



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKE NAUKE

**TERMALNA SVOJSTVA PROTEINA  
MESA U PROCESU OSMOTSKE  
DEHIDRATACIJE U MELASI  
ŠEĆERNE REPE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Ljubinko Lević

dr Branislav Simonović

Kandidat:

mr Sanja Ostojić, dipl.inž.

Novi Sad, 2015. godine

Mentorima ovog rada, prof.dr Ljubinku Leviću i dr Branislavu Simonoviću, naučnom savetniku, iskreno se zahvaljujem na brojnim savetima, pokazanom interesu i podršci tokom izrade ovog rada.

UNIVERZITET U NOVOM SADU  
 TEHNOLOŠKI FAKULTET  
 KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	mr Sanja Ostojić, dipl.inž.
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Ljubinko Lević, redovni profesor dr Branislav Simonović, naučni savetnik
Naslov rada: NR	<b>Termalna svojstva proteina mesa u procesu osmotske dehidracije u melasi šećerne repe</b>
Jezik publikacije: JP	Srpski jezik, latinica
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2015.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, Novi Sad

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 6 / stranica 180/ slika 57 / tabela 19/ referenci 231/ priloga 0)
Naučna oblast: NO	Prehrambeno-biotehnoške nauke
Naučna disciplina: ND	Prehrambeno inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Termalna analiza, svinjsko meso, osmotska dehidracija, melasa šećerne repe
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakluteta u Novom Sadu
Važna napomena: VN	Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom finansirana su od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije – TR31055 i TR 31093(2011-2015)
Izvod: IZ	<p>Termalne osobine svinjskog mesa (<i>Longissimus dorsi</i>) osmotski dehidratiranog u melasi šećerne repe i svežeg svinjskog mesa praćene su metodama termalne analize: Diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC), termogravimetrijskom analizom (TGA), modulovanom diferecijalnom skenirajućom kalorimetrijom (MDSC). Dobijeni rezultati pokazuju postojanje novonastale proteinske osnove osmotski dehidratiranog svinjskog mesa koji je posledica smanjenja količine vode i interakcije komponenti melase s proteinima mesa. Nađeno je da osmotskom dehidratacijom dolazi do promene i pregrupisavanja preostale slobodne vode u dva oblika, što ukazuje na mehaničko strukturne promene u interfibrilarnoj mreži i pojednostavljivanje strukture proteinske osnove. Definisani su nastali strukturni nivoi proteinske osnove: strukturni nivo vode vezane na protein tj. postojanje proteinske strukture i posle osmotske dehidratacije -strukturni nivo I; strukturni nivo mreže sa ujednačeno manjim porama tj. nivo energetske jače vezane imobilizirane -strukturni nivo II; strukturni nivo mreže sa ujednačeno većim porama tj. nivo energetske slabije vezane imobilizirane -strukturni nivo III.</p> <p>Ispitivanjem termalnih osobina uzoraka osmotski dehidratiranog mesa sa smanjenom vlagom (ispod 20%) nađeno je postojanje staklastog prelaza pošto je najveća količina</p>



	<p>vode vezana za čvrsti matriks.</p> <p>Definisani su optimalni uslovi rehidracije osmotski dehidratiranog svinjskog mesa, te su određene Pelegove konstante rehidracije.</p> <p>Nađeno je postojanje nativnih struktura proteina u osmotski dehidriranom mesu i određeni su kinetički parametri denaturacije (<math>E_a</math>, <math>\alpha</math>) svežeg i osmotski dehidriranog mesa.</p> <p>Određen je sadržaj makroelemanata osmotski sušenog svinjskog mesa.</p> <p>Radi objašnjenja složenosti interakcija proteina mesa i sastojaka osmotskog rastvora melase koje se odvijaju pri dehidraciji, kao model sistem poslužila je interakcija proteina albumina govedjeg seruma (BSA) s jonima nekih makroelemanata prisutnih u melasi.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	22.11.2013.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednica: <b>dr Natalija Džinić</b>, vanredni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad</p> <p>član: <b>dr Ljubinko Lević</b>, redovni profesor – mentor, Tehnološki fakultet, Novi Sad</p> <p>član: <b>dr Branislav Simonović</b>, naučni savetnik-mentor, Institut za opštu i fizičku hemiju, Beograd</p> <p>član: <b>dr Ivan Pavkov</b>, docent, poljoprivredni fakultet Novi Sad</p>

UNIVERSITY OF NOVI SAD  
 FACULTY OF TECHNOLOGY  
 KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	
Author: AU	Sanja Ostojić, MSc
Mentor: MN	<b>Ljubinko Lević</b> , Ph.D., Full Professor <b>Branislav Simonović</b> , Ph.D., Full Research Professor
Title: TI	<b>Thermal Properties of Meat Proteins in the Process of Osmotic Dehydration in Sugar Beet Molasses</b>
Language of text: LT	Serbian language, Latin
Language of abstract: LA	eng. / serb.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2015.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Bulevar cara Lazara 1, Novi Sad

Physical description: PD	6 chapters, 180 pages, 57 figures, 19 tables, 231 references
Scientific field SF	Food-biotechnical Sciences
Scientific discipline SD	Food Engineering
Subject, Key words SKW	Thermal analysis, pork meat, osmotic dehydration, sugar beet molasses
UC	
Holding data: HD	
Note: N	
Abstract: AB	<p>Thermal properties of pork meat (<i>Longissimus dorsi</i>) osmotically dehydrated in sugar beet molasses and fresh pork were followed by the methods of thermal analysis: Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric Analysis (TGA), Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC). The results indicate the existence of newly formed protein matrix as a consequence of osmotic dehydration of pork meat: reducing the amount of water and the interaction of the components of molasses and meat proteins. It has been found that changes were induced by the process of osmotic dehydration, and rearrangement of the remaining free water in two forms. Also as a consequence of the osmotic dehydration, structural changes in the interfibrillar network and simplifying of the original structure of the meat protein matrix were occurred. A structural levels of protein matrix were defined: as structural level of the water bound to the protein, meaning the existence of protein structure and after osmotic dehydration <b>Structural level I</b>; a structural level with uniformly small pores in the network of formed protein matrix: energy level of more tightly immobilized water –<b>Structural level II</b>; and structural level of network with uniformly larger pores, energy level of lower bound immobilized water - <b>Structural level III</b>. By characterization of the thermal properties of the samples of osmotically dehydrated meat with reduced moisture (below 20%) the glass transition was found, as most of the water</p>

	<p>bound to a solid matrix. The optimal conditions for rehydration of dehydrated pork meat were defined, and Peleg's rehydration constants were obtained. It was found that the existence of the native structure of the protein in the osmotically dehydrated meat, and the kinetic parameters of protein denaturation (<math>E_a</math>, <math>\alpha</math>) of fresh and dehydrated meat were obtained. The content of macroelements in the osmotically dehydrated, fresh pork meat and in the sugar beet molasses were obtained. In order to explain the complexity of the interaction of meat proteins with the components of the osmotic solution - molasses that occur in the dehydration process, the model-system of the protein bovine serum albumin (BSA) interaction with the ions were implied to present simple interaction of some major elements with a protein matrix followed by DSC and ITC .</p>
<p>Accepted on Scientific Board on: AS</p>	<p>22.11.2013.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: <b>Natalija Đinić</b>, Ph.D., Associate Professor, Faculty of Technology, Novi Sad University of Novi Sad</p> <p>member: <b>Ljubinko Lević</b>, Ph.D., Full Professor, Faculty of Technology, Novi Sad University of Novi Sad,</p> <p>member: <b>Branislav Simonović</b>, Ph.D., Full Research Professor, Institute of General and Physical Chemistry, Belgrade</p> <p>member: <b>dr Ivan Pavkov</b>, Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad</p>

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	12
2. PREGLED LITERATURE.....	15
2. 1. Osmotska dehidracija.....	15
2.2. Osmotska dehidracija mesa.....	17
2.3. Osmotska dehidracija mesa u melasi šećerne repe .....	20
2.4. Struktura svinjskog mesa .....	22
2.4.1. Proteini mesa, struktura i sastav mišića .....	22
2.5. Zadržavanje vode u tkivu mesa.....	33
2.5. 1. Hipoteze o zadržavanju vode u mesu.....	33
2.6. Voda u biološkim sistemima.....	38
2.6. 1. Površinska sila .....	39
2.6. 2. Električna sila dvosloja .....	40
2.6.3. Hidrofobne interakcije .....	40
2.6.4. Odbojne entropijske sile .....	40
2.7. Intracelularna tečnost.....	41
2.7. 1. Uticaj soli/jona na strukturu vode: visoke i niske gustine vode.....	41
2.7.2. Uticaj proteina na strukturu vode/uticaj vode na strukturu proteina.....	43
2.8 . Uticaj raspodele jona na sistem mišićnih proteina i njihovo zadržavanje vode .....	45
2.8 1. <i>Hofmeister</i> -ova serija .....	45
2.8 2. Zakon usklađivanja afiniteta vode .....	46
2.8.3. Pre- i post-mortem sarkomerne jonske vrste i jonske jačine .....	47
2.8.4. Dodavanje soli .....	49
2.8.5. Površinske sile .....	52
2.9. Struktura i raspodela vode u mišićnom tkivu <i>in vivo</i> .....	54
2.9.1. Voda vezana za protein.....	55
2.9.2. Nepokretna voda .....	55
2.9.3. Slobodna voda.....	56
2.9.4. <i>Post mortem</i> proteoliza .....	56
2.9.5. <i>Post mortem</i> oksidacija proteina .....	56
2.10. Termalna analiza hrane .....	57
2.10.1. Neravnotežno stanje i prelazi neravnotežnog stanja .....	58

2.10.2. Staklasti prelaz i plastifikacija vodom .....	60
2.10.3. Termalna analiza mesa.....	62
3. EKSPERIMENTALNI DEO .....	66
3.1. Materijali i metode.....	66
3.1.1. Svinjsko meso <i>Longissimus dorsi</i> .....	66
3.1.2. Osmotska dehidracija svinjskog mesa u melasi šećerne repe i osnovni hemijski sastav melase šećerne repe.....	66
3.1.3. Rehidracija osmotski dehidratiranog svinjskog mesa.....	67
3.2. Metode termalne analize.....	68
3.2.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) .....	68
3.2.2. Termogravimetrijska analiza (TGA).....	70
3.2.3. Modulovana diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (MDSC) .....	72
3.2.4. Diferencijalna skenirajuća mikro kalorimetrija (mikro DSC) .....	73
3.2.5. Izotermalna titraciona mikro-kalorimetrija (ITC).....	75
3.2.6. Metoda određivanja aktivnosti vode ( $a_w$ ).....	77
3.2.7. Određivanje slobode vode.....	78
4. REZULTATI I DISKUSIJA .....	80
4.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i termogravimetrijska analiza (TGA) svežeg i osmotski dehidratiranog svinjskog mesa .....	80
4.1.1. Slobodna voda.....	84
4.1.2. Izotermalna DSC i TGA kalorimetrija osmotski sušenog svinjskog mesa.....	93
4.2. Ciklično zagrevanje i hlađenje osmotski sušenog svinjskog mesa DSC metodom .....	94
4.3. DSC i TGA analiza svežeg mlevenog i osmotski, u meslasi osušenog mlevenog svinjskog mesa .....	96
4.4. Staklasti prelaz osmotski dehidratiranog svinjskog mesa u melasi šećerne repe i svežeg svinjskog mesa .....	100
4.5. Praćenje termalne stabilnosti osmotski dehidratiranog svinjskog mesa u vremenu od 60 dana .....	108
4.6. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i termogravimetrijska analiza (TGA) rehidratiranog svinjskog mesa .....	112
4.6.1. DSC analiza rehidratiranog svinjskog mesa .....	112
4.6.1. TGA analiza rehidratiranog svinjskog mesa.....	120

4.6.3. Odr�edivanje Pelegov-ovih konstanti rehidracije pomoću rezultata dobijenih TGA analizom.....	124
4.7. Održavanje native strukture proteina mesa posle osmotske dehidracije i rehidracije.....	128
4.8. Kinetika denaturacije proteina svežeg i osmotski dehidratiranog svinjskog mesa praćena DSC metodom .....	132
4.9. Modulovana diferencijalna kalorimetrija (MDSC) osmotski dehidratiranog svinjskog mesa .....	139
4.10. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i modulovana diferencijalna kalorimetrija (MDSC) melase.....	142
4.11. Analiza sastava makroelemenata osmotski dehidratiranog svinjskog mesa melasom šećerne repe.....	146
4.12. Interakcija jona s albuminom goveđeg seruma metodom mikro senzitivna diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) .....	148
4.13. Interakcija jona sa albuminom goveđeg seruma metodom Izotermale titracione kalorimetrije (ITC).....	155
5. ZAKLJUČAK.....	158
6. LITERATURA .....	162

## 1. UVOD

Hrana predstavlja složenu smešu vode, ugljenih hidrata, proteina, lipida i drugih raznovrsnih komponenata. Metode termalne analize se dosta koriste u proučavanjima topljenja, kristalizacije lipida, koji se pojavljuju u složenim polimorfnim oblicima, a koji se odlikuju složenim pojavama rekristalizacije. Ugljeni hidrati i proteini u sistemima hrane se uglavnom mešaju s vodom i odlikuju se faznim prelazima prvog reda (topljenje, kristalizacija) i prelazima stanja (denaturacija, želiranje, staklasti prelaz). Sve nabrojane termalne karakteristike hrane su od velikog značaja za razumevanje odnosa između fizičko-hemijskih karakteristika i promena u kvalitetu hrane. Zbog toga metode termalne analize predstavljaju važne analitičke tehnike u fizičko-hemijskoj karakterizaciji hrane i njenih komponenata.

Termalna svojstva hrane su važna za razumevanje odnosa između karakteristika hrane i promene u kvalitetu hrane. U literaturi se nalazi veliki broj naučnih radova koji se bave termalnom analizom hrane. Kako bi se održao visoki kvalitet i s obzirom na očuvanje karakteristika funkcionalne hrane (biološke, hranljive vrednosti), kao i na fizičko-hemijska svojstva proizvoda, neophodna je odgovarajuća kontrola i karakterizacija termalnih osobina proizvoda.

