hrana dolazi do brojnih interakcija između njenih pojedinih sastojaka i prema tome promjena u termičkom "ponašanju" hrane. Dobro razumijevanje termičkih svojstava vrlo je važno u definiranju kakvoće proizvoda kao i osiguranju njegove kakvoće.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

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

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Priprema uzoraka pilećeg mesa

DSC mjerenja provedena su s uzorcima isprane piletine kojima je dodan β -glukan. Maseni udjeli β -glukana kreću se u rasponu od 0% do 6%. Uzorci pilećeg surimija (pileća prsa) pripremljeni su u laboratoriju odvagom na analitičkoj vagi Tehnica ET – 1111 s točnošću mjerenja mase $\pm 1\text{ mg}$.

Priprema pilećeg surimija provedena je u 3 faze (**Slika 5.**):

1. Faza

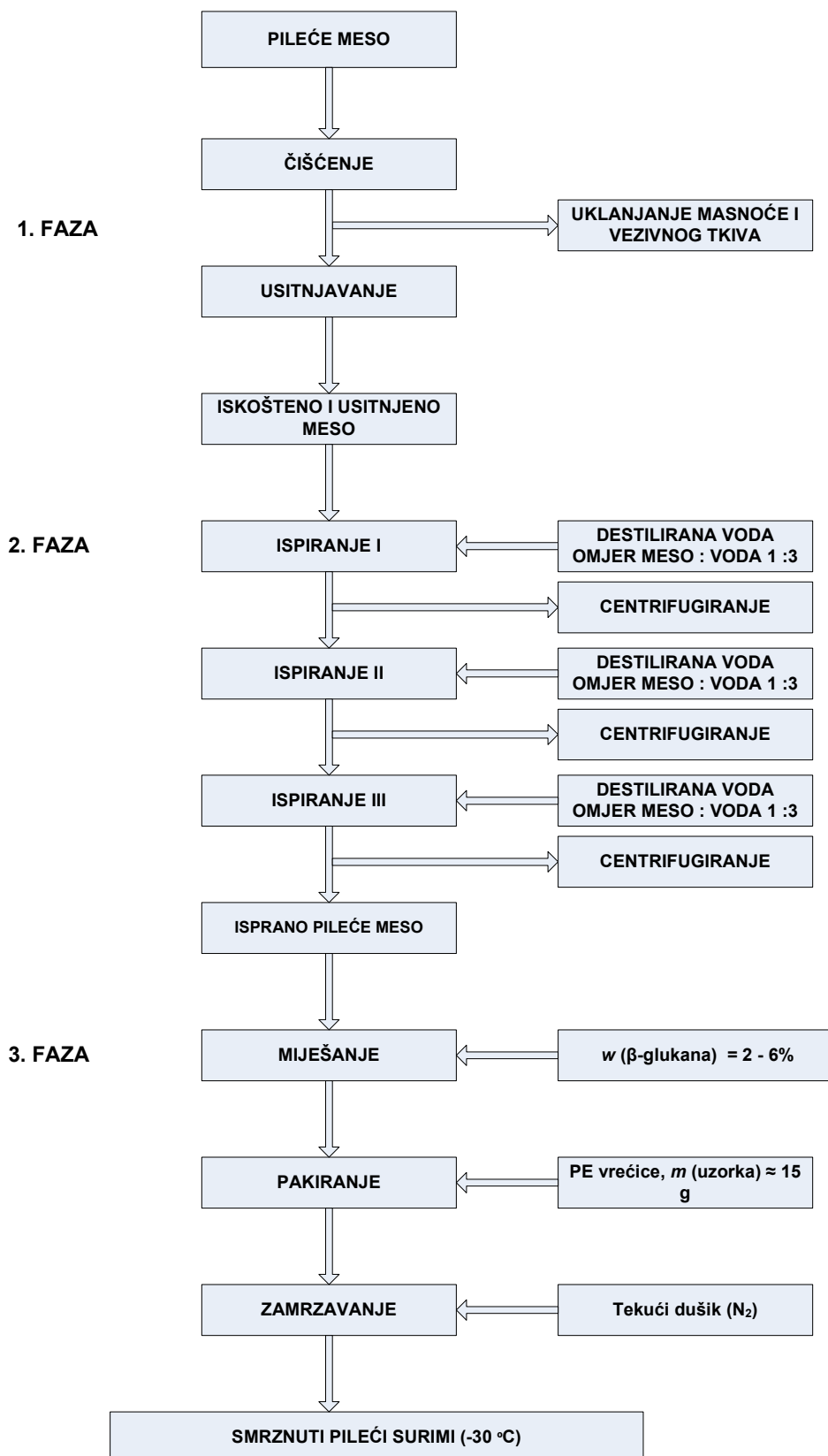
Nakon skidanja kože, iskoštavanja i odstranjivanja preostale masnoće i većih nakupina vezivnog tkiva, meso pilećih prsa je usitnjeno strojem za mljevenje (usitnjavanje) mesa, propuštanjem u dva navrata, kroz rešetku s otvorima promjera 2 mm ($r = 2 - 4\text{ mm}$). Povećanjem promjera povećava se iskorištenje sirovine, ali se postiže manja kvaliteta ispranog pilećeg mesa.

2. Faza

Usitnjeno pileće meso se ispiri destiliranom vodom. Iako se ispiranjem usitnjenog pilećeg mesa smanjuje iskorištenje sirovine, doprinosi se stabilnosti miofibrilarnih proteina te osiguravaju bolja želirajuća svojstva ispranog pilećeg mesa. Usitnjeno pileće meso se najprije ispiri destiliranom vodom, 15 minuta u mješalici pri umjerenoj brzini mješanja ($250 \text{ okretaja min}^{-1}$) pri $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Omjer mesa i vode tijekom ispiranja iznosi 1 : 3. Nakon mirovanja obire se izdvojena mast i centrifugira 15 minuta na 800 g pri $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, postupak se ponavlja tri puta, nakon čega je određen osnovni kemijski sastav prema AOAC metodi 2007,4 na Food Scan Meat Analysr-u (Jovanovac, 2009).

3. Faza

Pileći surimi se uzorkuje i miješa sa β -glukanom u različitim masenim omjerima. Maseni udjeli β -glukan se kreću u rasponu od 0% do 6%. Nakon pripreme ukupno 4 uzoraka, uzorci mase $\approx 10 \text{ g}$ se zatvore u polietilenske vrećice, označe i zamrznu u struji tekućeg dušika te uskladište na $-30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do trenutka analiziranja. Prosječno vrijeme skladištenja na $-30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ prije DSC mjerenja iznosi 30 dana. Tijekom eksperimenta računalo prati svaku promjenu temperature i toplinskog tijeka u zadanom rasponu od $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$, s brzinom zagrijavanja od $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po minuti. Po završetku eksperimenta dobivamo DSC krivulju iz koje se pomoću STAR^e software-a određuju vrijednosti promjene entalpije aktina ΔH_a i miozina ΔH_m , T_o – početnu («onset») i T_e – završnu («endset») temperaturu denaturacije miozina i aktina te T_p – temperaturu denaturacije aktina i miozina analiziranih uzoraka pilećeg surimija s dodatkom β -glukana.



Slika 5. Shema tijeka proizvodnje pilećeg surimija

3.2.2. Određivanje temperature i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina uzoraka pilećeg surimija

Za određivanje temperature i entalpija denaturacije uzorka korišten je kalorimetar tvrke Mettler-Toledo model 822e (**Slika 6.**), a mjerenja su provedena u atmosferi dušika čistoće 5.0 (Linde). Uređaj je opremljen keramičkim senzorom FRS 5 s 56 termoparovima (Au/Au/Pd) (**Slika 7.**) te omogućuje izvođenje dinamičkih mjerenja u temperaturnom području od -150 °C do 500 °C i bazira se na DSC metodi toplinskog toka. Opremljen je STAR^e software-om, odnosno s pet različitih programa koji su međusobno povezani preko baze podataka:

- Instalacijski program (eng. *Install window*) 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*) omogućuje kreiranje temperaturnih programa mjerenja,
- Program za izvođenje eksperimenta (eng. *Experiment window*) služi za odabir metode mjerenja s unosom podataka specifičnim za eksperiment (ime uzorka, masa uzorka, priprema uzorka),
- Evaluacijski program (eng. *Evaluation window*) služi za analizu krivulja, tj. obradu rezultata.

