

BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA SARKOPLAZMATIČNIH I MIOFIBRILARNIH PROTEINSKIH PROFILA U RAZLIČITIM KOBASICAMA TOKOM PERIODA ZRENJA

Ivan Samelak¹, Zoran Kukrić², Snježana Mandić², Dino Hasanagić¹, Svjetlana Pavičić², Snježana Matoš².
Univerzitet u Banjoj Luci, Prirodno-matematički fakultet, Banja Luka, RS, BiH
Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet, Banja Luka, RS, BiH

ISSN 2232-755X

UDC 637.5:546.21

DOI: 10.7251/GHTE1208013S

Naučni rad

SDS-PAGE elektroforezom analizirani su proteinski profili polusušenih kobasica proizvedenih u tradicionalnim i industrijskim uslovima. Pripremom uzoraka razdvojene su sarkoplazmatične i miofibrilarne frakcije. Računarskim programom Total Lab denzitometrijski su preračunate količine proteina u uzorcima i procentulane zastupljenosti pojedinačnih proteina. Molekulske mase proteina su proračunate na osnovu baždarne krive za standard poznatih molekulskih masa. Praćene su kvalitativne i kvantitativne promjene proteina tokom zrenja prvog, desetog i dvadesetog dana. Rezultati pokazuju različite vrijednosti između varijanti kobasica a takođe su evidentne i promjene tokom zrenja kod obe varijante u objema frakcijama. Tradicionalna kobasica u sarkoplazmatičnoj frakciji sadrži proteine srednjih i malih molekulskih masa (od 77-20 kDa) i samim tim trpi manje transformacije i razgradnju proteina, dok industrijska kobasica kroz isti period zrenja trpi veću razgradnju, veća je i učestalost različitih proteina (od 123-20 kDa). S druge strane miofibrilarne frakcije obe kobasice imaju sličan proteinski sastav (od 120-20 kDa) i trpe slične procese razgradnje i transformacije proteina. Obzirom na to da su se različito mijenjale i pH vrijednosti tokom eksperimenta razmatrano je u kojoj su mjeri ove promjene uticale na proteinske profile tokom zrenja. Ukupan intenzitet proteolitičkih procesa nije bio isti kod različitih kobasica iako je kod obe varijante nakon dvadesetog dana evidentno iščezavanje proteina većih molekulskih masa i povećanje broja proteina manjih molekulskih masa.

Ključne riječi: kobasice, sarkoplazmatični proteini, miofibrilarni proteini, SDS elektroforeza, zrenje, proteoliza

UVOD

Potrebe čovjeka za proteinima mogu biti kvalitativne (zavisno od količine azota) i kvantitativne (zavisno od količine aminokiselina). Međutim, još uvijek nije postignut jedinstven konsenzus i najbolje ih je planirati u ishrani tako da čine 10-15 % kalorijskog unosa na dan. The National Research Council trenutno smatra da je potrebno unositi 0,8 g proteina po kg tjelesne mase na dan. Potrebe u proteinima se mogu definisati kao ona količina proteina koja obezbjeđuje azotnu ravnotežu odraslih i pozitivni azotni bilans kod djece. Opšte je poznato da je meso odličan izvor proteina. Proteini iz mesa su visoko iskoristivi i sadrže značajan udio esencijalnih aminokiselina. Kobasice su česti i nezaobilazni proizvodi od mesa, veoma zastupljeni u ishrani savremenog čovjeka.

Korespondentni autor: Zoran Kukric, Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet, V. S. Stepanovića 73, 78000 Banja Luka, BiH, e-mail: zoran.kukric@gmail.com

Pripremaju se na osnovu proizvođačke specifikacije, i mogu se očekivati razlike u kvalitetu i sastavu ovih proizvoda od različitih proizvođača. Meso koje se koristi za izradu kobasica najčešće je izgrađeno od poprečno- prugastih mišića. Poprečno-prugasto mišićno tkivo čini najveći dio mišićne mase životinjskog tijela, ono izgrađuje mišićne trupa i udova, mišićne jezika, ždrijela, grkljana. Veći dio citoplazmatskog sadržaja mišićne ćelije čine kontraktilna vlakna-miofibrili, a manji dio koji se naziva sarkoplazma otpada na citoplazmin matriks sa ćelijskim organelama, zrcima glikogena, masnim kapima i mioglobinom(1).

Mišići životinja su povezani vezivnim tkivom, u čiji sastav ulaze proteoglikani, kolagen, elastična i retikulinska vlakna. Ukoliko kobasice sadrže više vezivnog tkiva u odnosu na mišićno imaju manju biološku vrijednost. Zbog toga je u propisima o kvalitetu proizvoda od mesa u mnogim zemljama pa i kod nas ograničen maksimalan sadržaj proteina vezivnog tkiva (2). Prema Pravilniku o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa sadržaj proteina mesa ili sadržaj ukupnih proteina mora biti najmanje 14%, a relativan sadržaj kolagena u proteinima je najviše 16% (3).