Metode termalne analize se veoma mnogo koriste za proučavanje proteina u prehrambenim sistemima. Takođe, izučavanje termalnih svojstava proteina mesa je povećano tako da postoji dosta studija koje se bave termalnim osobinama proteina, a odnose se na sveže i dehidratirano, pa i osmotski sušeno meso. U ovim radovima zastupljene su različite tematike, ali se uglavnom bave stanjem proteina i vode u proizvodu. Tako je u mnogim studijama pokazano da denaturacija proteina izaziva strukturne promene mesa koje značajno utiču na fizičke osobine, kao što su kapacitet vezivanja vode, tekstura i boja. Nadalje, promene u stanju vode koja se nalazi u mišićima dešavaju se istovremeno kroz toplotno ili na drugi način izazvanu denaturaciju proteina, te se javljaju strukturne promene proteina.

Proces osmotske dehidracije predstavlja vrlo efikasan način delimičnog smanjenja sadržaja vode iz sirovine koji izaziva minimalno oštećenje kvaliteta krajnjeg proizvoda. Ovim procesom mogu da se dobiju proizvodi koji su nutritivno obogaćeni osmotskim rastvorom, u našem slučaju melasom šećerne repe, te se dobijeni proizvodi mogu smatrati funkcionalnom hranom. Na osnovu brojnih istraživanja, kao vrlo pogodan hipertonični rastvor može da se



koristi melasa šećerne repe, koncentrovani višekomponentni sistem koji predstavlja nusproizvod u industriji šećera. Sadrži preko 80% suve materije, oko 50% saharoze, 1% rafinoze, 0,25% invertnih šećera, oko 5% proteina, oko 1,5% purinskih i pirimidinskih baza, nešto organskih kiselina i pektina. Od mikronutrijenata sadrži vitamine B grupe i minerale. U značajnim količinama kalijum, natrijum i gvožđe. Značajno je što su sve mineralne materije u rastvorenom stanju zbog samog procesa osmotske dehidracije. Melasa ima svojstva humektanta i utiče na aktivnost vode gotovog proizvoda. Poznata je po svojim odličnim osobinama, jer sadrži velike koncentracije antioksidanata. Zbog stalnog potapanja proizvoda u osmotski rastvor tkivo nije izloženo kiseoniku i prema tome nije potrebno korišćenje sredstava za zaštitu od oksidativnih i enzimskih promena.

Istraživanja koje se odvijaju poslednjih godina na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu i u Institutu za opštu i fizičku hemiju u Beogradu, posebno su usmerena na proučavanje procesa osmotske dehidracije svinjskog mesa u melasi šećerne repe. Međutim, do sad nije bilo karakterizacije dobijenog osmotski dehidratiranog svinjskog mesa s obzirom na termalna svojstva novonastale proteinske osnove koja mogu ukazati na različite osobine koje su od velikog značaja za stabilnost i kvalitet. Podaci o termalnim svojstvima svežeg svinjskog mesa se nalaze u literaturi, kao i o termalnim svojstvima svinjskog mesa dehidratiranog različitim tehnološkim procesima, ali literaturnih podataka o termalnim osobinama osmotski dehidratiranog svinjskog mesa u melasi šećerne repe nema.

Interakcije komponenti melase s proteinskom osnovom mesa predstavljaju složene procese koji izazivaju promene strukture proteina mesa, te dovode do izgradnje novonastale proteinske osnove. Kao model sistem procesa interakcije protein/makroelemenat izučena je interakcija nekih makroelemenata, prisutnih u melasi, s proteinom albuminom goveđeg seruma (BSA) pomoću metoda termalne analize.

**Ciljevi** ovog rada su karakterizacija termalnih osobina novonastale proteinske osnove dobijene osmotskom dehidracijom svinjskog mesa *Longissimus dorsi* u melasi šećerne repe, kao i dobijanje podataka metodama termalne analize, koji se odnose na stanje vode i proteina u svežem mesu i osmotski dehidriranom mesu:

- definisanje novonastale strukture proteinske osnove osmotski dehidratiranog svinjskog mesa *Longissimus dorsi* s obzirom na stanje vode
- definisanje stepena denaturacije proteina mesa i efikasnosti rehidracije osmotski dehidratiranog svinjskog mesu *Longissimus dorsi*

-definisanje stepena denaturacije proteina mesa u osmotski dehidriranom svinjskom mesu *Longissimus dorsi*, proučavanjem kinetike denaturacije proteina osmotski dehidratiranog i svežeg svinjskog mesa

- određivanje sadržaja makroelementa u osmotski dehidriranom svinjskom mesu *Longissimus dorsi*

-prikazivanje složenosti interakcije nekih makroelemenata s proteinim mesa s obzirom na model sistem interakcije jona sa albuminom goveđeg seruma (BSA)

## 2. PREGLED LITERATURE

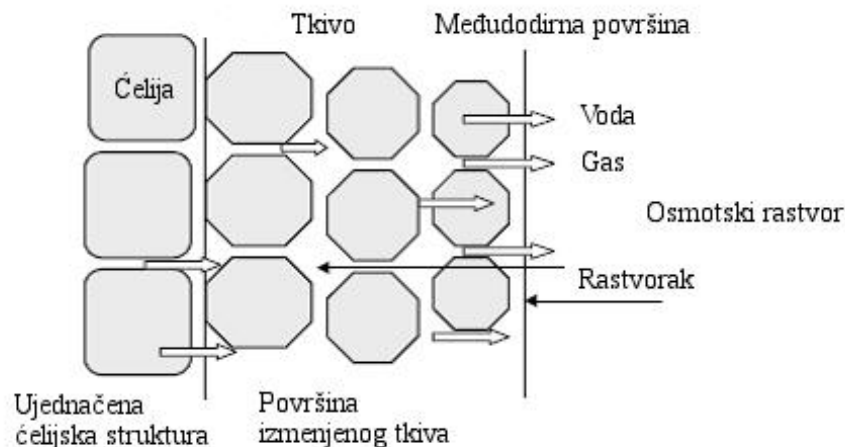
### 2. 1. Osmotska dehidracija

Od antičkih vremena dehidracija je jedana od uobičajenih, najzastupljenijih prirodnih i pouzdanih metoda za očuvanje hrane. Šećer, med i soli su se koristili kao pomagala u sušenju hrane (voća i povrća) u različitim vremenima u prošlost (*Tortoe, 2010*). Šećer se prvenstveno koristio kako bi se zadržao kvalitet osušenog proizvoda. Dodavan je u malim količinama obično radi očuvanja kvaliteta proizvoda, a ne kao sredstvo za uklanjanje vode. Osmotska dehidracija je proces uklanjanja vode putem uranjanja ćelijskog materijala u koncentrovani vodeni rastvor (*Tortoe, 2010*). Osnovna svrha dehidracije hrane je smanjenje sadržaja vode radi smanjenja brzina hemijskih reakcija, te olakšanje distribucije i skladištenja. Iako su reakcione brzine uglavnom smanjene kao posledica dehidracije, nepoželjne promene kao što su enzimsko tamnjenje mogu uticati na promenu kvaliteta prehrambenih proizvoda (*Kouassi i Roos, 2001 Tortoe, 2010*).

Proces osmotske dehidracije predstavlja vrlo efikasan način delimičnog smanjenja sadržaja vode iz sirovine koji izaziva minimalno oštećenje kvaliteta krajnjeg proizvoda. Ovim procesom mogu se dobiti proizvodi koji su nutritivno obogaćeni osmotskim rastvorom, te se dobijeni proizvodi mogu smatrati funkcionalnom hranom.

Pri procesu osmotske dehidracije, namirnice se uranjaju ili potapaju u slani rastvor ili šećerni rastvor. Ovo dovodi do tri vrste prenosa mase (*Tortoe, 2010*). Prva vrsta prenosa predstavlja prelaz vode iz tkiva u osmotski rastvor. Druga vrsta predstavlja, prelazak rastvora osmotske otopine u tkivo. Treći tip prenosa mase je izlazak ćelijskog sadržaja (šećeri, organske kiseline, minerali, vitamini) u osmotski rastvor. Treća vrsta prenosa mase je kvantitativno zanemarljiva u poređenju sa prve dve vrste prenosa masa, ali je od velikog značaja s obzirom na konačan sastav proizvoda. Njegov pokretač je razlika osmotskog pritiska rastvora na polupropusnoj ćelijskoj membrani. Niskomolekulske ćelijske komponente kao što su šećeri i organske kiseline difunduju u okolni rastvor višeg osmotskog pritiska. Ostale, ćelijske komponente u beznačajnoj meri prelaze izvan ćelijske membrane. Difuzija vode i jedinjenja male molekulske mase iz strukture tkiva tokom osmotske dehidracije praćena je kontra – difuzijom osmoaktivnih supstanci. Zbog toga, osmotsku dehidraciju, nasuprot konvencionalnom sušenju karakteriše složeno kretanje vode, ćelijskog sadržaja i osmotski aktivnih supstanci (Slika 1.). Ovo značajno utiče na sam proces i njegov konačni efekat s obzirom na postizanje značajnog očuvanja nutritivnih i organoleptičkih svojstva

(Tortoe, 2010) proizvoda. Proces uklanjanja vode i povećanje koncentracije osmotski aktivnih supstanci smanjuje aktivnost vode u ćeliji (Tortoe, 2010). Stoga, kroz proces oduzimanja vode moguća je i direktna formulacija proizvoda uvođenjem željene količine aktivnog agensa, konzervansa, ili bilo kojeg rastvora od nutritivne ili senzorne važnosti (Tortoe, 2010).



**Slika 1.** Šematski prikaz transfera mase pri osmotskoj dehidraciji ćelijskog materijala (Phisut, 2012)

Tkivo hrane se obično uranja u koncentrovani rastvor osmoaktivnih supstanci, kao što su saharoza, fruktoza, glukoza, glicerol, skrobni sirup i natrijum hlorid pri umerenim temperaturama čime se smanjuje termalno oštećenje teksture, promene boje i ukusa hrane (Tortoe, 2010). Tako obrađeno tkivo je stoga izloženo minimalnom toplotnom stresu. Dve osnovne karakteristike razlikuju osmotsku dehidraciju od konvencionalnog sušenja. Prvo, potapanje tkiva hrane u osmotski rastvor dovodi do efekta dehidracije. Drugo, osmotskom dehidracijom dobijaju se generalno manje stabilni proizvodi (npr. relativno kratak rok trajanja) pa se smatra da je osmotska dehidracija veoma pogodna kao pred - tretman za mnoge procese radi poboljšavanja hranljivih, senzornih i funkcionalnih svojstva hrane. Često se primenjuje kao pred – tretman za dalje procesne tehnike kao što su, sušenje vazduhom vakuum sušenje, sušenje zamrzavanjem (Tortoe, 2010), sušenje energijom sunca, pasterizacija ili zakiseljavanje i oblaganje jestivim površinskim filmovima (Tortoe, 2010). Veći deo početnog sadržaja vode iz tkiva može da se ukloni na ovaj način, kako bi se obezbedila stabilnost pri skladištenju.

Proces osmotske dehidracije se uglavnom primenjuje za voće i povrće (Collignan i Raoult-Wack 1994, Tortoe 2010. Phisut 2012., Mišljenović et al 2009., Mišljenovic et al 2011.,

*Mišljenovic et al 2012.*). Meso i riba (*Collignan i Raoult-Wack 1994, Collignan et al 2001., Djelveh, et all 2001, Pezo et al., 2014; Šuput et al., 2013, Ribeiro et al 2004*), supstance koje imaju sposobnost geliranja, kao što su šećer i proteini (*Tortoe, 2010.*) se na ovaj način mnogo više prerađuju u poslednjih 10-15 godina. Interesovanje za korišćenje nisko temperaturske osmotske dehidracije za obradu životinjskih proizvoda je u porastu (*Collignan i Raoult-Wack 1994*).

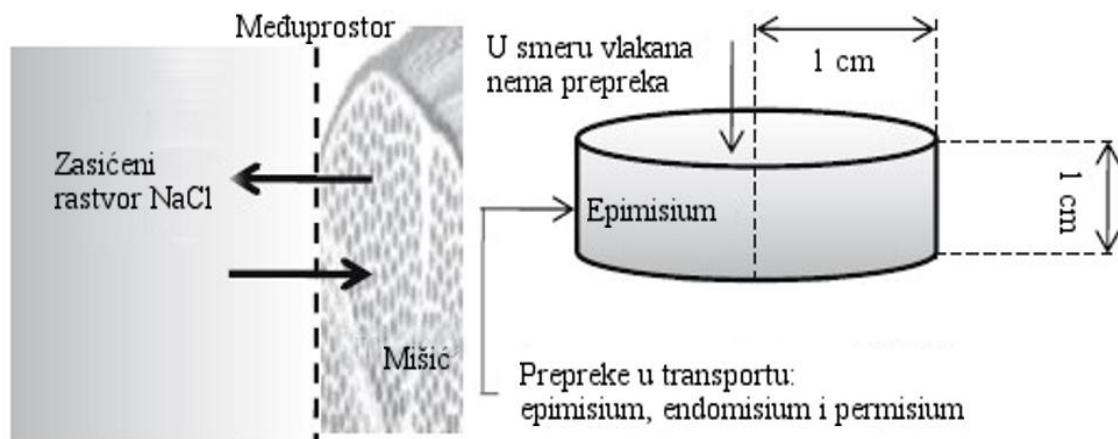
Tako je Collignan sa saradnicima u radu iz 1994. (*Collignan et al.1994.*) ispitivavao osmotsku dehidraciju ribe i (bakalara) potapanjem u smešu koncentrovanih rastvora saharoze i soli ili u rastvoru kukuruzniog skrobnog sirupa i soli pri niskim temperaturama. Praćena je kinetika gubitka vode, prirast šećera i soli kao i interakcije šećera i soli. Rezultati su pokazali da prisustvo šećera može poboljšati dehidraciju, i smanjiti prirast soli. Upotrebom visokomolekulskih šećera sprečava se prirast šećera i omogućava dobra dehidracija. Ovakav način osmotske dehidracije pokazao se kao dobra zamena tradicionalnom usoljavanju bakalara, zbog smanjenja trajanja procesa kao i zbog mogućnosti kontrole samog procesa dehidracije.