U bazi podataka STAR^e sustava su dostupne sljedeće kalibracijske metode: totalna kalibracija In/Zn; totalna kalibracija n-oktan/In; višestruka kalibracija temperature In/Zn (eng. *Multiple In/Zn*); jednostruka kalibracija temperature s In ili Zn (eng. *Single In*; eng. *Single Zn*). U radu je korištena totalna kalibracija n-oktan/In, dok je kalibracija toplinskog toka napravljena s indijem (In).

Kontrola ili provjera (tzv. *Check*) 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).

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 (eng. *Module control window*).

Umjeravanje instrumenta

Umjeravanje je osnovni korak za svaku termo - analitičku studiju i podrazumijeva skup postupaka koji određuju, pod specifičnim uvjetima, odnos između vrijednosti veličine dobivene u mjernom instrument ili mjernom sustavu i odgovarajućih vrijednosti standard, odnosno poznatih vrijednosti mjerne veličine (N. Nedić-Tiban, 2005).

Kod DSC uređaja mogu se umjeravati:

- Temperature,
- Karakteristike komore i
- DSC senzor, odnosno toplinski tok (eng. *Heat flow*).



Slika 6. DSC kalorimetar tvrtke Mettler-Toledo model 822e

Umjeravanje se provodi prije početka rada s novim uređajem te, također, kada provjera (tzv. *Check*) nije dala rezultate u granicama tolerancije. Kontrola pomoću indija ("*In check*") je uobičajena, brza i jednostavna metoda s evaluacijom rezultata koje sustav automatski uspoređuje s referentnim vrijednostima.

U dobroj laboratorijskoj praksi "*check*" se izvodi jednom mjesečno. Provjera ili kontrola ("*In check*") se bazira na mjerenju termičkih svojstava indija visoke čistoće (početna temperatura taljenja i topline taljenja indija):

- $Onset = T_{oi} = 156,6 \pm 0,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$,
- $Heat\ flow = \Delta H_{ti} = 28,45 \pm 0,6 \text{ J g}^{-1}$.



Slika 7. Keramički senzor FRS 5 s termoparovima (Au/Au/Pd) DSC uređaja 822e

Priprema uzoraka pilećeg surimija za određivanje temperature i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina

Za mjerenje temperature i entalpija denaturacije miofibrilarnih proteina uzoraka pilećeg mesa upotrebene su odvage uzoraka od 15 ± 2 mg. Prije svakog mjerenja smrznuti uzorci su ostavljeni preko noći u hladnjaku na $+4$ °C radi odmrzavanja. U ovom istraživanju sva DSC mjerenja provedena su u tri paralele.

Uzorci pilećeg mesa izvagani su u standardnu aluminijsku posudicu (40 μ L). Odmah nakon hermetičkog zatvaranja posudice provedeno je DSC mjerenje. Za određivanje temperature i entalpija denaturacije uzorci su bili podvrgnuti temperaturnom programu zagrijavanja od 25 °C do 95 °C, s brzinom zagrijavanja od 10 °C min⁻¹.

Određivanje temperature denaturacije miofibrilarnih proteina pilećeg surimija

U programu za evaluacije (*eng. Evaluation window*) STAR^e 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 promjera, integracije s različitim baznim linijama, temperature vrha (pika) krivulje (*eng. Peak temperature*) 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

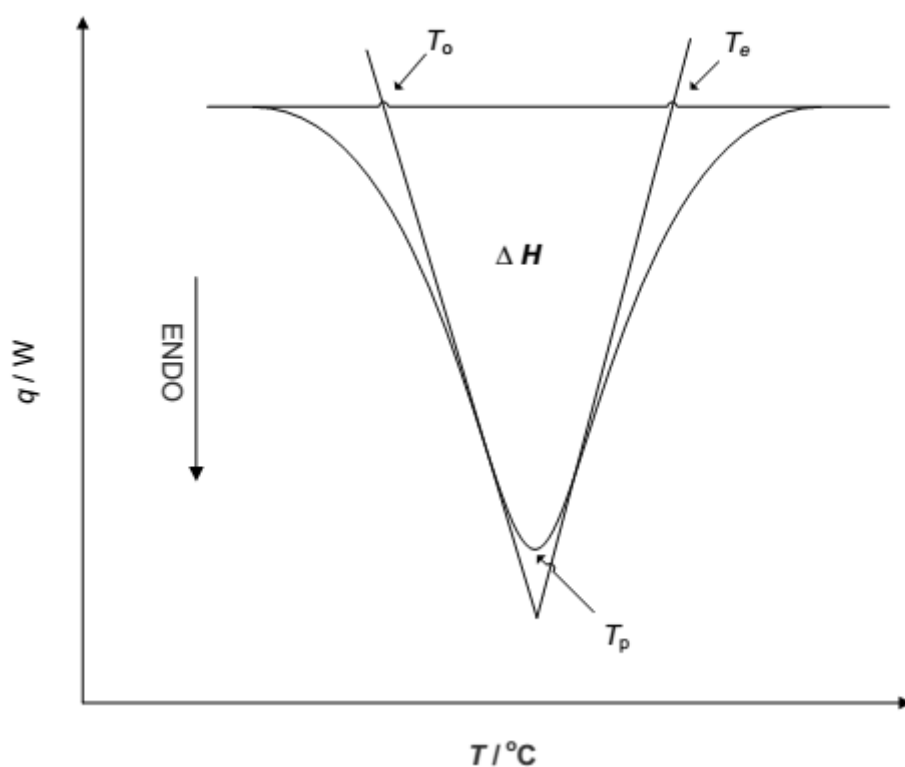
odvijaju termičke promjene. Budući da vrsta bazne linije određuje dobivene rezultate i prema tome mora biti pažljivo odabrana (ovisno o termičkom efektu ili promjeni koja se ispituje, odnosno dijelu krivulje koji se želi evaluirati) (N. Nedić-Tiban, 2005, J. Babić, 2007).

Pik vrha krivulje određen je:

- Temperaturom pika (T_p) (vrha krivulje) – temperature koja odgovara maksimalnoj defleksiji DSC krivulje,
- Početnom (eng. *Onset*) temperaturom (T_o) – temperature kod koje je prisutno prvo odvajanje defleksija (savijanje) krivulje od bazne linije,
- Završnom temperaturom (eng. *Endset*) (T_e) – temperature sjecišta ekstrapolirane bazne linije i uzlazne krivulje pika (**Slika 8.**).

Određivanje entalpije denaturacije (ΔH) miofibrilarnih proteina pilećeg surimija

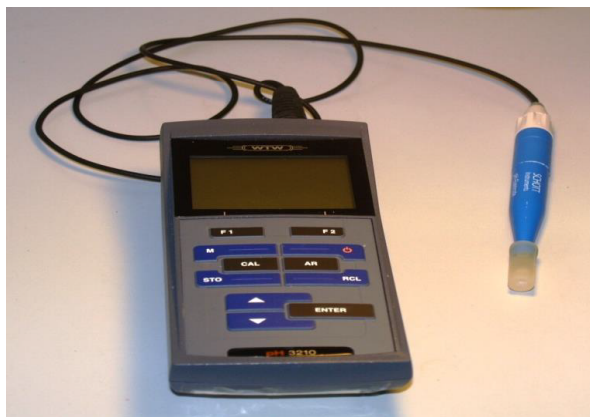
Entalpija različitih promjena u analiziranom uzorku dobiva se integriranjem površine vrha (pika) krivulje (**Slika 8.**). S obzirom na vrlo malu masu uzorka koji se koristi u DSC analizi (10 - 20 mg) postoji problem reproducibilnosti rezultata te je neophodna dobra homogenizacija uzorka i provedba više paralelnih mjerenja.