U velikom broju radova proučavane su kvalitativne i kvantitativne biohemijske karakteristike proteina u mesu u zavisnosti od starosti životinja i post-mortalnog perioda (4,5,6). Kad su u pitanju osobine gotovih proizvoda od mesa koja se mijenjaju tokom čuvanja većina istraživanja su posvećena mikrobiološkim i senzornim analizama. Mnogi podaci govore o tome da vrsta mesa utiče na kvalitet proizvoda (4, 7, 8, 9,). Fizičko-hemijske i biohemijske promjene u kobasicama koje se dešavaju tokom vremena čuvanja su kompleksne i intenzivne. Promjene nastaju većim dijelom usljed intenzivne aktivnosti prisutne mikroflore koja fermentacijom stvara mliječnu kiselinu i smanjuje pH vrijednost. S jedne strane acidifikacija potpomaže stvaranje boje i bolju koagulaciju proteina utičući tako na konzistenciju kobasica (10). S druge strane povećava se aktivnost mišićnih proteaza usljed smanjenja pH jer je njihov optimum pri nižim vrijednostima (11). Proteoliza uzrokovana aktivnošću endogenih i mikrobioloških proteinaza povećava sadržaj slobodnih aminokiselina, peptida i polipeptida koji utiču na miris i ukus kobasica (12). Važnost acidifikacije se ogleda i u tome što se na taj način smanjuje humiditet koji je važan faktor u razvoju mikroorganizama, kako patogenih, tako i onih koji utiču na senzorne karakteristike kobasica (13).

Proteinaze u mesu su lokalizovane u mišićnim ćelijama, kako u citosolu tako i u membranskim organelama, kao što su lizozomi i odgovorni su za degradaciju proteina u mesu u zavisnosti od starenja životinja. Literaturni podaci (14) pokazuju da najveći uticaj na ovaj fenomen ima kalpain sistem, a veliki značaj na biohemijske i strukturne promjene proteina imaju katepsini (EC B-3.4.22.1; L-3.4.22.15;D-3.4.24.5) (15). Lizozomalni katepsini (B, D, H i L), citosolne neutralne peptidaze (kalpain), dipeptidil peptidaze (I, II, III i IV), alanil, arginil, leucil, i piroglutamil aminopeptidaze izolovane iz skeletnih mišića svinja imaju veliki doprinos u teksturi mesa (16, 17).

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi kako se mijenja proteinski profil u sarkoplazmatičnoj i miofibrilarnoj frakciji kobasicama koje su proizvedene u industrijskim i u tradicionalnim uslovima tokom vremena stajanja te koliko se ovakve promjene mogu smatrati relevantnim u razmatranju kvaliteta proizvoda.

MATERIJAL I METODE

Odabir i priprema uzorka

Za analize u ovom eksperimentu uzete su dvije vrste polusušenih fermentisanih kobasica. Prva varijanta (A) je kobasica proizvedena u domaćinstvu u tradicionalnim uslovima, a napravljena je od kombinacije svinjskog i goveđeg mesa. Druga varijanta (B) je takođe polusušena fermentisana kobasica kombinacije svinjskog i goveđeg mesa ali dobijena industrijskom preradom. Kod obe vrste kobasica odnos svinjskog i goveđeg mesa je bio 90:10. Početak eksperimenta je računat od vremena datuma proizvodnje obe vrste uzoraka.

Priprema sarkoplazmatičnih i miofibrilarnih proteina

Ekstrakti sarkoplazmatičnih proteina su dobijeni prema metodi Toldrá i saradnici (18). Četiri grama kobasice homogenizovano je u 40 mL 0,03M natrijum- fosfatnog pufera (pH 7,4), pet minuta. Homogenizovana smjesa je centrifugirana 15 minuta na 6000 rpm. Supernatant sadrži sarkoplazmatične proteine. Miofibrilarni proteini ekstrahovani su iz taloga homogenizacijom sa rastvorom koji sadrži ureu (8M) i 1% β - merkptoetanol, dva minuta u blenderu . Homogenat je ponovo centrifugiran 15 minuta na 6000 rpm i dobijeni supernatant sadrži miofibrilarne proteine.

Proteinski ekstrakti soje su pripremani tako što se 1g soje sprasio u 4 mL 0,1M Na- fosfatnog pufera pH 6,4 i centrifugiran 15 minuta na 3000 rpm. Dobijeni supernatant sadrži solubilne proteine. Za ekstrakt jonskih proteina preostali talog iz solubilne frakcije je tretiran sa 3 mL Na- fosfatnog pufera (pH 7,0), centrifugiran 15 minuta na 3000 rpm. Nakon odstranjivanja supernatanta talog je inkubiran 30 minuta u 1 mL 100mM Na- fosfatnog pufera (pH 7,0) koji je sadržavao 1M NaCl, i centrifugiran 15 minuta na 3000 rpm. Dobijeni supernatant je sadržavao jonski vezane proteine.

Određivanje ukupnih proteina

Ukupni proteini u uzorcima određeni su metodom po Lowry-u. 1mL ekstrakta proteina (sarkoplazmatičnih i miofibrilarnih respektivno) pomiješa se sa 5 mL radnog rastvora (Na_2CO_3 u NaOH i $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ u K,Na-tartaratu), ova smjesa stoji 10 minuta, zatim se doda 0,6 ml rastvora Follin-a (Follin- Cicalteu-ov rastvor u odnosu 1:5 sa H_2O). Ova smjesa stoji pola sata u tamnom. Nakon stajanja mjeri se apsorbancu na 750 nm i određuju se proteini na osnovu baždarnih krive za BSA (BSA- Beef Serum Albumin).

Natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforza (SDS- PAGE)

Uzorci su prije elektroforeze pomješani sa puferom za uzorke (0,125M TrisCl, 4% SDS, 20% glicerol, 2% 2-merkptoetanol, Bromfenol plavo, pH 6,8) i grijani na 100°C ,10 minuta. Za sarkoplazmatične proteine upotrebljena je smjesa 12 % gela za razdvajanje i 4 % gela za koncentrovanje. Ista smjesa gelova je upotrebljena i za miofibrilarne proteine. I sarkoplazmatični i miofibrilarni proteinski uzorci analizirani su SDS- PAGE gel elektroforezom, metodom po Laemmliju (1970), upotrebom Mighty Small II SE 250 mini vertical Gel Electrophoresis jedinice (Hofer USA), napajanje PS 200- HC, 200W izlazna snaga (Hofer USA). Na gelove je nanijeto 10 μL uzorka sarkoplazmatičnih i 10 μL miofibrilarnih proteina. Prvo je puštena struja jačine 36 mA dok su uzoci putovali kroz gel za koncentrovanje, a kad su ušli u gel za razdvajanje jačina struje je podignuta na 40 mA. Elektroforeza je trajala oko 1 sat. Poslije elektroforeze, gelovi su bojeni bojom Commasie Brilliant Blue R- 250 (0,25%) u fiksativu (50% metanol, 7% sirćetna

kislina). Gelovi su obezbojeni korištenjem rastvora za obezbojavanje- 50% metanol, 7% sirćetna kiselina.

Određivanje pH- vrijedosti

pH vrednost sremeske kobasice merena je upotrebom ubodne staklene elektrode pH-metra (Hanna, HI pH 213 (Hanna Instruments USA)), u skladu je sa standardnom metodom ISO 2917/2004. Kalibracija je vršena standarnim puferima (Merck) na pH 4,0 i 7,0. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost tri mjerenja.

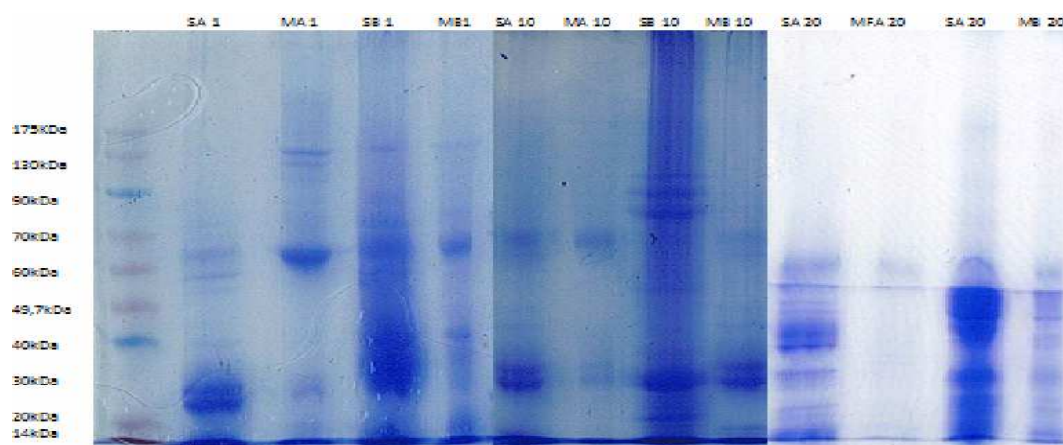
Statistička obrada podataka

Za određivanje kvantitativnog i kvalitativnog sadržaja proteina dobijenih SDS - PAGE gel elektroforezom korišten je program TotalLab TL 120. Za izračunavanje zapremine pojedinih proteina, koja ujedno predstavlja i relativnu količinu proteina takođe je korišten TotalLab TL 120. Na osnovu denzitometrije program je preračunao količinu proteina, a molekulske mase su određene na osnovu baždarne krive za standard poznatih molekulskih masa. Za ovo određivanje korišten je standard ProteinMolecularWeight Standard, range 12,4– 450 kDa. Serva. Rezultati su statistički obrađeni koristeći program Microsoft Excel 2010. (Microsoft Office 2010, USA) u okviru kojeg su računate razlike između prosječnih vrijednosti rezultata, za procjenu statističke značajnosti korišten je T.TEST na nivou značajnosti 5% ($p < 0,05$). Svi rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti tri ponavljanja \pm standardna devijacija (S.DEV).

REZULTATI I DISKUSIJA

Dobijene vrijednosti proteina metodom po Lowry-u: sarkoplazmatični proteini tradicionalna kobasica: 20,78 mg/gF.W., miofibrilarni proteini 21,55 mg/gF.W., sarkoplazmatični proteini industrijska kobasica: 20, 35 mg/gF.W., miofibrilarni proteini 20, 11 mg/F.W. Za potrebe poređenja urađeni su i uzorci soje i to solubilni i jonski vezani proteini, solubilni 13,22 mg/F.W., jonski 11,98 mg/gF.W.

Nakon elektroforetske analize obe varijante kobasica su pokazale različite proteinske profile u sarkoplazmatičnim i miofibrilarnim frakcijama tokom zrenja. Prvog dana analize uočena je razlika između dvije varijante kobasica u obe proteinske frakcije, kako u pogledu molekulskih masa tako i u pogledu ukupne količine proteina koja se dobila na osnovu denzitometrije proteinskih traka (slika 1). Na gelu dobijenom desetog dana analize primjećena je preraspodjela molekulskih masa proteina koja je naročito izražena u sarkoplazmatičnoj frakciji industrijske kobasice. Dvadesetog dana se može uočiti gubitak svih proteina većih molekulskih masa dok se intenzitet traka pojačao kod manjih proteina, naročito u zonama između 40 i 60 kDa.