## **2.2. Osmotska dehidracija mesa**

Isti autor sa saradnicima (*Collignan et al. 2001*) je 2001. objavio opširnu studiju o osmotskom tretmanu ribe i mesa. U ovoj studiji detaljno su razmatrane prednosti novih pristupa u osmotskoj dehidraciji mesa i ribe u odnosu na tradicionalne. Meso se po tradicionalnim postupcima potapalo u koncentrovane rastvore soli (*salamurenje*). Komadi mesa ili ribe su tako uglavnom obrađeni u vodenim rastvorima, sa solju kao osnovnim rastvorkom (Slika 2). Ovakvi procesi povećavaju unos rastvorka u meso ograničavajući dehidraciju posebno kad je koncentracija rastvora soli ispod 250g/l. Posle ovog koraka vršeno je dodatno sušenje kako bi se stabilisao proizvod. Jedna od studija koja se bavi opisivanjem procesa salamurenja opisuje ovaj proces polazeći od stanovišta neravnotežne termodinamike. Radi opisivanja različitosti ponašanja koje se dešavaju tokom osmotske dehidracije u rastvoru soli Castro-Giráldez i saradnici (*Castro-Giráldez et all 2010*) razvili su neravnotežni termodinamički pristup za opisivanje ovog procesa. Pomoću ovakvog pristupa moguće je odrediti različite mehanizme i opisati proces. Određena su tri stepena koja se odvijaju u procesu dehidracije mesa u rastvoru soli: početna relaksacija tkiva, kontrakcija mišića i dostizanje mehaničke ravnoteže.

Izuzetak su postupci primenjivani u nordijskim zemljama gde su se fileti haringe tradicionalno salamurili u salamuri koja je sadržavala so i saharozu, kako bi se dobio slatkozasoljeni proizvod. Autori (*Collignan et al. 2001*) zaključuju da ima veoma malo objavljenih podataka o dehidraciji mesa u vodenim rastvorima koji sadrže so i šećer. Collignan i saradnici (*Collignan et al. 2001*) su opisali eksperimentalna izučavanja prenosa mase drugih autora, koja su sprovedena kombinovanjem kinetičke analize i metode površinskog odgovora (*surface respond*). Izučavanja stvarnog sistema hrane (riba, meso) pokazala su da se gubitak vlage od preko 40% može postići na niskim temperaturama (10°C). Ispitivana je i interakcija između dva rastvorka–soli i šećera. Prisustvo šećera u vodenoj fazi pojačava koncentracioni gradijent između hrane i rastvora te tako pospešuje oslobađanje vode. U poređenju s binarnim rastvorom voda–NaCl sa 26% (m/m) soli, ukupno zasićenje od 75% (m/m) može da se postigne kombinovanjem šećera i soli u istom rastvoru na temperaturi od 20°C. Ovakvi uslovi poboljšavaju mogućnost razmene i omogućuju da se za kratko vreme procesa dobije značajna dehidracija proizvoda. Dodatno, zbog šećera koji imaju veliku molekulsku masu, njihova difuzija kroz proizvod je sporija nego difuzija soli, te glavnina šećera zapravo ostaje na površini proizvoda. U vodenim trokomponentnim rastvorima koji sadrže so i šećer, dolazi do suprotnog uticaja na priraštaj rastvorka (*solute gain*). Unos soli je posebno ograničen zbog prisustva šećera. Ovaj uticaj sprečavanja šećera u odnosu na prodiranje soli je pokazan kod osmotske dehidracije voća i povrća, kao i pri dehidraciji mesa (*Collignan et al. 2001*). Ova pojava nastaje stvaranjem visoko koncentrovane šećerne obloge koja se obrazuje na proizvodu. Šećerna obloga značajno smanjuje koeficijent difuzije NaCl. Na primer u rastvorima KCl–voda koeficijent difuzije KCl se može smanjiti 11 puta dodatkom saharoze. Smanjenje koeficijenta difuzije soli je uglavnom izazvan visokim viskozitetom trokomponentnih rastvora. Nađeno je da je povećanje viskoziteta trokomponentnih rastvora (*Collignan et al. 2001, Deumier et all 2005*) posledica interakcije NaCl i saharoze. Pokazano je da postoji kritična koncentracija do koje šećer može stvarno da utiče na smanjenje unosa soli. Gubitak vode takođe ograničava nivo gornje koncentracije od 900g/kg, zbog ograničavajućeg spoljašnjeg prenosa. Kinetička analiza procesa pokazala je da upotreba šećera velike molekulsle mase (npr. glukozni sirup) kao hipertoničnog rastvora smanjuje unošenje šećera u proizvod do zanemarujućih koncentracija, ali bez uticaja na prirast soli (*salt gain*) i gubitak vode. Rezultati su pokazali da je brži unos šećera malih molekulskih masa (*Collignan et al. 2001*). Ovi rezultati su potvrđeni u proučavanjima proteinskih gelova kao što su karnagen i želatin eksperimentalnom metodom mešanja

pomoću rotacionih diskova koji stvaraju uslove bezgraničnog spoljašnjeg prenosa. Ovom metodom utvrđena je interakcija između dva rastvorka (šećera i soli) koja je uslovljavala površinsko koncentrovanje i građenje prevlake, obloge od šećera. U nekoliko studija je proučavana uloga unutrašnjih činilaca iz mesa na



**Slika 2.** Sematski prikaz interakcije soli i mesa (*Castro-Giráldez et al 2010*).

prenos mase. Nađeno je da ponašanje proteinskih gelova karnagena i želatina odgovara ponašanju životinjskog tkiva, te su poslužile kao dobar model sistem. Takođe je proučavana uloga različitih proteinskih osnova na prenos mase pri procesu osmotske dehidracije. Nađeno je da se meso i fileti ribe, koji su drugačije proteinske osnove, ponašaju potpuno isto, kvalitativno i kvantitavno, s obzirom na prenos mase pri osmotskoj dehidraciji. Najveći uticaj na prenos mase ima sadržaj masnoća u mesu, te predstavlja ključni činilac koji može da utiče na dinamiku prenosa. Pokazano je da lipidna faza ima indirektno delovanje na smanjenje zapremine vode koja se razmenjuje. U principu, teško je objasniti direktni uticaj lipidne faze na dehidraciju pošto uticaj lipidne faze na prenos mase nije linearan. Pokazano je postojanje ograničavajućeg tehnološkog i fizičkog činioca za primenu trokomponentnih rastvora (*ternary solutions*) vode šećera i soli te je racionalno da se koristi ova tehnika za dobijanje blago do umereno osušenih proizvoda sa 55-70% vlage.

Ovakvi tehnološki procesi ne mogu se koristiti za dobijanje proizvoda u jednom koraku pošto se unos soli izuzetno povećava pri produženom trajanju dehidracionog procesa (*Collignan et al. 2001*).

### 2.3. Osmotska dehidracija mesa u melasi šećerne repe

Za osmotsku dehidraciju mesa, kao hipertonični rastvori najčešće se koriste dvokomponentni (natrijum hlorid , saharoze ) ili trokomponentni (so - saharoza - glukoza ) vodeni rastvori (*Oladele et al 2008, Ribeiro i Tobinaga 2004, , Medina-Vivanco, 2004, Taivo et al 2003*).

Nedavna istraživanja (*Mišljenović et al 2011 i Mišljenović et al 2012*) pokazala su da je melasa šećerne repe više nego efikasno sredstvo za osmotsku dehidraciju voća , povrća i mesa. Visok sadržaj suve materije, specifični sastav hranljivih materija, niski troškovi i energetske potrebe su glavni razlozi zašto je melasa šećerne repe tako koristan osmotski rastvor (*Mišljenović et al 2010*). Sadrži preko 80% suve materije, oko 50% saharoze, 1% rafinoze, 0.5% invertnih šećera, oko 5% proteina, oko 1.5% purinskih i pirimidinskih baza, nešto organskih kiselina i pektina. Od mikronutrijenata sadrži vitamine B grupe i minerale. U značajnim količinama kalijum, natrijum i gvožđe. Značajno je što su sve mineralne materije u rastvorenom stanju zbog samog procesa osmotske dehidracije. Melasa ima svojstva humektanta i utiče na aktivnost vode gotovog proizvoda. Poznata je po svojim odličnim osobinama, jer sadrži velike koncentracije antioksidanata. Melasa je veoma složenog hemijskog sastava. Poznato je da u sastav melase ulazi preko 200 različitih jedinjenja (Tabela 1. i Tabela 2.) (*Olbrich 1963*). Sastav melase je promenljiv i prvenstveno zavisi od sastava šećerne repe, tehnoloških procesa obrade u procesu čišćenja i kristalizacije (*Filipović, 2013*). Najveće razlike u hemijskom sastavu se odnose na količine rafinoze, invertnog šećera i mineralnih materija (*Olbrich 1963*).



**Tabela 1:** Sastav melase šećerne repe (*Olbrich 1963, Filipović 2013.*)

Organske materije (%)		Minerali (%)	
Saharoza	51,0	K <sub>2</sub> O	4.3
Glukoza	-	Na <sub>2</sub> O	0.9
Fruktoza	-	CaO	0.26
Invertni šećer	0.5	MgO	0.14
Rafinoza	1.0	SiO <sub>2</sub>	0.1
Proteini	5.0	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.07
Glutaminska kiselina	4.0	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.02
Betain	6.0	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	3.5
Ostala N-jedinjenja		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.55
Organske kiseline	1.5	Cl <sup>-</sup>	1.6
Ostale organska jedinjenja	1.5	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.06
Ukupno	72.0	11.5	
Ukupno suve materije	83.5		

**Tabela 2:** Elementi u tragovima i vitamini prisutni u melasi šećerne repe (*Curtin, 1983*)

Elementi u tragovima (mg/kg)		Vitamini (mg/kg)	
Bakar	36	Biotin	0.36
Gvožđe	249	Holin	745.0
Mangan	35	Pantotenska kiselina	21.0
Cink	13	Riboflavin	1.8
Rafinoza	1.0	Tiamin	0.9

Upotreba melase u ljudskoj ishrani je ograničena zbog relativno visokog sadržaja K<sup>+</sup> jona. Preporučena dnevna količina je od 20 do 40g (*Mišljenović, 2012*).

## 2.4. Struktura svinjskog mesa

Skeletni mišići (mišićno tkivo) životinje čine meso, skeletni mišići čine procentualno najzastupljenije tkivo organizma životinje pa tako i najviše učestvuju u celokupoj masi tela životinje. Ovo tkivo je izgrađeno od ćelija (miocita) koje imaju sposobnost da pretvaraju hemijsku energiju u rad. Mišići su organizovani u dve osnovne grupe i to s obzirom na citološke karakteristike inervaciju i način kontrakcije mišići se dele na poprečnoprugasto (skeletno), glatko i srčano mišićno tkivo.

### 2.4.1. Proteini mesa, struktura i sastav mišića

Kod poprečno prugastih mišića uobičajeni elementi ćelije su potisnuti na sam rub ćelije. Sama ćelija ispunjena je miofibrilima koji se sastoje od debelih filamenata miozina i tankih filamenata aktina i tropomiozina. Tanki elementi učvršćeni su na strukturama koje su poznate kao Z-linije (*Karlson, 1993*).

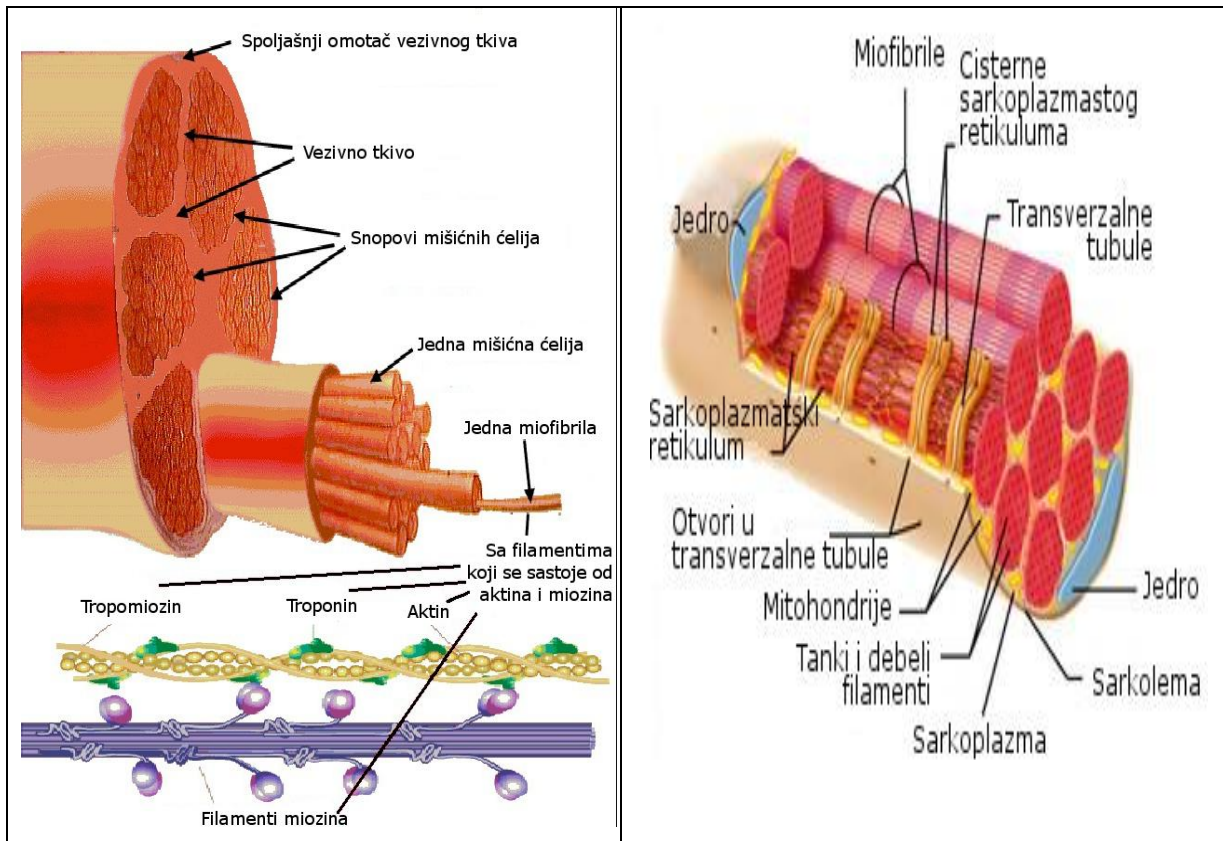
Mišići se sastoje od 75% vode, 20% proteina, 3% masti i 2% rastvornih ne-proteinskih supstancija. Nепroteinske supstancije čine metali i vitamini, kojih je oko 3%, azot neproteinskog porekla oko 45%, ugljeni hidrati oko 34% i oko 18% neorganskih komponenti. Proteini se dele u tri osnovne grupe miofibrilarni, sarkoplazmatski i proteini vezivnog tkiva. Miofibrilarni proteini čine oko 50-55% ukupnog proteinskog sadržaja mišića, dok su sarkoplazmatski proteini zastupljeni sa oko 30-40%. Ostatak od 10-15% proteina čine proteini vezivnog tkiva (*Tornberg, 2005*).