Slika 8. Određivanje početne (T_0), završne (T_e) i temperature vrha (T_p) te entalpije (ΔH) neke promjene u uzorku

3.2.3. Određivanje pH vrijednosti i osnovnog kemijskog sastava

Vrijednost pH mjerena je uređajem pH/Ion – 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). Terenska mjerenja pH vrijednosti provedena su pomoću prijenosnog pH metra pH 3210/3310 tvrtke WTW. prema normi (HRN ISO 2917:2000), (HNZ, 2000.).



Slika 9. Prijenosni pH metar pH 3210/3310 tvrtke WTW

Određivanje udjela vode, bjelančevina, kolagena i ukupnih masti provedena je pomoću uređaja FoodScan Meat Analysera (FOSS) (**Slika 10.**). Određivanje je vršeno prema AOAC metodi 2007.4 (AOAC, 2007.).



Slika 10. FoodScan Meat Analyser

3.2.4. Određivanje aktiviteta vode (a_w) i profila teksture

Određivanje se provodilo pomoću uređaja HygroLab 3 – Multi-channel Humidity & Water Activity Analyser (ROTRONIC) (**Slika 11.**), prema uputama proizvođača (HygroLab Bench Top Humidity Temperature Indicator Instruction Manual V2.0), pri sobnoj temperature (20 ± 2 °C).



Slika 11. Rotronic - HygroLab 3 – Multi-channel Humidity Water Activity Analyser

Teksturalni profil uzoraka pilećeg surimija određen je na uređaju TA-XT2i texture analyzer (**Slika 12.**). Uzorci narezani na kocke (1,5 cm x 1,5 cm x 1,5 cm) pritisnuti su kompresijskom pločom promjera 75 mm, dva puta, do 70% njihove visine prema sljedećim parametrima:

- kalibracija visine: 25 mm,
- brzina prije mjerenja: 1 mm s⁻¹,
- brzina mjerenja: 5 mm s⁻¹,
- brzina nakon mjerenja: 5 mm s⁻¹,
- dubina prodiranja cilindra: 9 mm (70%)
- vrijeme zadržavanja između dvije kompresije: 5 s,
- potrebna sila za početni signal: 5 g.

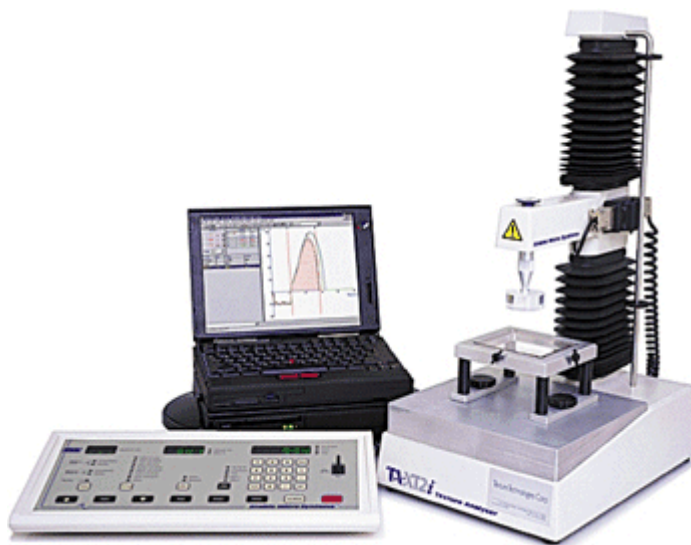
Analiza teksture provedena je pri sobnoj temperaturi. Računalni program zapisuje krivulju promjene sile potrebne za kompresiju uzorka u određenom vremenu prema sljedećim parametrima:

- 1) brzina kretanja glave uređaja od 5 mm s⁻¹,
- 2) brzina zapisa testa od 5 mm s⁻¹.

Iz dobivenih rezultata mogu se očitati:

- čvrstoća - visina prvog pika izražena u jedinicama sile (N) ili mase (g),
- kohezivnost - predstavlja snagu unutrašnjih veza materijala potrebnih da zadrži uzorak koherentnim pri deformaciji, a definirana je omjerom površina ispod drugog i prvog pika,
- elastičnost - predstavlja tzv. trenutnu elastičnost, odnosno mjeru oporavka uzorka od 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 *software*-skog sustava Texture Exponent for Windows (version 1.0) Stable Micro Systems.



Slika 12. Stable Micro Systems TA-XT2i analizator teksture

3.2.5. Određivanje mase uzoraka pilećeg surimija prije i nakon kuhanja

Mjerenje mase uzoraka pilećeg surimija, sa dodatkom različitih masenih udjela β -glukana (0 – 6%), provedeno je pomoću tehničke vage sa točnošću mjerenja 0,01 g. Mjerenje se provodi prije kuhanja uzoraka pilećeg surimija u vodi temperature 80 °C, u periodu od 10

minuta, te nakon kuhanja uzoraka. Vrijednosti rezultata mjerenja mase uzoraka pilećeg surimija iznesene su u **Tablici 5**.



Slika 13. Tehnička vaga

Izračunavanje kala kuhanja

Izračunavanje kala kuhanja se provodi radi utvrđivanja gubitaka na masi uzoraka pilećeg surimija, skladištenih na -30 °C tijekom 30 dana, koji se dešavaju tijekom procesa kuhanja. Uz pomoć podataka za masu uzoraka pilećeg surimija prije kuhanja te nakon kuhanja moguće je izračunati kalo kuhanja u postocima (%).

$$\text{kalo kuhanja} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100(\%) \quad (1)$$

m_1 – masa uzoraka prije kuhanja,

m_2 – masa uzoraka nakon kuhanja

3.2.6. Određivanje koordinata boje u CIE- $L^*a^*b^*$ sustavu

Instrumentalno određivanje boje je provedeno uređajem MiniScan®XE Plus spectrophotometer (Hunter Associates Laboratory, Inc., Virginia, USA), (angle 10°, illuminant D65) (**Slika 14.**). Uređaj je prije početka rada kalibriran hvatačem svjetlosti i bijelom keramičkom pločom ($L0 = 93.01$, $a0 = -1.11$ i $b0 = 1.30$).

Određene su slijedeće koordinate boje u CIE- $L^*a^*b^*$ sustavu:

(L^*) - koordinata svjetline (lightness): 0 (crna) - 100 (bijela);

a* - koordinata obojenja (redness): ($\pm$ crveno - zeleno);

b* koordinata obojenja (yellowness): ($\pm$ žuto – plavo).

Mjerenje boje uzoraka pilećeg surimija provedeno je pri sobnoj temperaturi (20 ± 2 °C).



Slika 14. Hunter-Lab Mini ScanXE.