Slika 1: Prikaz gelova dobijenih nakon SDS-PAGE elektroforeze. SA i MA su sarkoplazmazične i miofibrilarne frakcije tradicionalne kobasice, a SB i MB su sarkoplazmazične i miofibrilarne frakcije industrijske kobasice. Promjene su praćene nakon prvog, desetog i dvadesetog dana eksperimenta. Lijevo je prikaz molekulskih masa standarda.

Figure 1: The display of gels obtained after SDS-PAGE electrophoresis. SA and MA are sarcoplasmatic and myofibrillar fractions of traditional sausage, whereas SB and MB are sarcoplasmatic and myofibrillar fractions of industrial sausage. Changes were observed after the first, the tenth and the twentieth day of the experiment. On the left, there are molecular masses of standard types.

Tabela 1: Prikaz sadržaja sarkoplazmazičnih proteina tradicionalne kobasice sa molekulskim masama (MW), denzitometrijski određenim udjelima pojedinih proteina u uzorcima (Vol.), i procentualnim udjelom svakog proteina u ukupnoj zapremini. Promjene su praćene tokom prvog, desetog i dvadesetog dana.

Table 1: The display of the content of traditional sausage's sarcoplasmatic proteins with molecular masses (MW), densitometrically specified proportions of each protein in the sample (Vol.), and the percentage share of each protein in the total volume. Changes were monitored during the first, the tenth and the twentieth day.

S.P. tradic. kob. prvi dan S.P. traditional sausage Day1			S.P. tradic. kob. deseti dan S.P. traditional sausage Day10			S.P. tradic. kob. dvadeseti dan S.P. traditional sausage Day20		
MW (kDa)	Vol+Bckgr (pix.)	% vol.	MW (kDa)	Vol+Bckgr (pix.)	% vol.	MW (kDa)	Vol+Bckgr (pix.)	% vol.
77,8	8754	7,54	-	-	-	-	-	-
63,5	19250	16,57	63,5	5002	5,4	-	-	-
57,8	11073	9,53	-	-	-	57,8	59908	19,1
-	-	-	45,9	9770	10,55	45,9	51668	16,48
-	-	-	-	-	-	40,1	60214	19,2
36,7	9815	8,45	36,7	10180	10,99	-	-	-
-	-	-	30,1	33577	36,25	30,1	32307	10,3
26,8	28124	24,21	26,8	34098	36,81	26,8	67703	21,59
23,5	39139	33,70	-	-	-	23,5	18809	6
-	-	-	-	-	-	20,5	22965	7,62
Σ	116155 ±3,48	-	-	96627 ±3,21	-	-	313574 ± 2,21	-

Rezultati u tabeli 1 pokazuju da u sarkoplazmazičnoj frakciji tradicionalne kobasice tokom perioda zrenja od 20 dana dominiraju proteini manjih molekulskih masa (oko 50 kDa). Protein molekulske mase 77,8 kDa potpuno isčezava u prvih deset dana, dok se procenat proteina molekulske mase 63,5 kDa vidno smanjio u prvih deset dana (sa 16,5 na 5%), a nakon toga

potpuno je nestajo. Deseti dan vidljiva je pojava proteina molekulske mase 45,9 kDa, čiji procenat narednih deset dana raste (sa 10,5 na 16,5%), što je vjerovatno posljedica razgradnje proteina većih molekulskih masa. Ukoliko se uporede denzitometrijske vrijednosti svih proteina sarkoplazmatske frakcije prvog i desetog dana ne možemo reći da je došlo do statistički značajne promjene, $p > 0,05$ (tabela 1). Statistički značajne promjene dešavaju se tek nakon desetog dana ($p < 0,05$).

Tabela 2: Prikaz sadržaja sarkoplazmatskih proteina industrijske kobasice sa molekulskim masama (MW), denzitometrijski određenim udjelima pojedinih proteina u uzorcima (Vol.), i procentualnim udjelom svakog proteina u ukupnoj zapremini. Promjene su praćene tokom prvog, desetog i dvadesetog dana.

Table 2: The display of the content of industrial sausage's sarcoplasmatic proteins with molecular masses (MW), densitometrically specified proportions of each protein within the samples (Vol), and the percentage share of each protein within the total volume. Changes were monitored during the first, the tenth and the twentieth day.

S.P. ind.kob. prvi dan S.P. industrial sausage Day1			S.P. ind.kob. deseti dan S.P. industrial sausage Day10			S.P. ind.kob. dvadeseti dan S.P. industrial sausage Day20		
MW (kDa)	Vol+Bckgr (pix.)	% vol.	MW (kDa)	Vol+Bckgr (pix.)	% vol.	MW (kDa)	Vol+Bckgr (pix.)	% vol.
123	11226	4,44	-	-	-	-	-	-
-	-	-	103,3	34081	8,39	-	-	-
92,3	15729	6,22	92,3	49565	12,2	-	-	-
-	-	-	83,2	69853	17,19	-	-	-
75,2	24561	9,71	-	-	-	-	-	-
63,5	32893	13,01	63,5	66358	16,33	-	-	-
-	-	-	-	-	-	57,8	119989	24,85
-	-	-	52,4	32888	8,09	-	-	-
-	-	-	-	-	-	45,5	97567	20,21
-	-	-	-	-	-	40,1	97923	20,28
36,6	51559	20,41	-	-	-	-	-	-
28,7	83525	33,03	28,7	49562	12,19	-	-	-
-	-	-	26,5	58038	14,28	-	-	-
22,2	33305	13,17	22,2	46058	11,33	22,2	72298	14,97
-	-	-	-	-	-	20,2	56684	11,74
Σ	-	252838±3,88	-	406430±5,76	-	-	482849±3,22	-