Miofibrilarni proteini se dele u tri podklase: miofilamentni fibrilarni proteini, miozin i aktin i oni izgrađuju miofibrilarnu strukturu; regulatorni proteini uključujući i kompleks tropomiozin-troponin, i  $\alpha$ - i  $\beta$ -aktin. M-protein i C-proteini koji su izgrađivački proteini: titin, nebulin, desmin, vimentin i sinemin učvršćuju i grade konstrukciju miofibrile. Titin je protein s velikom molekulskom masom (oko 1 milion Da).

Sarkoplazmatski proteini su rastvorni proteini sarkoplazme. U tu grupu spadaju glikolitički enzimi, kao što je **kreatin kinaza** i **mioglobin** koji je poseban nosilac kiseonika (koji kao hemoglobin reverzibilno veže molekule kiseonika ali s većim afinitetom). Poznato je oko 100 različitih proteina koji su prisutni u sarkoplazmi i oni su globularni proteini relativno malih molekulskih masa (od 17000 do 92000 Da).

Strukturu vezivnog tkiva čini spoljašnji omotač **epimisium** koji obavija celi mišić. Ova ovojnica vezuje pojedinačna mišićna vlakna, a takođe i grupe mišića. Mišićno vlakno –fibrila

čini ćeliju mišića. Ona može da bude u prečniku od 10 do 100  $\mu\text{m}$ , te ima dužinu od do 30cm. Ova ćelija ima svoju membranu, koja se naziva **sarkolema**. Mišićna ćelija, fibrila, je obavijena drugim tipom vezivnog tkiva koje se naziva **endomisium**. Fibrile se povezuju u snopove koje opet obavija treća vrsta vezivnog tkiva –**perimisium** (Tornberg, 2005). Na Slici 3. prikazana je struktura mišića.



**Slika 3.** Struktura mišića. a) ceo mišić b) snop miofibrila sa ćelijskim organelama  
(<http://www.bioanim.com/celltissuehumanbody6/O3muscle/misicFun1lgws.html>)

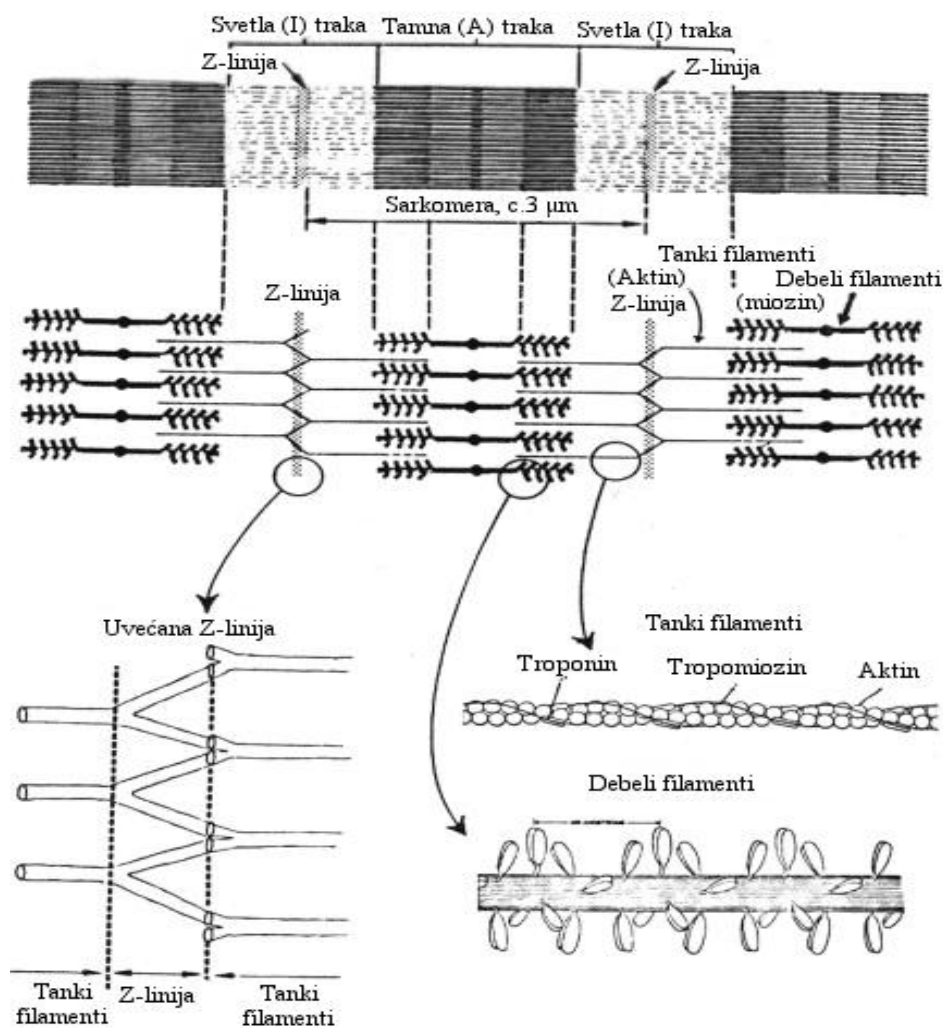
Proteini vezivnog tkiva kolagen, retikulin i elastin su fibrilarni proteini. Kolagen je najzastupljeniji protein u telu i glavna komponenta ekstracelularne mreže vezivnog tkiva. Njegovu tercijarnu strukturu čine tri isprepletene  $\alpha$ -zavojnice (trostruka zavojnica-*triple helix*) koje sadrže ponavljajuću peptidnu sekvence lizin-prolin-hidroksiprolin, koja je jako stabilizovana međusobnim vodoničnim vezama (Brodsky i Persikov 2005). Istraživanja su pokazala da se povećava broj proteina sa nađenim strukturnim odlikama koje liče kolagenu. Porodica kolagena i proteina sa “kolagenim domenom”- karakterističnom trostrukom zavojnicom kolagena, ukazuje da bi ovakve strukture mogle biti osnovni motiv prilagodljiv za niz proteina i funkcija. Njegova štapićasta domena ima potencijal za različite načine

samo- udruživanja, sposobnost da veže receptore, druge proteine, glikozaminglukane i nukleinske kiseline (*Matteini et al 2012*). Mutacije u domenu trostruke zavojnice kolagena mogu dovesti do različitih poremećaja. Najčešća mutacija je zaamena baza koja dovodi do zamene jednog glicinskog ostatka , prekidanjem niza ponavljanja ponavlja *Gly-X-Y*. Jedna zamena glicinskog ostatka destabilizuje trostruku zavojnicu zbog prekida vodonične veze i stvara diskontinuitet structure (*Brodsky i Persikov 2005*)

Fibrilarni kolagen, kolagen koji formira fibrile, čini strukturni i organizacioni okvir kože, dermisa, krvnih sudovia, kosti, tetiva, rožnjače i drugih tkiva. Molekuli u ovom tipu kolagena se pakuju u niz raspoređen po četvrtinama (*quarter-staggered array*) i unakrsno povezan kovalentnim vezama. Na taj način se formiraju fibrile veličine od nekoliko do 100 nm (*Matteni et al 2012*). Za neka tkiva je karakteristično postojanje dva ili čak tri nivoa hijerarhijske organizacije pri narastajućoj dužini koja prevazilazi dužinu fibrila, kao što su vlakna kod tetiva, lamele rožnjče.

Kolagen je glikoprotein koji je, kao što je već rečeno, glavni strukturni element vezivnog tkiva (oko 55%). Kolagen se sastoji od monomera tropokolagena, molekulske mase od 300 000 Da. Molekuli tropokolagena su organizovani u agregat koji se ili produžuje u fibrile u epimisiumu i perimisiumu ili čine strukturnu osnovu **endomisiuma**. Kolagen je prisutan u nekoliko genetskih oblika: od I do V. Imunofluorescencijom je pokazano da je kolagen tipa I prisutan u epimisiumu, tipovi I i II su nađeni u perimisiumu, a tipovi III, IV i V su prisutni u endomisiumu (*Tornberg, 2005*).

Mišićne fibrile izgrađuju 75-92% ukupnog volumena mišića, grade nitaste sturukture – miofibrile, pri čemu formiraju najmanju kontraktilnu jedinicu-sarkomeru (Slika 3.).



**Slika 4.** Struktura sarkomere, tanki i debeli filamenti (Tornberg, 2005).

Prečnik miofibrile je oko  $1\mu\text{m}$ , a dužina sarkomere je oko  $2.2\mu\text{m}$  kod mišića u mirovanju. Kao što je prikazano na Slici 4. sarkomera je izgrađena od dva gradivna bloka koji se sastoje od debelih filamenata koji se produžavaju preko A-trake i tankih filamenata koji se protežu od Z-linije preko A-trake do H-zone. Debeli filament su izgrađeni od miozina. Oko 200-400 molekula miozina je u sklopu pojedinog debelog filameta koji je pojedinačno dužine od  $1.5\mu\text{m}$  i prečnik od  $130\text{Å}$ . Digestijom tripsinom miozinski filament se cepaju na „glavu“ meromizoin (HMM) i „rep“ koji se naziva laki meromizoin (LMM). Laki meromizoin (LMM) ima strukturu dvostruke i trostruke  $\alpha$ -zavojnice, dok se oblast glave (HMM) sastoji od globularne jedinice sa 4%  $\alpha$ -zavojnice.

Drugi po značaju miofibrilarni protein je aktin. Fibrozni aktin (F-aktin) je nastao longitudinalnom polimerizacijom globularnog aktina (G-forma aktina,  $M_w = 47\,000\text{Da}$ ). U rastvorima male jonske jačine aktin je u monomernom globularnom obliku. Pri povećanju

jonske jačine dolazi do polimerizacije monomera u fibrilarnu strukturu dvostruko uvijene zavojnice.

#### **2.4.2. Ponašanje proteina mesa pri zagrevanju**

Konformacione promene proteina koje se dešavaju pri zagrevanju se uobičajeno nazivaju denaturacijom proteina. Temperature na kojima se ove promene dešavaju se nazivaju temperature denaturacije proteina. Denaturacija proteina je u velikoj meri izučavana diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) (*Brandts 1964, Privalov 1980, Voutila 2007, Wright 1984, Findlay 1984, Tocci 1998, Aktas 2001, Bellof 2006, Dziomdziora 2006, Liu 1996, Pan 2011, Schubring 2004, Schubring 2007 Bertram 2006, Graiver 2006, Pospiech 2002, Kazemi 2011, Paredi et al 2003*). Razmotavanje (*unfolding*) proteina, koji predstavlja gubitak njegove tercijarne i sekundarne strukture može takođe da se prati i drugim metodama kao što su optička rotaciona disperzija (ORD) cirkularni dihroizam (CD), merenje površinske hidrofobnosti upotrebom fluorescentnih proba (ANS). Sledeći korak koji se dešava tokom i posle denaturacije proteina su protein-protein interakcije koje dovode do agregacije proteina i konačno do gubitka rastvorljivosti. Ovi procesi mogu da se prate turbidometrijskim merenjima. Nastajanje gelova koji mogu zatim da se grade, njihov tip i vrsta oformljene mikrostrukture može da se ispituje mehaničkim i mikrostrukturnim metodama.

##### **2.4.2.1. Proteini sarkoplazme**

Po saznanjima koje je izneo Hamm još 1977. nađeno je da se najveći broj proteina sarkoplazme (oni mišićni proteini rastvorni u vodi pri niskim jonskim jačinama) agregiraju na temperaturama između 40 i 60 °C. Drugi istraživači su osamdesetih godina prošlog veka, našli da se agregacija sarkoplazmatskih proteina može produžiti i do 90°C. Ova grupa istraživača je prva pretpostavila da sarkoplazmatski proteini mogu da grade gel između strukturnih elemenata mesa i da ih na taj način povezuju (*Tornberg 2005*). Istraživanja mekoće mesa (*meat tenderness*) pri termalnoj obradi na različitim temperaturama Tornberga i saradnika (*Tornberg 2005*) potvrdila su ova zapažanja.

Jedna od interesantnih osobina sarkoplazmatskih proteina je i pojava omekšavanja koju mogu da proizvedu enzimi i to na niskim temperaturama u dužem vremenskom periodu, pri brzini grejanja 0.1°C/min. Pokazano je (*Laakkonen et al 1970*) da kolagenaza zadržava

aktivnost pri grejanju, kuvanju, mesa na temperaturama manjim od 60°C, dok pri većoj brzini grejanja i na višoj temperaturi (70-80°C) kuvanja dolazi do inaktivacije enzima. Takođe je pokazano da je najmanje 6 sati grejanja potrebno da bi se postiglo značajno sniženje sile smicanja tj. efekat omekšavanja. U isto vreme došlo je do gubitka vode od 15 do 30% (m/m).