3.2.7. Statistička obrada rezultata

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

4. REZULTATI

4.1. REZULTATI MJERENJA

Rezultati istraživanja, odnosno provedbe eksperimentalnog dijela diplomskog rada:

1. Određivanje osnovnog kemijskog sastava, a_w i pH pilećeg surimija (**Tablica 2.**)
2. Mjerenje mase uzoraka prije i nakon kuhanja te izračun kala kuhanja (**Tablica 3. i slika 15**)
3. Određivanje pH vrijednosti uzoraka (**Tablica 4.**)
4. Određivanje boje uzoraka (**Tablica 5.**)
5. Određivanje teksture uzoraka (**Tablica 6.**)
6. DSC analiza (**Tablica 7. i 8. i slike 16. – 19.**)

Tablica 2. Osnovni kemijski sastav, a_w i pH uzoraka pilećeg surimija

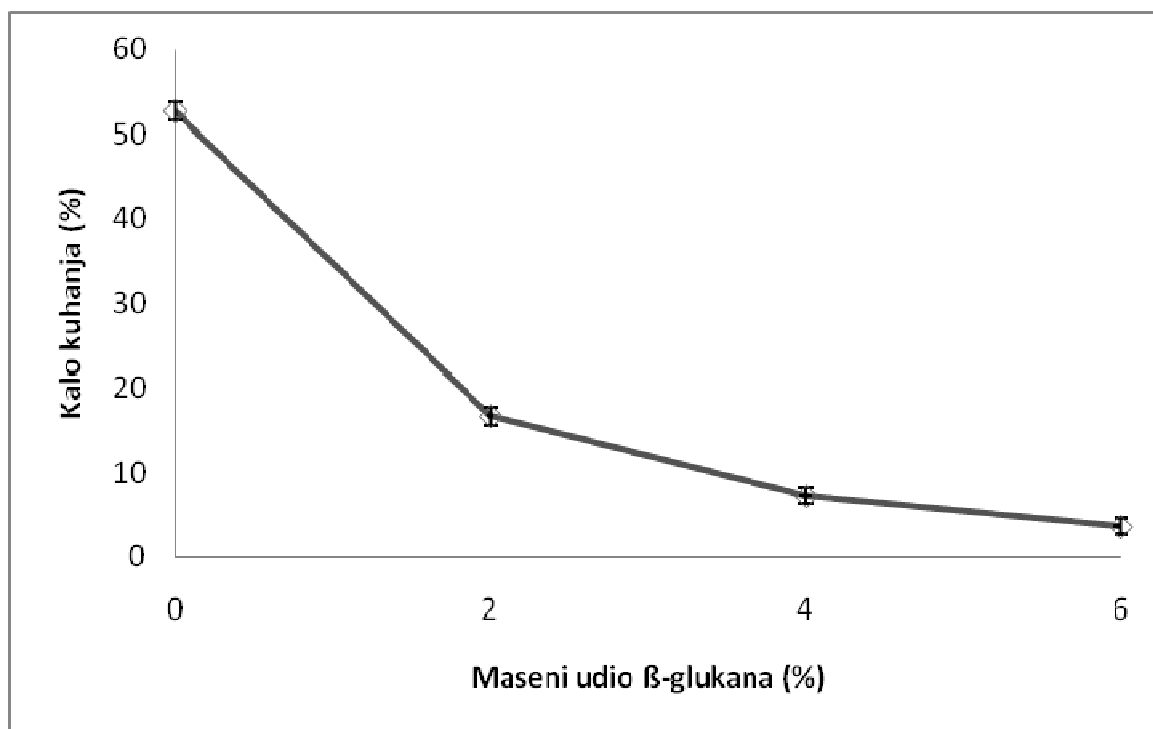
Grativna tvar	Maseni udio (%)
Voda	$74,43 \pm 0,28$
Proteini	$22,34 \pm 0,58$
Masti	$2,54 \pm 0,07$
Kolagen	$0,74 \pm 0,01$
pH	$5,97 \pm 0,04$
a_w	$0,96 \pm 0,01$

Prikazani rezultati su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija

Tablica 3. Kalo kuhanja uzoraka pilećeg surimija pomiješanog s različitim masenim udjelima β -glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

w β -glukana (%)	m_1 (g)	m_2 (g)	Δm (g)	kalo kuhanja (%)
0	$32,00d \pm 0,27$	$15,14d \pm 0,03$	$16,86a \pm 0,10$	$52,69 \pm 0,19$
2	$34,00c \pm 0,07$	$28,31c \pm 0,04$	$5,69b \pm 0,03$	$16,74 \pm 0,05$
4	$37,93a \pm 0,22$	$35,19b \pm 0,07$	$2,74c \pm 0,15$	$7,22 \pm 0,37$
6	$36,84b \pm 0,08$	$35,51a \pm 0,06$	$1,33d \pm 0,02$	$3,61 \pm 0,05$

Prikazani rezultati su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; razlike vrijednosti unutar stupca označene istim slovom (a – d) nisu statistički značajne ($P < 0,05$)



Slika 15. Grafički prikaz kala kuhanja uzoraka pilećeg surimija s različitim masenim udjelima β -glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tablica 4. pH vrijednosti uzoraka pilećeg surimija pomiješanog s različitim masenim udjelima β -glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

w β -glukana (%)	pH
0	$6,29 \pm 0,03$
2	$6,24 \pm 0,01$
4	$6,25 \pm 0,0,1$
6	$6,15 \pm 0,04$

Prikazani rezultati su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.

Tablica 5. Instrumentalni parametri boje uzoraka pilećeg surimija uz dodatak različitih udjela β -glukana (w = 0 – 6%) nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$)

w β -glukana (%)	L*	a*	b*	W
0	$77,31b \pm 1,13$	$2,69a \pm 0,86$	$19,75a \pm 0,51$	$18,06b \pm 0,27$
2	$79,06b \pm 1,12$	$1,93b \pm 0,63$	$18,48b \pm 0,54$	$23,62b \pm 0,14$
4	$79,81ab \pm 1,23$	$1,87b \pm 0,63$	$18,76b \pm 0,53$	$23,53b \pm 0,33$
6	$80,71a \pm 1,06$	$1,82b \pm 0,78$	$18,79b \pm 0,82$	$24,34a \pm 0,62$

Prikazani rezultati su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; razlike vrijednosti unutar stupca označene istim slovima (a – c) nisu statistički značajne ($P < 0,05$)

Tablica 6. Profil teksture uzoraka pilećeg surimija pomiješanog s različitim masenim udjelima β -glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

w β -glukana (%)	Tvrdoća (g)	Elastičnost	Kohezivnost	Otpor žvakanju (g)
0	843,59b $\pm$ 114,31	0,92ab $\pm$ 0,06	0,64a $\pm$ 0,04	541,24ab $\pm$ 172,41
2	352,34c $\pm$ 21,2	0,83b $\pm$ 0,11	0,55c $\pm$ 0,04	159,92c $\pm$ 12,57
4	1081,23ab $\pm$ 205,49	0,94a $\pm$ 0,04	0,47b $\pm$ 0,03	712,73a $\pm$ 107,59
6	1323,19a $\pm$ 232,98	0,89ab $\pm$ 0,06	0,33b $\pm$ 0,03	441,44b $\pm$ 79,05

Prikazani rezultati su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; razlike vrijednosti unutar stupca označene istim slovima (a - c) nisu statistički značajne ($P < 0,05$)

Tablica 7. Temperature denaturacije (T_o , T_p , T_e) i entalpija denaturacije (ΔH) miozina pilećeg surimija pomiješanog s različitim masenim udjelima β -glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