Rezultati u tabeli 2 pokazuju da industrijski proizvedene kobasice u sarkoplazmatskoj frakciji imaju veći sadržaj proteina u odnosu na tradicionalnu (tabela 1). Takođe, ukupne količine proteina međusobno se razlikuju ($p < 0,05$). Iz podataka se vidi da u prvih deset dana u industrijskoj kobasici dominiraju proteini većih molekulskih masa (123- 75 kDa), što nije bio slučaj kod tradicionalne kobasice. U ovom periodu protein molekulske mase 92,3 se procentualno povećao za skoro 100%, što je vjerovatno posljedica razgradnje težih proteina (123 kDa). Takođe protein molekulske mase od 63,5 kDa u prvih deset dana procentualno raste (sa 13 na 16%). Vidljivo je da nakon desetog dana u ovoj kobasici skoro potpuno iščezavaju proteini većih molekulskih masa, samim tim se nagrađuju i nastaju manji proteini, što su uočili Živković i saradnici (6) prilikom analize sremske kobasice

Tabela 3: Prikaz sadržaja miofibrilarnih proteina tradicionalne kobasice sa molekulskim masama (MW), denzitometrijski određenim udjelima pojedinih proteina u uzorcima (Vol.), i procentualnim udjelom svakog proteina u ukupnoj zapremini. Promjene su praćene tokom prvog, desetog i dvadesetog dana.

Table 3: The display of the content of traditional sausage's myofibrillar proteins with molecular masses (MW), densitometrically specified proportions of each protein within the sample (Vol), and the percentage share of each protein within the total volume. Changes were monitored during the first, the tenth and the twentieth day.

M.F. tradic. kob. prvi dan M.F. traditional sausage Day1			M.F. tradic. kob. deseti dan M.F. traditional sausage Day10			M.F. tradic. kob. dvadeseti dan M.F. traditional sausage Day20		
MW (kDa)	Vol.+Bckgr (pix.)	% pix.	MW (kDa)	Vol.+Bckgr (pix.)	% pix.	MW (kDa)	Vol.+Bckgr (pix.)	% pix.
120,1	13557	14,97	-	-	-	-	-	-
103,6	9544	10,53	-	-	-	-	-	-
63,5	38786	42,78	63,5	51837	57,8	-	-	-
-	-	-	-	-	-	57,8	31246	60,76
-	-	-	32,5	27860	33,5	32,5	10626	20,66
26,5	18110	19,97	26,5	20862	20,5	-	-	-
20,5	10654	11,75	-	-	-	20,5	9544	18,58
Σ	90671 ± 5,22			100559 ± 3,95			51423 ± 3,02	

Rezultati u tabeli 3 pokazuju intenzivnu razgradnju miofibrilarnih proteina kod tradicionalne kobasice sa velikim molekulskim masama (120, 103 kDa) tokom prvih deset dana. vidljivo je takođe da broj miofibrilarnih proteina značajno opada (od početnih 5 do krajnja 3) nakon prvih deset dana i taj trend opadanja se nastavlja i nakon dvadeset dana. Procenat proteina molekulske mase od 20,5 kDa je tokom dvadeset dana se povećao za skoro 100% u odnosu na početnu količinu.

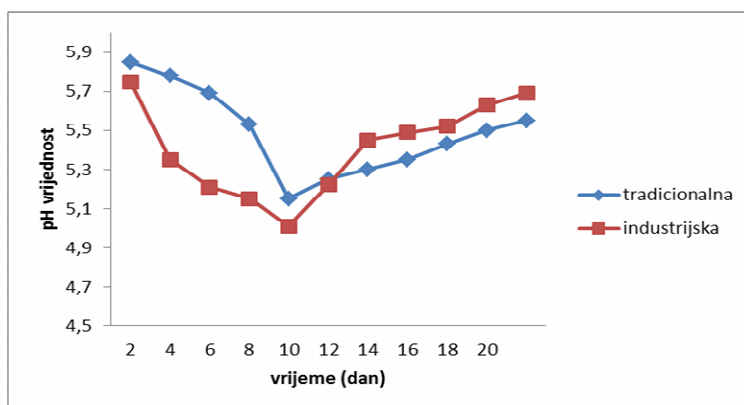
Tabela 4: Prikaz sadržaja miofibrilarnih proteina industrijske kobasice sa molekulskim masama (MW), denzitometrijski određenim udjelima pojedinih proteina u uzorcima (Vol.), i procentualnim udjelom svakog proteina u ukupnoj zapremini Promjene su praćene tokom prvog, desetog i dvadesetog dana.

Table 4: Myofibrillar protein content of industrial sausage with molecular masses (MW), densitometrically specified proportions of each protein within the sample (Vol), and the percentage share of each protein within the total volume. Changes were monitored during the first, the tenth and the twentieth day.