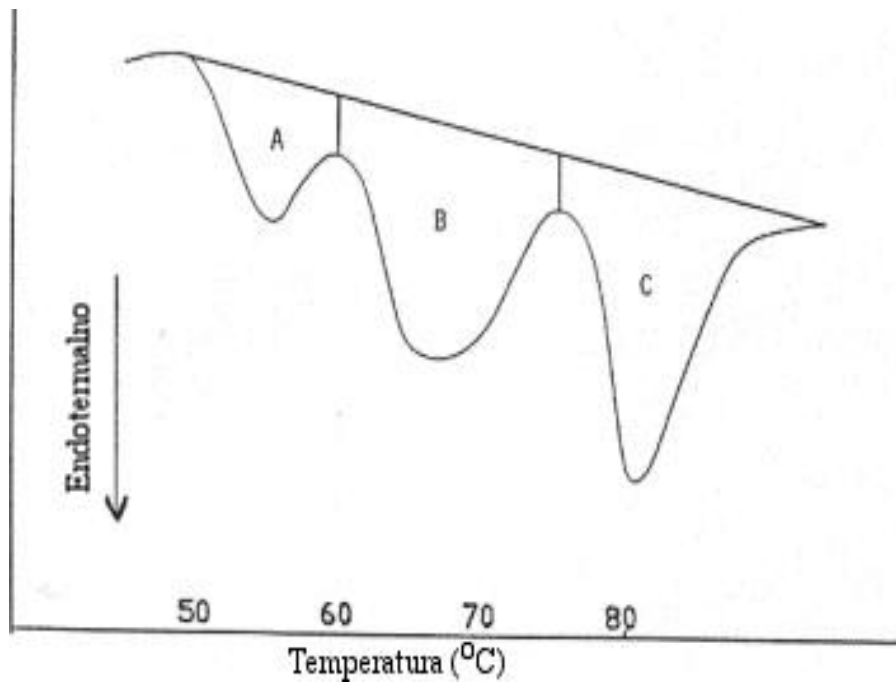
#### **2.4.2.2. Miofibrilarni proteini**

Promene sekundarne, tercijarne i kvaternarne strukture pri zagrevanju

S obzirom na promene sekundarne strukture miozina pri grejanju Morita i Zasuri (*Morita et al 1991*) su pratili promene u zastupljenosti  $\alpha$ -zavojnice i promene površinske hidrofobnosti, lakog meromiozina, LMM (*light meromyosin*) pri pH 6 i 0.6M KCl metodom cirkularnog dihroizma (CD). Sadržaj uzvojnice je počeo opadati na temperaturi od 30°C i dostigao je svoj minimum na temperaturi od 70°C. Grejanjem do 65°C se progresivno povećava površinska hidrofobnost, dok se na višim temperaturama površinska hidrofobnost smanjuje. Smanjenje hidrofobnosti primećeno na višim temperaturama upućuje na zaključak da deo hidrofobnih ostataka učestvuje u protein-protein interakcijama, koje dovode do stvaranja mreže pri građenju agregata, tj. gelova (*Boyer et al 1996, Yongsawatdigula et al 2003*).

Prednost diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) je u tome što mogu da se analiziraju složene mešavine proteina velikih koncentracija, što je slučaj kod mesa. Na tipičnoj DSC krivoj mišićnog tkiva mogu da se uoče tri osnovna endotermna termalna prelaza (Slika 5).

Prvi prelaz sa temperaturnim maksimumom između 54-58°C predstavlja termalnu denaturaciju miozina (*Kawakami et al 1971, Martens & Vold, 1976; Wright 1984, Kono 1992, Markov et al 2010, Liu 2014*). Drugi prelaz koji ima temperaturni maksimum između 65 i 67°C odgovara termalnoj denaturaciji kolagena (*Martens & Vold, 1976; Stabursvik & Stabursvik i Martens 1980, Bozec 2011*) i sarkoplazmatskih proteina (*Stabursvik 1980, Xiong 1987*). Treći prelaz je termalna denaturacija aktina koji se nalazi između temperatura of 80°C i 83°C (*Tornberg 2005*). Za drugi prelaz je pokazano da oba izolovana proteina aktomiozin i miozin i njihove podjedinice imaju termalnu denaturaciju u istom temperaturnom području (*Tornberg 2005*).



**Slika 5.** Tipična DSC kriva mišića koju sačinjavaju tri endotermna termalna prelaza koji odgovaraju denaturaciji: A) miozina; B) sarkoplazmatskih proteina i kolagena; C) aktina (Tornberg 2005).

Sikes i saradnici (Sikes *et al.* 2010) su proučavali denaturaciju proteina mesa pomoću metode DSC. Uspoređivali su dobijene DSC krive sirovog netretiranog goveđeg mesa sa DSC termogramima dobijenim za meso podvrgnuto grejanju na 60°C i meso podvrgnuto delovanju pritisk i temperature (60°C). Našli su da dolazi do nestanka endotermnih pikova na 75°C i 51°C koji odgovaraju denaturaciji aktina i miozina, dok endotermni pik sa maksimumom pika na temperaturi od 61°C, koji odgovara denaturaciji kolagena, ostaje nepromenjen kod uzoraka koji su bili tretirani i pritiskom i temperaturom (60°C). Tretiranje mesa na temperaturi od 60°C dovodi do denaturacije miozina ( $T_m = 51^\circ\text{C}$ ) i delimične denaturacije kolagena ( $T_m = 61^\circ\text{C}$ ), dok aktin ostaje nendenaturisan (prisustvo pika na 75°C). Očigledno da dolazi do učvršćivanja i ojačavanja molekula kolagena pri tretmanu pritiskom, a pošto su molekule tropokolagena u konektivnom tkivu međusobno povezane vodoničnim mostovima može se reći da pritisak deluje stabilizirajuće na ove veze (Sikes *et al.* 2010, Tonberg *et al.* 2013). Drugo interesantno zapažanje dobiveno iz DSC rezultata je da delovanjem pritiska dolazi do destabilizacije aktina, dok se to ne dešava samim termalnim tretmanom na 60°C. Slične rezultate je dobio i Macfarlane (1985), koji je zaključio da delovanjem pritiska od 150 MPa i temperature od 60 °C u trajnju od 30 min na *post rigor* meso, dolazi do disagregacije F aktina



u G aktin, kako je zabeleženo elektronskom mikroskopijom (*Tonberg et al 2013*). Upotrebom povišenog pritiska dolazi i do smanjenja aktivnosti enzima mesa, naročito kaplaina, dok katepsini, proteaze smeštene u lizozomu, zbog svoje lokacije zadržavaju aktivnost pri delovanju pritiska od 250MPa, u vremenu od 10min i pri sobnoj temperaturi. Istraživanja su pokazala da pri pritisku preko 200MPa dolazi do pucanja lizozoma, međutim pokazalo se da su oslobođene katepsin proteaze otporne na pritisak, i da gube aktivnost pri pritiscima preko 200MPa (*Tonberg et al 2013*). Sikes i saradnici (*Sikes et al. 2010*) su proučavali degradaciju miofibrilarnih proteina mereći dužinu fibrilarnih segmenata mišića nakon tretmana pritiskom i temperaturom. Koristili su mikroskopske metode. Pokazali su da su fragmenti fibrila mesa podvrgnutog pritisku i temperaturi šest puta kraće u poređenju sa fibrilama koje su samo temperaturski tretirane i tri puta kraće od fibrila sirovog netretiranog goveđeg mesa. Pretpostavlja se da je ovaj efekat skraćivanja dužine fibrilarnih fragmenata posledica aktiviranja sistema katepsin proteaza (*Tonberg et al 2013*).

Tretiranje mesa povišenim pritiskom dovodi do promena u strukturi mesa koje se očituju promenama u zadržavanju vode u mesu i zadržavanju masti u mesu. Ove promene su posledica geliranja do koga dolazi pri ovakvom tretmanu. Jedna od značajnih primena tretiranja mesa povišenim pritiskom je upravo za izazivnije geliranja tj. povećanje miofibrilarnog kapaciteta geliranja (*myofibrillar gelling capacity*) čime se smanjuje potreba za dodavanjem velike količine soli, te se dobija zdraviji prizvod. Takođe, prednost istovremenog tretmana povišenim pritiskom i temperaturskog tretmana na 60°C je efekat omekšavanja (*Sikes et al. 2010*). Jedina neželjena pojava ovog tretmana je gubitak boje mesa, te se pri tretmanu preko 150MPa dolazi do promene boje mesa, a pri tretmanu pritiskom preko 400MPa delomično se denurišu globinski delovi, te oslobođeno gvožđe može dovesti do ubrzavanja procesa oksidacije lipida (*Tonberg et al 2013*).

Proučavanja termalne denaturacije titina svinjskog i goveđeg mesa DSC analizom nađeno je da denaturacija ovih proteina predstavlja jedinstven endotermni pik sa temperaturskim maksimumom prelaza na temperaturi od 78,4°C za goveđe meso i 75,6 °C za ove proteine iz svinjskog mesa (*Ding, 2014*).

Proučavanja u solima rastvornih (*salt soluble proteins*) SSP, miofibrilarnih proteina pokazala su da do protein-protein interakcija i geliranja dolazi u temperaturskom opsegu od 36-40°C, bez obzira na anatomske razlike porekla mišića (*Tornberg 2005*). Ova istraživanja su višena merenjem turbiditeta i merenjem rigidnosti (*Boyer 1996, Sun i Holley 2011*). Markov i

saradnici (*Markov et al 2010*) su upotrebom DSC metode i metode dinamičkog rasipanja svetlosti (DLS) analizirali agregaciju dve S1 izoforme miozina i pokazali da brzina procesa agregacije ne zavisi od koncentracije proteina, te da je stepen agregacije ograničen ireverzibilnom denaturacijom proteinskog domena. *Sun i Holley* su dali detaljni prikaz činilaca koji utiču na toplotom izazvano formiranje gela miofibrilarnih proteina mesa koji su dati u Tabeli 3. (*Sun i Holley 2011*).

**Tabela 3.** Činioci koji utiču na toplotom izazvano formiranje gela miofibrilarnih proteina mesa (*Sun i Holley 2011*).

Činioci	Pojave koje izazivaju činioci
Miozin Actin	Miozin može stvarati odlične gelove. F-actin ne stvara gelove, zgrušava se pri grejanju. Kombinacija male količine F-aktina s miozinom može poboljšati elastičnost gela ali aktin smanjuje elastičnost gela pri koncentracijama većim od 6.1%).
Tip mišića	Beli mišići generalno stvaraju jače gelove nego crveni mišići. Poprečno prugasto mišićno tkivo gradi čvršće, krute gelove no glatko mišićno tkivo.
Poreklo mišića	Sposobnost geliranja mišićnog tkiva različitih životinjskih vrsta je složen proces na koji značajno utiču uslovi sredine. Poznato je da pileće meso gradi jače gelove nego goveđe meso. Piletina i svinjetina imaju gotvo istu sposobnost jačine geliranja. PSE ( <i>pale, soft, exudative</i> ) bleđa, mekana svinjetina gradi slabije gelove.
Koncentracija proteina	Minimalna koncentracija geliranja, ili kritična koncentracija proteina je potrebna da bi se napravio gel. Miofibrilarni proteini minimalne koncentracije 0.5% imaju sposobnost stvaranja gelova
pH	Sposobnost geliranja miofibrilarnih proteina strogo zavisi od pH sredine. Pri izoelektričnoj tački (pI) miofibrilarni proteini (pH 5.3) gotovo da i ne stvaraju gelove, a optimalan je pH 6. Pri nižem pH i bez grejanja miofibrilarni proteini geliraju, pri velikim koncentracijama NaCl (2% do 3%) koje su potrebne za rastvaranje miofibrilarnih proteina i izgradnju gela.
Jonska jačina	Na mikrostrukturu miofibrilarnog gela utiče jonska jačina. Pri niskoj jonskoj jačini (0.25 M KCl) nastaju gelovi sa finom mrežom, dok pri velikoj jonskoj jačini (0.6 M KCl) nastaje gruba mreža gela sa prisutnim agregatima.
Brzina zagrevanja	Pri malim brzinama zagrevanja favorizuju se protein-protein interakcije, te dolazi do stvaranja bolje trodimenzionalno uređenog gela.
Temperatura	Optimalni uslovi geliranja miozina su 60-70°C pri pH 6.
Pritisak	Veliki hidrostatički pritisak depolimerizuje aktomiozin i aktin i utiče na geliranje. Optimalan pritisak za geliranje miofibrilarnih proteina iznosi oko 200 Mpa, što doprinosi elastičnosti gelova.
Sadržaj masti	Sadržaj masti utiče na proces geliranja, te dolazi do nekontrolisanih promena u čvrstoći gela, koje zavise od uslova procesa koji se primenjuje.
Želatin	Želatin je protein s najboljom sposobnošću geliranja, ali njegovo prisustvo ometa geliranje miofibrilarnih proteina.
Činioci	Pojave koje izazivaju činioci
Transglutaminaze	Transglutaminaze imaju sposobnost značajnog povećavanja jačine miofibrilarnog gela.