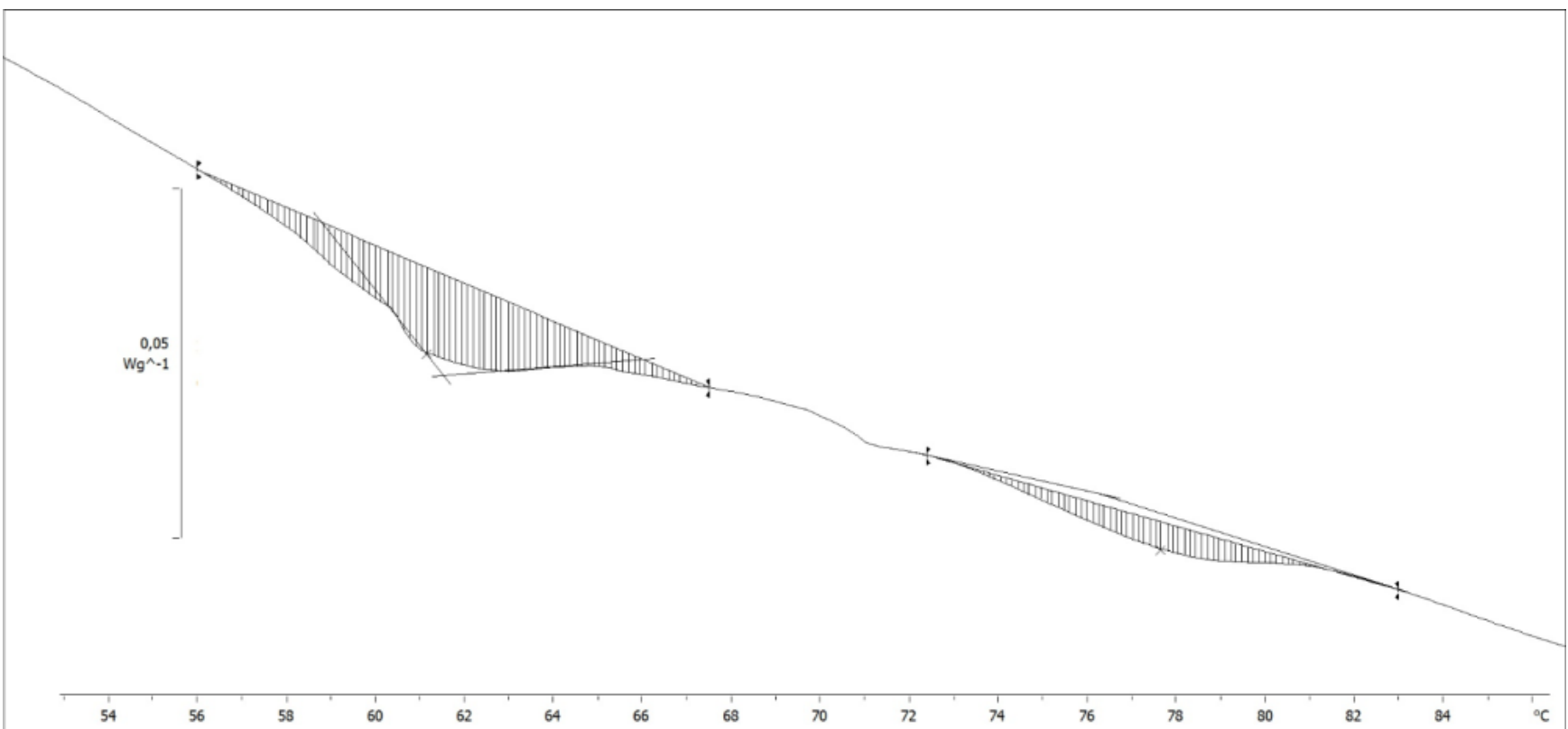
w β -glukana (%)	T_o ($^{\circ}\text{C}$)	T_p ($^{\circ}\text{C}$)	T_e ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_m (J g^{-1})
0	58,48a $\pm$ 0,09	60,86c $\pm$ 0,03	65,36d $\pm$ 0,05	0,37b $\pm$ 0,03
2	58,15a $\pm$ 0,23	60,99c $\pm$ 0,79	67,51c $\pm$ 0,08	0,36b $\pm$ 0,02
4	56,09b $\pm$ 0,49	61,53b $\pm$ 0,30	66,59b $\pm$ 0,25	0,37b $\pm$ 0,01
6	54,73c $\pm$ 0,02	62,11c $\pm$ 0,03	71,65d $\pm$ 0,25	0,49a $\pm$ 0,01

Prikazani rezultati su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; razlike vrijednosti unutar stupca označene istim slovima (a, b, c, d) nisu statistički značajne ($P < 0,05$)

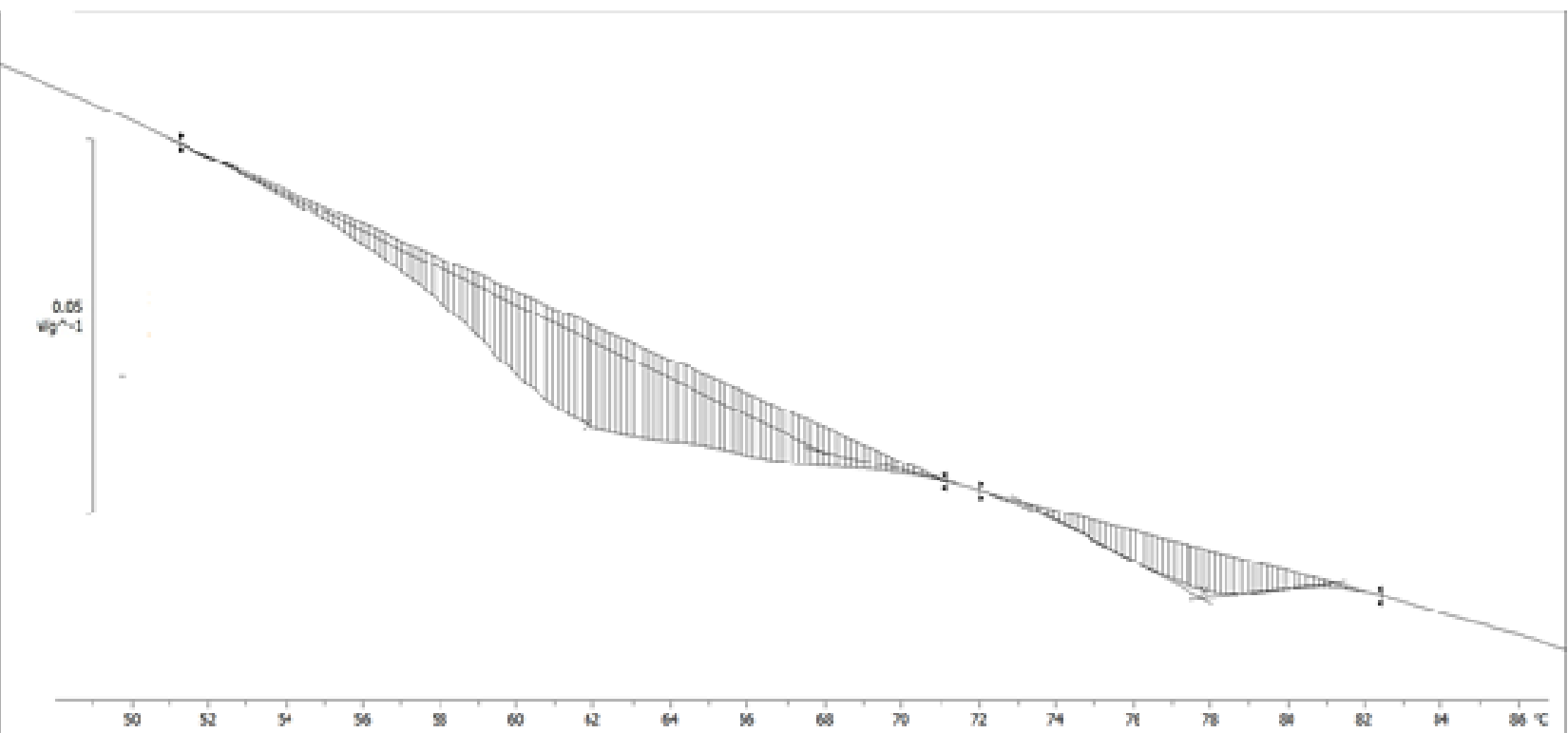
Tablica 8. Temperature denaturacije (T_o , T_p , T_e) i entalpija denaturacije (ΔH) aktina pilećeg surimija pomiješanog s različitim masenim udjelima β -glukana nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

w β -glukana (%)	T_o ($^{\circ}\text{C}$)	T_p ($^{\circ}\text{C}$)	T_e ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_a (J g^{-1})
0	$72,08b \pm 0,04$	$70,32a \pm 0,11$	$82,63a \pm 0,04$	$0,09a \pm 0,01$
2	$72,26ab \pm 0,15$	$77,14a \pm 0,19$	$80,77c \pm 0,11$	$0,08ab \pm 0,01$
4	$72,47ab \pm 0,35$	$77,30a \pm 0,15$	$80,14d \pm 0,03$	$0,08ab \pm 0,02$
6	$72,65b \pm 0,02$	$77,19a \pm 0,18$	$81,45b \pm 0,05$	$0,09a \pm 0,01$