M.F. ind.kob. prvi dan M.F. industrial sausage Day1			M.F. ind.kob. deseti dan M.F. industrial sausage Day10			M.F. ind.kob. dvadeseti dan M.F. industrial sausage Day20		
MW (kDa)	Vol.+Bckgr (pix.)	% vol.	MW (kDa)	Vol.+Bckgr (pix.)	% vol.	MW (kDa)	Vol.+Bckgr (pix.)	% vol.
124,3	5002	3,44	-	-	-	-	-	-
102,5	9770	6,71	-	-	-	-	-	-
74,4	10180	7,00	-	-	-	-	-	-
63,5	33577	23,08	63,5	48466	23,41	-	-	-
-	-	-	-	-	-	57,8	25670	11,38
-	-	-	45,6	16321	7,89	45,6	60859	26,97
-	-	-	40,3	22175	10,71	-	-	-
35	34098	23,43	-	-	-	35	42590	18,87
-	-	-	30,1	50855	24,57	-	-	-
26,5	23583	16,21	26,5	559592	28,79	26,5	48807	21,63
-	-	-	-	-	-	23,5	22086	9,79
20,7	29302	20,14	20,7	9578	4,63	20,7	25637	11,36
Σ	145512 ± 4,75			206987 ± 4,33			225649 ± 3,65	

Iz tabele 4 vidljiva je povećana relativna količina miofibrilarnih proteina u industrijski dobijenoj kobasici. Kao i u prethodnoj tabeli, i kod ove kobasice trend opadanja i razgradnje proteina velikih molekulskih masa se nastavlja (isčezavaju proteini molekulskih masa 124, 102, 74 kDa tokom prvih deset dana zrenja). Iako je u ovoj kobasici u miofibrilarnoj frakciji veći sadržaj različitih proteina nego što je to slučaj kod tradicionalne kobasice, procentualni sadržaj svakog od njih nije toliko značajno povećan sa zrenjem kobasice. Naime, neki od proteina manjih molekulskih masa, npr. 35, 26,5, 20,7 kDa su povećali svoj procentualni sadržaj u ukupnoj smjesi, ali ne toliko značajno da bi se govorilo o nekom velikom pomaku i odstupanju. Primjećeno je da se kod analize miofibrilarnih proteina sremske kobasice (6) u periodu zrenja dolazi do proteolize teškog miozina i komigracije drugih proizvoda razgradnje. Pri tome se pojačava intenzitet traka u zonama α - aktinina (97 kDa) kao i molekulskih masa oko 60 kDa što se dešava i u ovim uzorcima.

Ova razlika bi se možda mogla dovesti u vezu sa različitim promjenama pH vrijednosti koje su pratile analizirani period. Zbog toga se mjerio pH vrijednosti kobasica u periodu od 20 dana. (slika 2)



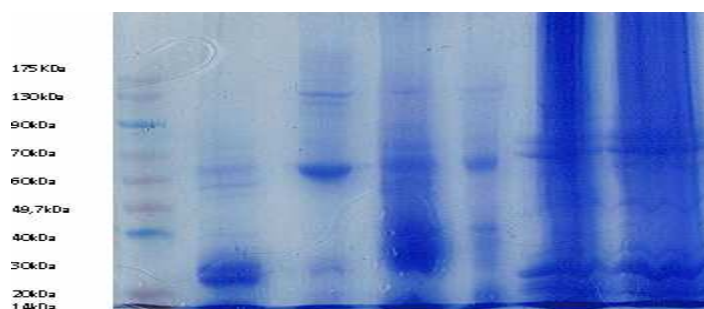
Slika 2: Promjena pH vrijednosti u uzorcima A i B tokom 20 dana
Figure 2: Changes in pH of samples A and B during 20 days.

Iz slike 2 je vidljivo da je kod domaće kobasice pH vrijednost u prvih 10 dana imala trend opadanja, (od 5,85 do 5,15), dok je nakon toga uočen blagi porast i nakon 20 dana dostigao vrijednost od 5,55. Kod industrijske kobasice kriva promjena pH vrijednosti je imala nešto oštiri pad u prvih 8 dana (od 5,75 do 5,01). Nakon toga kiselost je opadala i 20-og dana dostigla je vrijednost od 5,69.

Inicijalni pad pH vrijednosti u kobasicama je primjećen i u nekim drugim radovima. Nakon inicijalnog pada pH vrijednosti dolazi do njegovog povećanja u toku procesa zrenja kao posljedica proteolitičkih promjena, jer se u tom slučaju povećava i količina amonijaka kao posljedica dezaminacije aminokiselina. (19, 20, 6).

Tradicionalna kobasica je pokazala povećanje ukupne količine sarkoplazmatskih proteina, smanjenje miofibrilarnih, kao i iščezavanje nekih proteina većih molekulskih masa i pojavu proteina manjih molekulskih masa. Industrijska kobasica se razlikovala od domaće samo po tome što je kod nje došlo do povećanja ukupnih miofibrilarnih proteina. Ovakav intenzivan proteolitički proces je u skladu sa promjenom pH vrijednosti tokom 20 dana zrenja kobasica.

Razlog za nešto bržu promjenu pH bi se možda mogao dovesti u vezu sa sastavom proteina. U industriji mesnih proizvoda koriste proteini soje u cilju poboljšanja proteinskog kvaliteta. Zbog toga je rađena i SDS elektroforeza uzorka soje paralelno sa uzorcima kobasica. Poređenjem proteinskih profila sarkoplazmatskih i miofibrilarnih frakcija obe vrste kobasica sa uzorcima soje uočava se veća sličnost proteina industrijski proizvedene kobasice nego onih kod domaće kobasice (slika 3). Kod domaće kobasice se samo jedan protein (77,8 kDa) podudara sa proteinima soje dok kod industrijske postoji 6 podudarnih proteina (123, 92,3, 75,2, 26,5, 23,5, 20,7kDa).