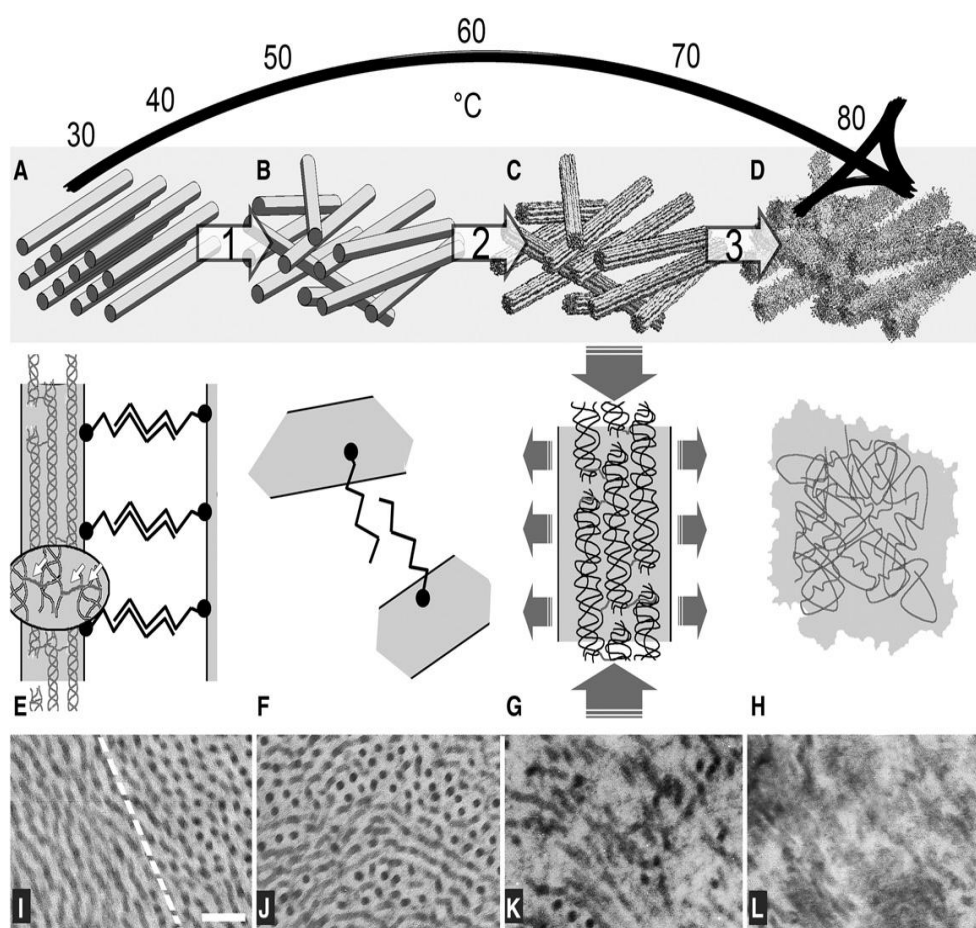
Proteinski dodaci (aditivi): (belance, proteini surutke, sojini proteini, globini krvi, plazma, hidrolozat glutena)	Belance, proteini surutke, sojini proteini i natrijum kazeinat povećavaju jačinu gelova miofibrilarnih proteina. Krvna plazma i globini krvi mogu povećati ali i smanjiti jačinu miofibrilarnog gela u zavisnosti od porekla miofibrilarnih proteina. Hidrolizat glutena utiče na geliranje miofibrilarnih proteina.
Neproteinski dodaci (glukono- $\delta$ -lacton (GdL), polifosfati i polisaharidi)	Zbog svoje kiselosti, glukono- $\delta$ -lacton (GdL) može izazvati geliranje miofibrilarnih proteina bez grejanja. Polifosfati mogu povećavati, smanjivati ili čak ne uticati na jačinu gela, što je u vezi s poreklom miofibrilarnih proteina, načinom i uslovima procesa geliranja. Polisaharidi mogu pojačati ili oslabiti jačinu gela zavosno od vrste polisaharida, porekla miofibrilarnih proteina i uslova pripreme.

Denaturacija miofibrilnih proteina u rastvorima u najvećem broju slučajeva dovodi do građenja gela. Miozin je jedinstven po svojstvu građenja gela pri veoma malim koncentracijama proteina (0.55% m/m) (*Hermansson i Langton 1988, Tornberg 2005*). Na primer, proteini sarkoplazme moraju da budu koncentracije oko 3% kako bi mogli da izgrade gel. Pri zagrevanju pročišćenog miozina čvrstoća gela dostiže svoj maksimum na 45°C pri pH 5.5 ili na 60° C pri pH 6. Ako je aktin prisutan u rastvoru sa miozinom dolazi do stvaranja još čvršćeg gela (*Tornberg 2005, Sun i Holley 2011*). Jonska jačina (NaCl) i pH su veoma bitni pošto ovi uslovi određuju da li će miozin biti u monomernom stanju ili će biti u formi filamenata. Pri jonskim jačinama manjim od 0.3% i pri neutralnom pH molekuli miozina su dispergovani kao monomeri i prave grubu mrežu s velikim porama. Pri malim jonskim jačinama molekuli miozina se organizuju u vlakna (filamente) koja liče na prirodna mišićna vlakna. Grejanjem se grade još čvršći gelovi što su vlakna veće dužine. Ovako nastale gelove karakteriše fina i ujednačena mreža (*Tornberg 2005, Sun i Holley 2011*). Nastajanje miozinskih gelova se odvija u dva odvojena koraka i to u dve temperaturske oblasti. Prvi deo reakcije se odvija na temperaturi između 30 i 50°C. Drugi deo reakcije se odvija na temperaturi iznad 50°C. U prvom delu dolazi do agregacije globularnih glava proteina. Posle zagrevanja iznad 40°C pokazano je da nativna struktura proteina ne postoji, te je utvrđeno prisustvo samo monomera glave proteina iz urušene strukture miozina. Daljim zagrevanjem do 50°C nastavlja se agregacija, a grejanjem do 60°C dolazi do nastajanja velikih globularnih agregata. U ovom temperaturskom rasponu nisu nađeni repovi proteinske strukture. Nadalje dolazi do strukturnih promena u sekundarnoj strukturi proteina tj. do promena  $\alpha$ -zavojnice, te do stvaranja mreže u kojoj hidrofobne grupe međusobno intereaguju (*Morita i Yasui 1991, Tornberg 2005*).

### 2.4.2.3. Proteini vezivnog tkiva

DSC merenja su pokazala da se denaturacija kolagena odvija u temperaturnom opsegu od 53°C do 63°C, pri čemu dolazi prvo do raskidanja vodoničnih mostova, gubitka fibrilarne strukture, te do kontrakcije, skupljanja molekula kolagena. Grejanjem od 60°C do 70°C kolgenske fibrile se mogu skupti i do 1/4 njihove dužine. U slučaju da kolagenski molekuli nisu stabilisani međumolekulskim tempereturski stabilnim vezama, daljim grejanjem dolazi do njihovog disosovanja i građenja želatina.

Da li će doći do stabilisanja kolagena intermolekulskim vezama zavisi od starosti životinje čije se meso analizira. Kod mesa mlađih životinja nema ovog stabilišućeg uticaja, dok kod mesa starijih životinja ova međumolekulska stabilizacija, stabilni *cross-link* postoji. Predloženi trostepeni model denaturacije kolagena prikazan je na Slici 6. (Mu 1991, Matteini et al 2012, Nistora et al 2014, Zhang 2014).



Slika 6. Predloženi trostepeni model denaturacije kolagena (Matteini et al 2012).

## 2.5. Zadržavanje vode u tkivu mesa

Voda je najvažnija kao sastavni deo ili dodatni sastojak skoro svih namirnica. Interesovanje nauke o mesu je oduvek bilo najviše usmereno na praktične primene i makroskopske efekte spoljašnjih i unutrašnjih činilaca u odnosu na zadržavanje vode. Istraživanja su motivisana tehnološkim i senzornim aspektima, a oba aspekta su na kraju povezana sa ekonomskom koristi.

Sistem miofibrilarnih proteina je razvijen tako da obavlja veoma brzo i specifično ponavljanje pokreta. Voda u mišićnom vlaknu služi kao mazivo, ali i kao medijum za transport metabolita u vlakno. Sadržaj vode bi trebalo da bude približno konstantan, za dobro organizovane i brze funkcije, ali s druge strane, voda mora da bude u stanju da se kreće na druga mesta u sarkomeri tokom kontrakcije, u deliću milisekunde. Hidrofilne i hidrofobne oblasti u proteinima moraju da budu dobro organizovane, tako da omogućavaju brzo premeštanje, a takođe i strukturni elementi treba da obezbede optimalne udaljenosti između vlakana na svakom nivou kontrakcije. Dakle, ne treba očekivati da sistem miofibrilarnih proteina prati samo jedan jednostavni model zadržavanja vode (*Puolanne i Halonen 2010*).

### 2.5. 1. Hipoteze o zadržavanju vode u mesu

Dok se teorijski pristup u oblasti hemije i biologije koncentriše na površinske pojave između proteina i prvi od tri sloja vode, naučnici koji izučavaju meso su više zainteresovani za zadržavanje slobodne vode u filamentoznoj rešetki, celom mišiću i gelovima. Shodno tome, ova dva pristupa se posmatraju odvojeno, te će dalje biti prikazana sveobuhvatna teorija koja pokriva celokupnu pojavu zadržavanja vode u mesu. Sledeće hipoteze predstavljene u okviru nauka o mesu poznate su već decenijama.

#### 2.5. 1. 1. Elektrostatičke sile

Godine 1972., *Hamm* je objavio svoju obimnu knjigu *Kolloidchemie des Fleisches*, o zadržavanju vode, sumirajući svoja istraživanja i istraživanja svojih saradnika, prikazujući literaturu objavljenu u tom polju do avgusta 1970. *Hamm* je zaključio da je zadržavanje vode posledica elektrostatičkog odbijanja između miofibrilarnih proteina (miofilamenata), što dovodi do oticanja miofibrila, ili u nekim slučajevima (npr. soljenjem ili na veoma visokim ili niskim pH vrednostima), čak i delimična rastvorljivost filamenata, nastaje zbog odbijanja između pojedinačnih molekula. Različiti unakrsni mostovi (Z-linije, aktomiozin unakrsni

mostovi i srednja vlakna) između miofilamenata, sprečavaju neograničeno oticanje miofibrila. Strana lanca aminokiseline s polarnim grupama (oko 76-80%) vezuje molekule vode na svojim površinama putem *van der Waalsov*-ih sila. Budući da su molekuli vode polarni, orijentišu se tako da će se u odnosu na negativnu jonsku grupu, pozitivni deo (atom vodonika) orijentisati prema jonskoj grupi, a negativni deo (kiseonik) će se usmeriti prema rastvoru, i obrnuto u odnosu na pozitivnu grupu. Dodatni slojevi molekula vode će nagraditi tzv. monomolekuskim slojem slične orijentacije. *Hamm* 1972. također govori o *Donnan*-ovoj ravnoteži i osmotskom efektu u mišićima i gelovima, ali zaključuje da je to važno samo u živim mišićima jer je tada elektrostatički efekat preovlađujući u mesu. Dakle, *Hamm* (1972) tvrdi da su svi molekuli vode manje ili više pod uticajem sila privlačenja izazvanih polarnim grupama proteina u trodimenzionalnoj mreži. Za razliku od polarne strane lanaca, nepolarna strana lanca aminokiselina potiskuje polarne molekule vode izazivajući zaobljenu strukturu oko nepolarnih grupa. Kombinovani efekat je da su molekuli grupe povučeni (polarne grupe) ili gurnuti (ne-polarne grupe) između niti stvarajući tenziju koja primorava molekule vode da usvoje oblik leda u proteinskoj mreži filamenata i poprečnih elemenata. Ova ideja, potiče od *Ling*-a (1965), kao jedno od najranijih razmišljanja o kosmotropičkom efektu (videti odeljak 6). Glavni činioci koji zaustavljaju neograničeno oticanje miofibrila su aktomiozin unakrsni mostovi između vlakna i Z-linije, na nivou vlakana, a također i drugih strukturnih elemenata, kao što su kostamere koje imaju efekat. Prema *Hamm*-u (1972) količina vezane vode je određena naelektrisanjem proteina i ono izaziva odbijanje koje povećava vezivanje, kao i broj i jačinu unakrsnih mostova koje ograničavaju vezivanje (*Puolanne* i *Halonon* 2010). Ovo objašnjenje zvuči razumno, pošto su rastojanja između površine vlakana oko 15-20 nm (aktin do miozina i aktin do aktina) ili 25-30 nm (miozin do miozina), ili manje, što znači da je sloj debljine od oko 60 do 90 molekula vode. Hipoteza objašnjava uticaj soli i pH, kao i ulogu unakrsnih mostova, a samim tim i koliko se vode zadržava u mesu. Međutim, hipoteza ne uzima u obzir uticaj suprotnog jona, na primer jona natrijuma, u slučaju selektivnog vezivanja hloridnih jona koji povećavaju negativno naelektrisanje. Pored toga, *Offer* i *Knight* (1988) također tvrde da su rastojanja između filamenata suviše velika da bi se uspostavila odbojna sila koja bi bila dovoljno jaka da dovede do vezivanja vode (*Puolanne* i *Halonon* 2010). *Hamm* (1972) tvrdi da je efekat natrijum hlorida na proteine mesa najverovatnije izazvan time što je hloridni jon mnogo jače vezan za proteine nego natrijumov jon. Ovo izaziva povećanje negativnog naelektrisanja proteina. Efekat NaCl-a na različite proteine u mesu je veoma složen, i ta složenost raste ako različite koncentracije dodatog NaCl-a, KCl-a i

fosfata deluju istovremeno (*Puolanne i Halonen 2010*). Ukratko, rastvorljivost miozina se povećava ako se koncentracija NaCl-a povećava od 0,04 do 0,5 M. Posle početne agregacije i formiranja filamenata, u strukturu počinje da se ugrađuje sadržaj soli veći od 0,25 M. Oticanje miofibrila počinje na 0,5 M, bez dodatka fosfata, a na 0.4 M, s dodatkom fosfata, a dešava se i velika ekstrakcija miozina (*Offer i Knight, 1988*).