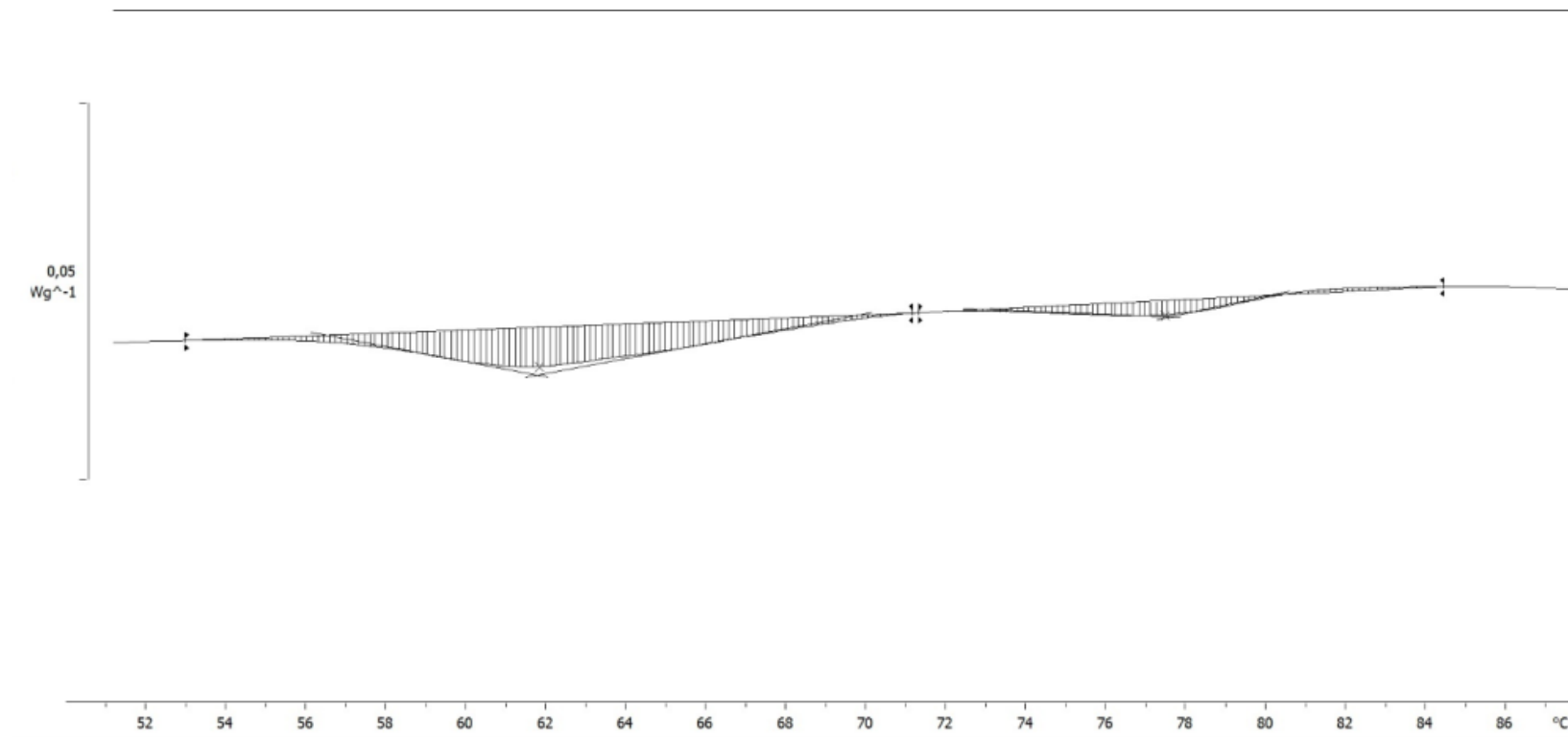
Prikazani rezultati su srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija; razlike vrijednosti unutar stupca označene istim slovima (a,ab, b, c, d) nisu statistički značajne ($P < 0,05$)



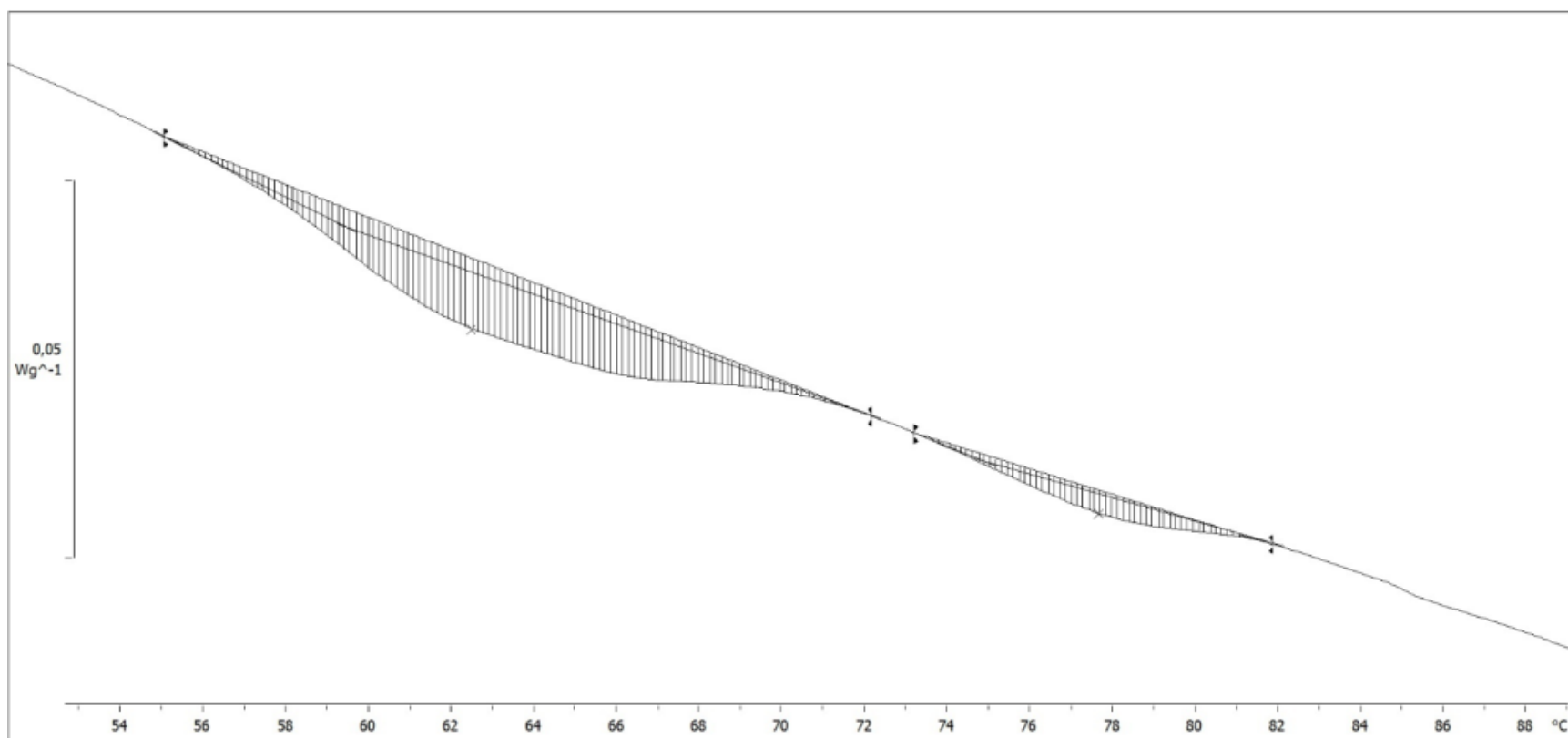
Slika 16. DSC termogram uzoraka pilećeg surimija nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri -30 °C



Slika 17. DSC termogram uzoraka pilećeg surimija pomiješanih sa β -glukanom ($w = 2\%$) nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$



Slika 18. DSC termogram uzoraka pilećeg surimija pomiješanih sa β -glukanom ($w = 4\%$) nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$



Slika 19. DSC termogram uzoraka pilećeg surimija pomiješanih sa β -glukanom ($w = 6\%$) nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

5. RASPRAVA

Osnovni kemijski sastav, pH i aktivitet vode uzoraka pilećeg mesa prikazani su u **Tablici 2**. Ispiranjem pilećeg mesa s destiliranom vodom dolazi do povećanja masenog udjela vode i proteina u uzorcima te smanjenja masenog udjela masti.