Slika 3: Prikaz gela dobijenog nakon SDS-PAGE elektroforeze proteina domaće kobasice A i industrijske kobasice B i soje. SA i MA-sarkoplazmatska i miofibrilarna frakcija domaće kobasice; SB i MB- frakcije industrijske kobasice; S1 i S2 uzorci soje (solubilna i jonska frakcija).

Figure 3: The display of gel obtained after SDS-PAGE electrophoresis of proteins in homemade sausage A and industrial sausage B and soybeans. SA and MA-sarcoplasmatic and myofibrillar fractions of homemade sausage; SB and MB-fractions of industrial sausage, S1 and S2 samples of soybean (soluble and ion fractions).

S obzirom na to na i brojni drugi faktori utiču na osobine proteina u kobasicama ne možemo sa sigurnošću tvrditi da se pH vrijednost mijenja samo u zavisnosti od sastava proteina. Prema literaturnim podacima promjene pH vrijednosti u različitim vrstama kobasica zavise i od drugih bitnih faktora kao što su npr neintenzivna fermentacija mliječne kiseline, inicijalna početna vrijednost pH uzorka, produkti razgradnje tokom starenja (22), ili svojstva mikroorganizama (23). Takođe postoje nalazi da pH vrijednost zavisi i od omotača kobasice, odnosno da prirodni omotači u domaćim i vještački u industrijskim kobasicama različito zadržavaju vlažnost, što utiče na aciditet (24) kao i da proces sušenja utiče na proteolitičke enzime (25).

ZAKLJUČAK

Nakon urađenih analiza kobasice proizvedenih u industrijskim i u tradicionalnim uslovima su pokazale međusobno različite proteinske profile i u sarkoplazmatskoj i u miofibrilarnoj frakciji. Tokom vremena zrenja za period od dvadeset dana ove razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu proteina su postajale veće tako što je trend promjene molekularnih masa i ukupnog sadržaja imao drugačiji tok u međusobnom poređenju varijanti. Kobasice proizvedene u tradicionalnim uslovima su imale sporiji tok promjene pH vrijednosti, naročito u drugoj polovini vremena zrenja. Tačka minimuma domaće kobasice je bila niža u odnosu na industrijski proizvedene koje su ujedno imale i brže promjene pH vrijednosti. Ako pogledamo sveukupne proteinske promjene u cijelom periodu zrenja ne možemo sa sigurnošću odrediti u kojoj varijanti kobasica je došlo do većih promjena, iako su razlike očigledne.

Određivanjem nekih drugih parametara kao što su određivanje vlažnosti, senzorne osobine ili mikrobiološka ispitivanja, vjerovatno bi se dobila jedna kompleksnija slika promjena i preciznije definisanje rezultata.

LITERATURA

1. Anđelković, Z., LJ. Somer, M. Matavulj, V. Lačković, D. Lalošević, I. Nikolić, Z. Milosavljević, V. Danilović: Čelija i tkiva, Bonafides, (2002), str.115- 119.
2. Harper,S.G., G.P. Allingham, A.R. Hunter: The significance of connective tissueand content to meat quality: growth path and nutritional history, 43rd ICoMST, Auckland, New Yeeland, Proceed, (1997) pp. 88.
3. Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa, službeni glasnik RS, br. 31/2012.
4. Oritz-Somovilla V., F. España-España, E.J. De Pedro, A. Sanz Gaitán-Juardo: Meat mixture detection in Iberian pork sausages, Meat Science, 71 (2005) 490-497.
5. Vuković, I., O. Bunčić, Lj. Babić, P. Radetić, S. Bunčić: Ispitivanje važnijih fizičkih, hemijskih i bioloških promjena u toku zrenja kulena. Tehnologija mesa, 2 (1989), 34-39.
6. Živković, D., V. Tomović, M. Perunović, S. Stajić, N. Stanišić, N. Bogićević: Senzorna prihvatljivost sremske kobasice izrađene od mesa svinja različite starosti. Tehnologija mesa, 52 (2011) 252- 261.
7. Berdagué J.L., M.Bonnaud , S. Rousset , C.Touraille : Influence of pig crossbreed on the composition, volatile compound content and flavour of dry cured ham. Meat Science, 34 (1993) 119-129.
8. Rosel, C., F. Toldra: Comparison of muscle proteolytic and lipolytic enzyme levels in raw hams from Iberian and white pigs. Journal of the Science of Food and Agriculture, 76 (1998) 117-122.
9. Alagić, D., N. Zdolec, B. Njari, I. Filipović, A. Ekert- Kabalin, G. Čorić- Alagić, M. Stojanović, Ž. Cvrtila- Fleck, L. Kozačinski: Kakvoća fermentiranih kobasica od konjskog mesa tijekom tri proizvodne sezone. Meso, 4 (2011) 250- 255.
10. Cenci-Goga B.T., D. Ranucci, D. Miraglia, A. Cioffi: Use of starter cultures of dairy origin in the production of Salame nostrano and Italian dry cured sausage. Meat Science, 78 (2008)381-390.
11. Molly, K., D. Demeyer, G. Johansson , M.Raemaekers , M. Ghistelnic, I. Geenen: The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. Food chemistry, 59 (1997) 539-545.
12. Hierro, E., L. de la Hoz, J.A. Ordóñez: Contribution of the microbial and meat endogenous enzymes to the free aminoacid and amine contents of dry fermentes sausages. Journal of Agricultural Food Chemistry, 47 (1999)1156-1161.
13. Fernández ,M., J.A.Ordóñez, J.M. Bruna, B. Herranz, L. Hoz: Accelerated ripening of dry fermented sausages. Trends in Food Science & Technology 11 (2000) 201-209.
14. Quali A., A.Tamant : Calpain and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscle . Meat Science, (1990) 331-348.
15. Gil, M., M. Hortos, C. Sarraga: Calpain and cathepsin activities, and protein extractability during ageing of longissimus porcine muscle from normal and PSE meat. Food Chemistry, **63** (3) (1998) 385-390.