Stepen bubrenja zavisi od pH vrednosti koja izaziva promene u ukupnom naelektrisanju umreženih proteina (*Puolanne i Halonen 2010*). Bez soli, oticanje dostiže maksimum na pH 3.0, a minimum na pH 5.0 (prosečna izoelektrična tačka mesa proteina) i odatle stalno povećanje u fiziološkom opsegu pH od 6.4-7.2. Zbog selektivnog vezivanja jona, soli pomeraju izoelektričnu tačku. Sa 2% NaCl izoelektrična tačka i oticanje su minimalni na pH 4.0 (*Puolanne i Halonen 2010*). Vajlding, Hedges i Lillford su 1986 utvrdili da hipertonični rastvori soli (KCl i KI) indukuju skupljanje vlakana na pH ispod izoelektrične tačke miofibrilarnih proteina (pH 5.0), što znači da ove soli takođe imaju niže izoelektrične tačke. Sa NaCl, kao i u zagrejanom gelu je maksimum u oticanju na pH 6.0 (*Ishioroshi, Samejima, i Iasui, 1979*) ili na pH 6.2 (*Puolanne i Halonen 2010*). Veruje se da je to zbog povećanog vezivanja natrijumovog jona za negativno naelektrisane miofilamente i zbog istovremenog slabljenja vezivanja hloridnih jona zbog elektrostatičkih sila. *Hamm* (1972) takođe naglašava vezu *Hofmeister*-ovih serija sa zadržavanjem vode. Konačno, može da se kaže da su iznete hipoteze u skladu s novijim objašnjenjima datim u daljem tekstu. (*Puolanne i Halonen 2010*).

### **2.5. 1. 2. Osmotske sile**

*Hamm* (1972) snažno je podržao mehanizam elektrostatičkog oticanja, ali je posebno naglasio oticanje filamentalne rešetke u miofibrilima. *Offer i Knight* (1988) proučili su literaturu do kasnih 1980-ih i najznačajnijim smatraju fizičko-hemijski pristup i strukturne aspekte. Oni su predložili drugačiju hipotezu, takođe na osnovu selektivnog vezivanja hloridnih jona za miofibrilarne proteine. Prema *Offer*-u i *Knight*-u (1988), selektivno vezivanje ne izaziva značajno odbijanje između filamenata, ali između filamenata molekula miozina dolazi do slamanja osovine filamenta. Ovaj efekat izaziva rušenje miofibrilarne rešetke. Ako se ne koriste fosfati, jedinice teškog meromiozina su i dalje vezane za filamente aktina. *Offer*-ovi saradnici *Knight i Parsons* (1988) tvrde da se oticanje odvija putem entropijskog mehanizma, tako što se slobodni laki delovi meromiozina (LMM) vežu sa aktinskim filamentima. *Offer i Knight* (1988) takođe navode još jedan aspekt koji je blizak *Hamm*-ovoj hipotezi (1972). On započinje istim selektivnim vezivanjem hloridnih jona na filamente miozina, kao što je

*Hamm* predstavio u svojoj hipotezi, ali zbog toga što su strukturni proteini u mesu čvrsti i ne mogu da se pokreću, električne sile povlače suprotne jone (natrijumove jone) veoma blizu površina filamenata, stvarajući neravnomerne raspodele jona u vodenoj fazi (*Puolanne i Halonen 2010*). Koncentracione razlike uspostavljene osmotskim silama (pritisak) u okviru filamentalne rešetke, povlače molekule vode u sistem. Pritisak izaziva neograničeno oticanje, ali opet, unakrsni mostovi izazivaju suprotnu silu, koju su *Offer* i *Knight* nazvali "elastični pritisak" (*Puolanne i Halonen 2010*).

U svakom slučaju, osmotski pritisak stvara neravnomernu raspodelu jona i elastični pritisak je jednak u bilo kojem trenutku. Prema *Offer*-u i *Knight*-u (1988), osmotski pritisak je,

$$\pi = \frac{RT(1/2 - \chi_1)}{v_1 q^2} \quad (1)$$

gde je

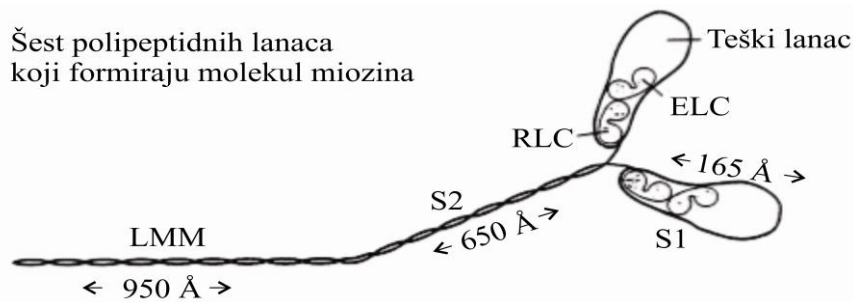
P- elastični pritisak

$\pi$  -osmotski pritisak ,

$\pi=P$  –stepen bubrenja je  $q_m$

$\chi_1$  - je *Flory-Huggins*-ova konstanta interakcije polimera s rastvaračem ( $\chi_1 < 1/2$  za dobre rastvarače i  $\chi_1 > 1/2$  za slabe rastvarače), R je gasna konstanta, T je apsolutna temperatura, q je količina oticanja,  $v_1$  je specifična zapremina rastvarača, i  $v_e$  je broj molova umreženih jedinica u neotekloj zapremini  $v_0$ . Vidi se da su jedino bitne promenljive konstanta interakcije  $\chi_1$  i gustina poprečnih mostova  $v_e$ . Takođe, ove promenljive objašnjavaju uticaj sadržaja soli, unakrsnih mostova, pH i denaturišući efekat koji nastaje skraćivanjem S1-S2 kompleksa miozina. Molekul miozina prikazan je na slici 7. Povećavanjem osmotske sile (interakcije između proteina i rastvora) i eliminisanjem elastičnog pritiska, remećenjem ili smanjivanjem jačine unakrsnih mostova, dolazi do povećanja zadržavanja vode i obrnuto. Slični aspekti, koji koriste različite tehnologije vide se u *Hamm*-ovim hipotezama. Osnovna razlika je u tome što *Offer* i saradnici naglašavaju strukturne aspekte, dok je kod *Hamm*-a (1972) težište na elektrostatičkim silama. (*Puolanne i Halonen 2010*).





**Slika 7.** Molekul miozina (*Puolanne i Halonen 2010*).

### 2.5. 1. 3. Kapilarne sile

Na osnovu istraživanja Offer-a i Trinick-a (*Offer i Trinick 1983*) *Hermansson* (1986) je predložio hipotezu kapilarnih sila. *Offer i Trinick* zaključuju da bi sile površinskog napona u kapilari s prečnikom jednakim rastojanju između filamenata (*interfilamental spacing*), mogle da održe vodeni stub i do 300 m visine i zato se čini razumno pretpostavka da je voda zadržana kapilarnim silama. Uglavnom je to u prostoru između filamenata u okviru miofibrila, te je značajan deo zadržan u ekstracelularnom prostoru i prostoru između miofibrila. Interesantno je da se *Offer* ne vraća na taj zaključak u kasnijim radovima (osim u odnosu na formiranje kapa), ali sugerše osmotsku hipotezu i konstantu interakcije  $\chi$  polimera proteina i rastvora. Zapravo, ove hipoteze su tesno povezane. (*Puolanne i Halonen 2010*).

Jednačina kapilarne sile je:

$$h = \frac{2\gamma \cos \theta}{r\Delta\rho g} \quad (2)$$

gde je:  $h$  - visina do koje se tečnost podiže,  $\gamma$  je površinski napon,  $\theta$  - kontaktni ugao,  $r$  je poluprečnik kapilare,  $\Delta\rho$  je gustina tečnog isparenja i  $g$  je gravitaciono ubrzanje. (*Puolanne i Halonen 2010*).

Kapilarne sile zahtevaju međupovršinsku fazu gas/rastvor i vektor duž gravitacionog polja ( $G$ ), ali ovo nije od nužnog značaja. Pod normalnim okolnostima, vazduh je jak hidrofobni element u sistemu ako sadrži samo nepolarne molekule, ali takođe postoje i hidrofobne i

hidrofilne oblasti na površini proteina mesa. Iako *Offer* i *Trinick* (1983) i *Hermansson* (1986) uz podršku *Tornberg*-a (2005) posebno naglašavaju značaj kapilarnosti za zadržavanje vode, ali stvarno dokazivanje hipoteza nije urađeno. Poluprečnik kapilare će se smanjiti posle uginuća, što u skladu s jednačinom kapilarne sile treba da dovede do povećanja kapilarnih sila i samim tim do povećanja kapaciteta zadržavanja vode. Međutim, ako se filamentalna rešetka skuplja, kapacitet zadržavanja vode se smanjuje (*Puolanne i Halonen*, 2010). Ovo naglašava značaj strukturnih aspekata filamentalne rešetke za zadržavanje vode, ali iznačaj promene površinskog napona. Takođe je teško definisati stvarni poluprečnik pora u mreži filamenata proteina. Interakcije između proteina i rastvora mogu da budu važnije nego male promene prečnika pora.

U radu *Offer*-a i *Trinick*-a (1983) je prikazano bubrenje miofibrila potpuno potopljenih u rastvore soli, ali teško je dovesti u vezu mehanizam zadržavanja vode ili njegove promene, s kapilarnim silama. *Hamm* (1972) je tvrdio da pri niskoj vlažnosti vazduha, kapilarni uticaji mogu da budu beznačajni, ali na višim vlažnostima vazduha (kad je visoka vlažnost u mesu) ovi uticaji više nisu beznačajni. Jasno je da strukturni aspekti, kao što su aktomiozinski unakrsni mostovi ili denaturacija (koja obično dovodi do skraćanja filamenata ili unakrsnih mostova), takođe imaju uticaj na kapilarnost, što *Offer* i *Trinick* i naglašavaju. Slobodna energija površina proteina/rastvor, rastvor/ rastvor, površina proteina/vazduh i rastvor/vazduh može da doprinosi, pa kapilarne sile, koje su klasičnim putem izračunate preko visine vodenog stuba ne moraju da budu toliko bitne. Važenje hipoteza kapilarnih sila tek treba da bude istražena (*Puolanne i Halonen M.* 2010).

## 2.6. Voda u biološkim sistemima

*Fennema* (1999) je u svom revijskom radu opisao svojstva vode. Molekul vode je sam po sebi jedinstven. Prečnik molekula vode koji nije vezan vodoničnom vezom je oko 0,32-0.33 nm, dok je molekul vode koji je vezan prečnika 0.27-0.28 nm (*Fennema*, 1999; *Graziano*, 2004). Molekul vode je u obliku slova V. Elektronegativni atom kiseonika privlači elektrone iz kovalentna veze između atoma kiseonika i atoma vodonika, ostavljajući svaki atom vodonika sa delimično pozitivnim naelektrisanjem, a atom kiseonika sa delimično negativnim naelektrisanjem. Dakle, molekuli vode su mali, imaju veliki dipolni momenat, sposobnost da grade vodonične veze i imaju veoma veliku dielektričnu konstantu. *Colins* i *Washabaugh* (1985) predstavili su iscrpno razmatranje *Hofmeister*-ovog efekta i ponašanje vode u

međupovršinskoj fazi. Ovi principi mogu da se primene na mrežu proteina, tj. na interakcije proteina i vode. Oni zaključuju da je voda u blizini izolovane međupovršinske faze podeljena u tri monomolekulska sloja. Oni su predložili da rastvorene supstancije određuju ponašanje prvog međupovršinskog sloja ( $I_1$ ), ostatak rastvora (*bulk solution*) određuje ponašanje trećeg međupovršinskog sloja ( $I_3$ ), te da se ta dva sloja,  $I_1$  i  $I_3$  takmiče za stvaranje vodoničnih veza s mešovitim, prelaznim vodenim slojem ( $I_2$ , tranzicioni sloj). Polarni kozmotropi (stvaralac strukture vode), uzajamno reaguje sa  $I_1$  snažnije nego što bi reagovala slobodna voda na njegovom mestu; kaotropi (rušioci strukture vode) u interakciji sa  $I_1$  deluju manje snažno i nepolarni kozmotropi (stvaraoci strukture vode) uzajamno reaguju sa  $I_1$  manje snažno nego što bi reagovala slobodna voda. Oni su postavili dva postulata: (i) molekul vode će favorizovati svoje najjače vodonične veze, a biće manje povoljan za druge veze s kojima ne može istovremeno da ostvari maksimalne interakcije, (ii) jaka interakcija između kozmotropa i vode će da prenese naelektrisanje od polarnog kozmotropa do vode. Ovo dovodi do, ne samo do čvrstog vezivanja (delimična nepokretljivost)  $I_1$  molekula vode, nego i do pokušaja raspodele naelektrisanja koje je preneto iz rastvora pomoću nekoliko molekula. Nagomilavanjem prenetog naelektrisanja, solvatisani sloj može da postane od 5 do 6 molekula debljine. Ovaj pristup dosta podseća na teoriju Ling-a iz 1965., koja je usvojena i dalje razvijana od strane Hamm-a 1972 (*Puolanne i Halonen M. 2010*).

U osnovnoj knjizi o vodi u biološkim sistemima (*Roos, Leslie i Lillford - Edit.*), *Wennerstrom* je 1999 temeljno predstavio osnovne mehanizme zadržavanja vode u biološkom i koloidnom sistemu (tj., najmanje jedna od tri dimenzije su između 1 i 1000 nm). Složenost bioloških sistema je veoma dobro poznata, ali temelji zadržavanja vode moraju, međutim, da se predstave korišćenjem više pojednostavljenih modela. *Wennerstrom* (1999) predlaže sledeće modele: površinske sile, električne sile dvosloja, hidrofobne interakcije i odbojne entropijske sile (*Puolanne i Halonen M. 2010*).

### **2.6. 1. Površinska sila**

Površinska sila, ili disjonizovani pritisak je sila koja je potrebna da zadrži dva tela na stalnoj razdvojenosti. Sila je proporcionalna površini i izražena kao sila po jedinici površine, kao i pritisak. Predloženo je da sila bude tretirana termodinamički kao derivat slobodne energije koji može da se podeli u dva doprinosa, entalpiju i entropiju. Takođe je moguće da se ne odnosi samo na silu između dve ravne, nego i između zakrivljenih površina. To bi se onda moglo primeniti na npr. miofilamente.