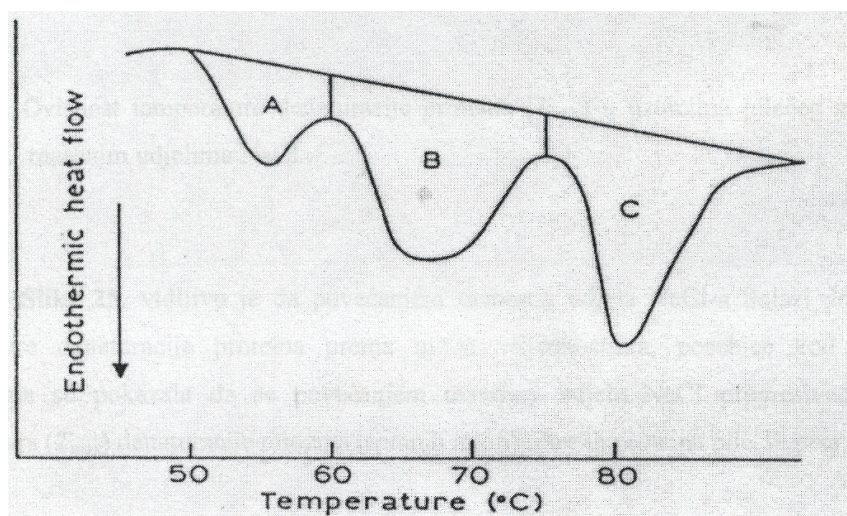
Rezultati mjerenja parametara boje uzoraka pilećeg surimija uz dodatak različitih udjela β -glukana prikazani su u **Tablici 5**. Surimi gelovi visoke (L^*) vrijednosti, niske (b^*) i visoke (W) vrijednosti su najviše poželjni. Uz dodatak β -glukana uzorcima pilećeg surimija značajno su se povećale L^* i W vrijednosti ($P < 0,05$). To je u skladu sa istraživanjima koja su provedena na surimijima ribe Pollock uz dodatak krumpirovog škroba i bjelanjka jajeta (Tabilo-Munizaga i Barbosa-Canovas, 2004).

Rezultati mjerenja kala kuhanja uzoraka pilećeg surimija sa dodatkom različitih masenih udjela β -glukana prikazani su u **Tablici 3**. Kalo kuhanja se izračunava prema formuli **(1)**. Grafički prikaz kala kuhanja uzoraka pilećeg surimija s različitim masenim udjelima β -glukana ($w = 0 - 6\%$) prikazan je na **Slici 15**.

DSC mjerenja su provedena sa četiri različitih uzoraka pilećeg surimija, sa dodatkom β -glukana u različitim masenim udjelima ($w = 0 - 6\%$), u temperaturnom interval od $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ s brzinom zagrijavanja od $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ po minuti. Nakon pripreme uzoraka pilećeg surimija, dodani su im β -glukani u različitim masenim udjelima koji se kreću od 0% do 6% . Uzorci su zatim zamrznuti brzim postupkom zamrzavanja u struji tekućeg dušika i uskladišteni mjesec dana na temperature od $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, a zatim su se provela DSC mjerenja.

DSC uređaj omogućava brzu i efikasnu kontrolu parametara koji definiraju način i uvjete mjerenja. Zbog velike osjetljivosti mjerenja i neposrednog (on-line) praćenja rezultata računalom, omogućeno je jednostavno prikupljanje podataka te njihova obrada i grafička interpretacija rezultata.

Iz **Slika. 16. – 19.** koje prikazuju termograme analiziranih uzoraka pilećeg surimija s dodatkom različitih masenih udjela β -glukana, vidljivo je da svaki termogram ima dva karakteristična pika. Sukladno standardnom DSC-termogramu mišićnog tkiva koji je prikazan na **Slici 20**, pikovi predstavljaju endotermne reakcije denaturacije aktina i miozina.



Slika 20. Standardni DSC-termogram mišićnog tkiva (A-entalpija denaturacije miozina; B-entalpija denaturacije sarkoplazmatskih proteina i kolagena; C-entalpija denaturacije aktina)

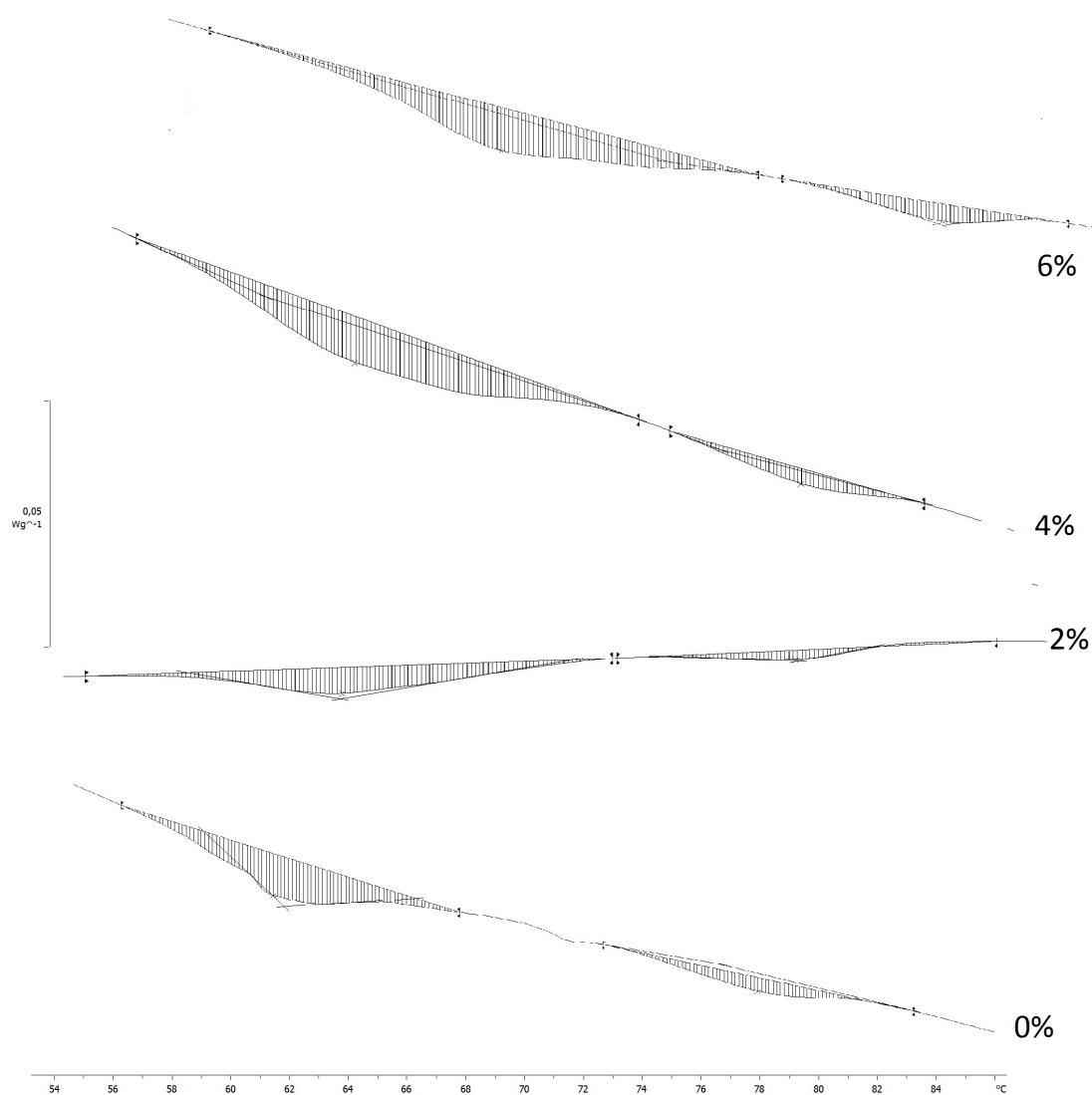
Iz DSC termograma ekstrapolirane su temperature: T_o - početna («onset»), T_e - završna («endset») i T_p - temperature denaturacije miofibrilarnih proteina analiziranih uzoraka pilećeg surimija s dodatkom β -glukana (**Tablica 7. i 8.**).