16. Da Lun, XU., H. Xiao- chun, W. Hai- hong: Review of Biochemical Properties of Proteolytic Enzymes of Skeletal Muscle and Their Roles in Meat Texture Development, *Food Science*, 25 (2004) 191-196.
17. Sentandreu, M.A., F. Todrá: Dipeptidyl peptidase IV from porcine skeletal muscle: purification and biochemical properties(J). *Food Chemistry*, 69 (2001) 159- 168.
18. Toldrá, F., E. Rico, J. Flores: Cathepsin B,D,H and L activities in the processing of dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62 (1993) 157- 161.
19. Salgado,A., M.C.G. Fontan, I. Franco, M.Lopez, J. Carballo: Biochemical changes during the ripening of Choriso de cebolla, a Spanish traditional sausage. Effect of the system of manufacture (homemade or industrial). *Food Chemistry*, 92 (3) (2005) 413-424.
20. Kozačinski, L., E. Drosinos, F. Čaklavica, L. Cocolin, L., J.Gasparik-Reichardt, S. Vesković: Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages. *Food Technology and Biotechnology*, 46 (2008) 93-106.
21. Visessanguan, W., S.Benjakul, W.Potachareon, A. Panya, S. Riebroy: Accelerated proteolysis of soy proteins during fermentation of Thua-nao inoculated with *Bacillus subtilis*. *Journal of Food Biochemistry*, 29 (4) (2005) 349-366.
22. DallaSanta,O.R., F.A. Coelho, J.R.S. Freitas, H.S. Dalla Santa,N.N. Terra: Características de salamis fermentados producidos sin audición de cultivo iniciador. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(2006) 231- 236.
23. Cortez Sawitzki, M., A.M. Fiorentini,Junior A. Cunha Junior, T.M. Bertol,E.S. Sant'anna: *Lactobacillus plantarum* AJ2 isolated from naturally fermented sausage and its effects on the technological properties of Milano- type salami. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 28 (2008) 709- 717.
24. Petrović,LJ., N.Džinić, P. Ikonić,T.Tasić,V.Tomović: Quality and safety standardization of traditional fermented sausages. *Tehnologija mesa* 52 (2011) 234- 244.
25. Ikonić,M.P., T.A. Tasić, LJ.S. Petrović, M.R. Jokanović, S.B.Savatić,V.M.Tomović, N.R. Džinić, B.V. Šojić: Effect of drying and ripening methods on proteolysis and biogenic amines formation in traditional dry fermented sausage Petrovska klobasa. *Food and Feed Research*, 38 (2011) 1-8.

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF SARCOPLASMATIC AND MYOFIBRILLAR PROTEIN PROFILES IN VARIOUS SAUSAGES DURING THE RIPENING PERIOD

*Ivan Samelak¹, Zoran Kukrić², Snježana Mandić², Dino Hasanagić¹, Svetlana Pavičić², Snježana Matoš².
University of Banja Luka, Faculty of Sciences, Banja Luka, RS, B&H
University of Banja Luka, Faculty of technology, Banja Luka, RS, B&H*

The protein profiles of semi-dried sausages, which were produced under both traditional and industrial conditions, have been analyzed by using SDS-PAGE electrophoresis. As the samples were prepared, the sarcoplasmatic and myofibrillar fractions were split. The Total Lab computer programme performed the densitometric calculation of the protein amount within the samples and the percentage of each individual protein. The molecular mass of the proteins was estimated on the basis of the tonnage curve for the standard of common molecular masses. The qualitative and quantitative protein alterations were monitored on 1st, 10th, and 20th day of the ripening period. However, the results indicate different values among the sausage samples, and there were

evident changes during the ripening period with both types within both fractions. The traditional sausage in sarcoplasmatic fraction contains proteins of medium and small molecule masses (77- 20 kDa), thus being less susceptible to the protein transformation and degradation, whereas the industrial sausages suffer stronger degradation within the same ripening period and there is a larger variety of proteins (123-20 kDa). On the other hand, the myofibrillar fractions of both types of sausages displayed similar protein content (120-20 kDa) and sustain similar processes of protein degradation and transformation. As pH values altered during the experiment, we analyzed to which extent those alterations affected the protein profiles within the ripening phase. The total intensity of proteolytic processes varied with different sausages though, upon 20th day, both types evidently lost proteins of larger molecular mass and increased proteins with smaller masses.

Key words: *sausages, sarcoplasmatic proteins, myofibrillar proteins, SDS electrophoresis, ripening, proteolysis*

Rad primljen: 14. 10. 2012.

Rad prihvaćen: 06. 11. 2012.