Temperature denaturacije miozina i aktina uzoraka pilećeg surimija obzirom na maseni udio β -glukana ($w = 0 - 6\%$) pokazuju linearno povećanje od $60,86\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $62,11\text{ }^{\circ}\text{C}$ i od $70,32\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $77,19\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Tablica 7. i Tablica 8.**) (**Slika 21.**).

Integracijom površine ispod vrhova DSC krivulje pomoću STAR^e software-a određene su vrijednosti promjene entalpije miozina ΔH_m i promjene entalpije aktina ΔH_a . Uzorci pilećeg surimija analizirani su u temperaturnom interval od $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, s brzinom zagrijavanja od $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Tablica 7. i 8.**).

Vrijednosti entalpije, određene su pomoću STAR^e software-a te predstavljaju integriranu površinu ispod DSC termograma (**Slika 16. – 19.**). Vrijednosti entalpija denaturacije (ΔH) miozina i aktina uzoraka pilećeg surimija pomiješanih s β -glukanom ($w = 0 - 6\%$) nakon 30

dana skladištenja u smrznutom stanju pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ su prikazane u **Tablici 7.** i **Tablici 8.** Povećanjem masenog udjela β -glukana u uzorcima pilećeg surimija ($w = 0 - 6\%$) entalpije denaturacije (ΔH) miozina i aktina su se statistički značajano ($P < 0,05$) povećale (**Tablica 7.** i



Slika 21. DSC termogrami pilećeg surimija sa dodatkom β -glukana ($w = 0 - 6\%$) nakon 30 dana skladištenja u smrznutom stanju pri $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tablica 8.) (Slika 21.). 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 pilećeg surimija, 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 sladištenja u smrznutom stanju, odnosno većom entalpijom denaturacije.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

DSC termogrami analiziranih uzoraka pilećeg surimija s dodatkom različitih masenih udjela β -glukana ($w = 0 - 6\%$) sastoje se od dva, za mišićno tkivo karakteristična, pika koji predstavljaju endotermne reakcije denaturacije miozina i aktina tijekom zagrijavanja.

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

Entalpije denaturacije miozina (ΔH_m) uzoraka pilećeg surimija, pri svim masenim udjelima β -glukana, pokazuju značajnije povećanje u odnosu na entalpije denaturacije aktina (ΔH_a) što upućuje na zaključak da β -glukan ima bolji krioprotetski učinak na miozin.

Pomak temperature denaturacije prema višim vrijednostima i veća entalpija denaturacije aktina i miozina u uzorcima pilećeg surimija s većim masenim udjelom β -glukana rezultat su krioprotetskog djelovanja β -glukana tijekom zamrzavanja i skladištenja pilećeg surimija u smrznutom stanju.

Osim navedenih promjena uzrokovanih porastom masenog udjela β -glukana, dolazi i do promjena u vidu statistički značajnog ($P < 0,05$) porasta parametara teksture (tvrdoća i otpor žvakanju), porasta parametara instrumentalnog određivanja boje (L^* , W) te smanjenja kala kuhanja uzoraka pilećeg surimija. To također ukazuje na interakciju β -glukana sa miofibrilarnim proteinima uzoraka pilećeg surimija, odnosno na njegovo krioprotetsko djelovanje.

7. LITERATURA

1. Babić J: Utjecaj acetiliranja i dodataka na reološka i termofizikalna svojstva škroba kukuruza i tapioke, *Doktorski rad*, 2007.
2. Čunko D: Određivanje entalpije pilećeg surimija diferencijalnom motridbenom kalorimetrijom. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2004.
3. Herrera JR, Mackie IM: Cryoprotection of frozen stored actomyosin or formed rainbow trout by some sugars and polyols. *Food Chemistry* 84:91-97, 2004.
4. (<http://www.inpharma.hr/index.php/news/362/19/Beta-glukan>) [3. 6. 2015.]
5. (<http://definicijahrane.hr/definicija/hranjive-tvari/bioloski-aktivne-tvari/beta-glukan/>) [3. 6. 2015.]
6. Jovanovac B: Krioprotektorsko djelovanje trehaloze na miofibrilarne proteine pilećeg mesa. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2009.
7. Kovačević, D.: Kemija i tehnologija mesa i ribe, prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2001.
8. Lovrić T: Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, Zagreb, 2003.
9. Mastanjević K: Određivanje krioprotektorske djelotvornosti trehaloze na različite uzorke mesa. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2010.
10. 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.
11. Nedić-Tiban N: Primjena diferencijalne motridbene kalorimetrije u utvrđivanju patvorenja meda, *Doktorski rad*, 2005.
12. Perez-Chabela, ML, Mateo-Oyague, J: Handbook of Frozen Foods. U Frozen meat: Quality and shelf life Y.H. Hui, P. Cornillion, I. G. Legaretta, M. H. Lim, K. D. Murell, W. K. Nip, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, New York, str. 201 – 203, 204

13. Petravić-Tominac V, Zechner-Krpan V, Srećec S, Šantek B, Špoljarić D, Valpotić H, Popović M, Valpotić I: Iskorišteni pivski kvasac – sirovina za izdvajanje β -glukana primjenjivog u biotehnologiji i biomedicini, *Veterinarska stanica*, 5:281-295, 2009.
14. Stone BA, Clarke AE: Chemistry and biology of 1,3- β -Glucans, *La Trobe University Press*, 1992.
15. Špoljarić D, Fumić T, Kezić D, Valpotić H, Fabijanić V, Popović M, Sladoljev S, Mršić G, Valpotić I: β -glukani: Prirodni modifikatori imunosnog odgovora nedovoljno poznati u veterini, *Veterinarska stanica*, 4:361-367, 2011
16. 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.
17. Tokunaka K, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T: Immunopharmacological and immunotoxicological activities of a water soluble β -1,3-Glucan, CSBG from *Candida* spp., *Int. J. Immunopharmacol*, 22:383-394, 2000.
18. Tzianabos, A O (2000): Review – polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 523–533.
19. Van der Plaats G: The Practice of Thermal Analysis. *Mettler Toledo*, 1992.
20. Vetvicka V: β -glucans as Immunomodulators, *Jana*, 3:31-34, 2001.
21. Vetvicka V, Yvin JC: Effects of marine β -1,3-Glucan on immune reactions, *Int. Immunopharmacology*, 4:721-730, 2004.
22. Vetvicka V, Vetvickova V, Dvorak B, Richter J, Krizan J, Sima P, Yvin JC: Orally administered β -1,3-Glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity, *Int. J. Biol. Macromol*, 40:291-298, 2007.