### 2.6. 2. Električna sila dvosloja

Uvek će odbojnost između dve površine imati slično ukupno naelektrisanje. Odbojnost izaziva neravnomernu raspodelu kontra-jona u slobodnoj vodi između površina, što dovodi do osmotskog pritiska u slobodnoj vodi. Teorijske osnove se vraćaju na *Poisson-Boltzmann*-ovu jednačinu (*Puolanne i Halonen M. 2010*). Odbijanje nastaje kad se dve površine približe, kontra-joni u slobodnoj vodi će imati manje raspoloživog prostora što izaziva smanjenje entropije, a time se stvara odbojna sila. *Wennerstrom*, takođe naglašava da jon-jon interakcije teže da snize unutrašnju energiju, kad se dve površine približavaju. U koloidnom sistemu (miofilamenti su koloidne veličine), stabilnost nastaje zbog konkurencije između privlačnih *van der Waals*-ovih sila promovišući udruživanje i odbojnu dvoslojnu silu. To je uključeno u tzv. *DLVO* teoriju, ali ne toliko detaljno da tačno opisuje ponašanje biološke supstancije u fiziološkom rastvoru ili rastvoru s većim koncentracijama soli (*Puolanne i Halonen 2010*). Međutim, opšte je mišljenje da ovi aspekti mogu da budu od važnosti kad se govori o ponašanju rešetke filamenata u odnosu na tehnološke činioce kao što su pH vrednosti, soli, toplota itd.

### 2.6.3. Hidrofobne interakcije

Hidrofobne interakcije imaju osnovnu ulogu u molekularnoj organizaciji u vodenim sistemima. Molekulska osnova za hidrofobne interakcije je jaka povezanost molekula slobodne vode koja izaziva isključivanje hidrofobnih grupa iz vode. Opseg ovog uticaja je još uvek pod raspravom. Međutim, kad dve hidrofobne površine (na primer hidrofobne oblasti proteina ili ulja) zbog velikog odvajanja dođu u dodir, biće značajno smanjena slobodna energija. Zaključak je da su hidrofobni uticaji na vodu posredni, kao što je istakao Hamm (1972) i kasnije, npr. Collins i Washabaugh (1985), o uticaju strukture vode (*Puolanne i Halonen 2010*).

### 2.6.4. Odbojne entropijske sile

Slobodna energija sistema  $\Delta G$  je određena entalpijom  $\Delta H$ , entropijom  $\Delta S$  i temperaturom  $T$  (jed. 3):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

U spontanoj reakciji, slobodna energija teži da se smanji ( $\Delta G < 0$ ), a entropija poraste ( $\Delta S > 0$ ). *Wennerstrom*-ov (1999) postulat govori o tome da kad se dve slične površine približe i površinski molekuli počnu da gube svoje slobodne energije usled smanjenja broja dozvoljenih konfiguracija, smanjenje entropije izaziva odbojne interakcije. Obično postoji

nadoknada smanjenja energije usled povećanja monomer-monomer dodira, ali u ogovarajućem rastvarača (površinski molekuli se vraćaju na minimalne dodire) entropija će nadvladati entalpiju. Ovde je vidljiva sličnost s miozinskim i aktinskim filamentima. Miozinski filamenti se zato ne približavaju, te tako molekuli miozina u vlaknu teže da se raspadaju u slanim rastvorima (dobar rastvarač), kao rezultat entropijske sile. Offer i Knight (1988), Millman i Nickel (1980) i Knight i Parsons (1988) su, takođe razmatrali uticaje konfiguracione entropije i elektrostatičke sile u odnosu na oticanje miofibrila praćenjem oticanja filamenata miozina (*Puolanne i Halonen M. 2010*).

## **2.7. Intracelularna tečnost**

Mišićno vlakano je višejedarna ćelija. Priroda intracelularne vode još uvek je pod raspravom. Bilo je tvrdnji da je slična slobodnoj vodi (*Israelachvili & Wennerstrom, 1996*), ali postojala su i oprečna mišljenja (*Puolanne i Halonen 2010*). Oni su smatrali da je ćelijska voda visoko strukturisana i da njen veliki deo narušava osmotska i pokretna svojstva; ponekad se čak mislilo da podseća na staklasto stanje (*Puolanne i Halonen 2010*). Viskozitet vode u ćelijama je dva puta veći nego viskozitet slobodne vode. Jedan od najvažnijih radikalnih uvida potiče od *Chaplin-a* (2004), koji smatra da su ćelije vode organizovane kao klatrati oko  $K^+$  jona (*Puolanne i Halonen. 2010*).

### **2.7. 1. Uticaj soli/jona na strukturu vode: visoke i niske gustine vode**

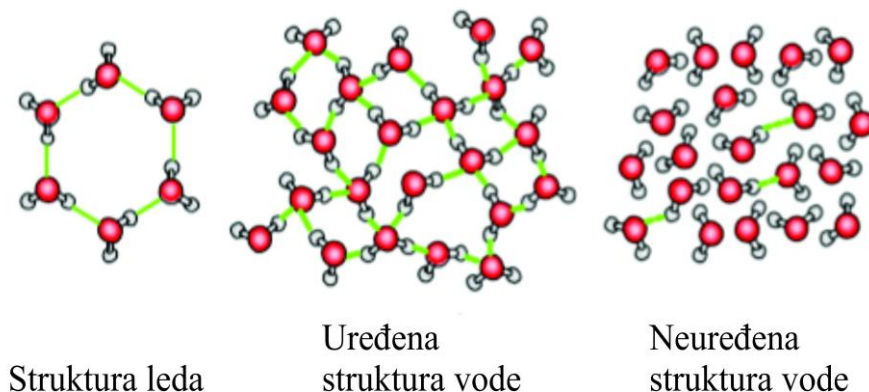
Da bi se razumeli uticaji preovlađujuće jon raspodele sarkomere na zadržavanje vode mišića, neophodno je da se uvedu dva koncepta, visoka i niska gustina vode. Na slici 8. prikazani su molekulske oblici vode (*Moelbert et al 2004*). Eksperimenti su pokazali da mali viševalentni jon koji učestvuje u izgradnji strukture vode, proizvodi tzv. niske gustine (*LD*) vode, dok veliki jednovalentni joni koji remete strukturu, proizvode visoke gustine (*HD*) vode. U vodi *HD*, molekuli vode se pomeraju zajedno i vodonične veze su savijene i vrlo slabe (*Puolanne i Halonen 2010*). Veoma je reaktivna i ima malu viskoznost. *LD* voda, s druge strane, je inertna i njena viskoznost je veća. Povećanje viskoznosti je u vezi sa smanjenjem aktivnosti vode (*Puolanne i Halonen 2010*). *HD* voda ima nižu tačku smrzavanja od *LD* vode, što znači da za vreme, na primer, zamrzavanja mesa, koncentracija *HD* vode se povećava, a pošto je *HD* voda visoko reaktivna, zamrzavanje treba izvršiti što je brže moguće. *LD* voda nastaje tzv. građenjem strukture kosmotropskim jonima.

Kosmotropski joni pozitivno utiču na hidrataciju, što znači da kao rastvorene supstancije, spajaju mrežu vodoničnih veza sa susednim molekulima vode, što čini molekule vode manje pokretnim i više strukturisanim nego što su molekuli u slobodnoj vodi. Na primer, jednonoalentni katjoni  $\text{Na}^+$  i  $\text{H}^+$ , dvovalentni katjoni  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , dvovalentni anjoni  $\text{HPO}_4^{2-}$  i  $\text{SO}_4^{2-}$ , hidrofobne aminokiseline, glukoze i neki jednonoalentni anjoni, kao  $\text{OH}^-$ , se klasifikuju kao kosmotropi (Puolanne i Halonen. 2010). Oni stabilišu matične konformacije mnogih proteina (Der et al. 2007). Pri visokim koncentracijama, anjonski kosmotropi su isključeni iz međupovršinske interakcije proteina i vode. Ugljovodonici u alifatičnim i aromatičnim molekulima, kao i najveći broj intracelularnih anjona, uključujući i fosfate, sulfate, karboksilate i glutamate, spadaju u kosmotrope (Puolanne i Halonen. 2010).

Joni kaotropi (razbijaju strukturu) imaju suprotan, negativan hidratacioni uticaj, što znači da su slabe vodonične veze između susednih molekula vode, što molekule vode čini više pokretnim, a manje strukturisanim nego što su molekuli u slobodnoj vodi, odnosno, izazivaju visoku gustinu (*HD*) vode (sl. 6). Tako slobodna voda teži da odbija kaotrope prema interfazama (Puolanne i Halonen M. 2010). Kaotropi destabilišu mnoge proteine koji imaju zatvorene matične konformacije i stabilišu one koji imaju otvorene konformacije (Der et al 2007). Na primer,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i  $\text{Br}^-$ , veliki jednonoalentni joni  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{C}(\text{NH}_3)^{4+}$ , kao i  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{HSO}_4^-$  se klasifikuju kao kaotropi. Stabilna naelektrisanja biomolekula su jaki kaotropi i najveći broj intracelularnih jednovalentnih katjona su kaotropi (Puolanne i Halonen 2010). Ovo uključuje  $\text{K}^+$  i lizin, arginin i histidin. Anjonski kaotropi (npr.  $\text{Cl}^-$ ) se akumuliraju u interfaznom sloju između proteina i vode, čineći ga više hidrofilnim (Puolanne i Halonen 2010). Oni takođe mogu da budu adsorbovani na nepolarnim površinama i interfazama, što znači da mogu da budu adsorbovani na nepolarnim stranama lanaca kao što su arginin, histidin i lizin (Puolanne i Halonen 2010). Osobine kaotropa su od suštinskog značaja za razumevanje uticaja dodatka  $\text{NaCl}$  u meso.

Uticaj anjona na strukturisanje vode jači je od uticaja katjona zbog asimetrije naelektrisanja u molekulu vode. Mali, visoko hidratirani katjoni po mogućstvu akumuliraju se u *HD* vodi, dok se veći, jednovalentni katjoni akumuliraju u *LD* vodi (Puolanne i Halonen 2010). Marcus je 2009 recenzirao metode klasifikacije jona na kozmotrope ili kaotrope ( Puolanne i Halonen M. 2010). Jedna od najšire korišćenih metoda (po Collins-u iz 1997.) je zasnovana na znaku tzv. Jones-Dole  $\beta$ -koeficijenta viskoznosti, koji može da bude pozitivan za kozmotropne jone i negativan za kaotropne jone (Puolanne i Halonen 2010). Ona opisuje interakcije jona i vode i korelira sa površinom gustine naelektrisanja.  $\beta$  -vrednost nula označava jačinu

interakcije voda-voda. Prema *Jones-Dole*  $\beta$ -koeficijentu viskoznosti,  $Mg^{2+}$  je veoma jak kozmotrop ( $\beta = 0,385$ ),  $Ca^{2+}$  ( $\beta = 0,285$ ) i acetat,  $AC^-$  ( $\beta = 0,250$ ), nešto slabiji, dok je  $Na^+$  mnogo slabiji ( $\beta = 0,086$ ) (*Puolanne i Halonen M. 2010*).  $Cl^-$  je, s druge strane, slab kaotrop ( $\beta = -0,007$ ), kao i  $K^+$  ( $\beta = -0,007$ ). Omta, Kropman, Woutersen i Bakker (2003) su, međutim, suprotnog mišljenja u pogledu toga i smatraju da su uticaji jona na strukturu vode zanemarljivi (*Puolanne i Halonen M. 2010*).



**Slika 8.** Molekulski oblici vode (*Moelbert et al 2004*).

### 2.7.2. Uticaj proteina na strukturu vode/uticaj vode na strukturu proteina

Blizina okolnih površina proteina snažno utiče na dinamiku kretanja vode. Voda postaje uređena blizu nekih makromolekula i unutar ćelija, a prosečno rastojanje između makromolekula može biti samo oko 2 nm. Voda može da ima izuzetno različita svojstva kao rastvarač ukoliko je udaljena 2-3 nm od hidrofobne površine. Voda ima težnju da smanji površinu nepolarnim grupama koje dovode do hidrofobne interakcije. Poreklo velikog dometa hidrofobnih interakcija još uvek nije jasano. Hidrofobna interakcija može da se tumači kao rast *LD* vode na hidrofobnoj površini (*Puolanne i Halonen 2010*). Pretpostavlja se da voda organizovana u hidrofobnu strukturu takođe povećava efektivne sile između naelektrisanih grupa. Hidrofobne interfeze smanjuju dielektričnu propustljivost okoline (*Puolanne i Halonen M. 2010*).

Negativno naelektrisane strane lanaca aminokiselina su snažno hidratisane, a pozitivno naelektrisane su slabo hidratisane (*Collins et al 2007*). Dve aminokiseline koje imaju najveći kapacitet zadržavanja vode su arginin i glutaminska kiselina (*Puolanne i Halonen 2010*). Pretpostavilo se da jedna aminokiselina svojom jonskom stranom lanca može da veže 4-7 molekula vode u arginin, glutaminsku kiselinu i lizin. F-actin ima i kosmotropska i

kaotropna svojstva. Površina F-aktina ima dosta negativnih naelektrisanja, koja zajedno sa svojom filamentoznom strukturom daju strukturnu osnovu za nastajanje veoma pokretljive vode koja ima veću pokretljivost nego slobodna voda. Poddomen 1 G-aktina je u potpunosti dostupan vodi u F-aktin spirali. U filamentima F-aktina je primećeno da kada osmotski pritisak proteina raste, deo vode koja se nalazi u filamentima se izbacuje, a zapremina i prečnik hidratisanog filameta opadaju (*Puolanne i Halonen 2010*).

Sposobnost vezivanja vode miozina je u vezi s polarnim aminokiselinama, posebno negativno naelektrisanim ostacima arginina i glutaminske kiseline. S1 sadži mnoge snažno vezane molekule vode. Procenjuje se da je taj broj vezanih molekula vode oko 2000. Osmotska svojstva miozina-S1 su okarakterisana. Utvrđeno je da se količina veoma pokretljive vode povećava kad filamenti aktina i miozina dođu u dodir. Postoje neke naznake da građenje unakrsnih mostova u stanju rigora remeti vezivanje strukturne vode filameta miozina i aktina u mišićnim vlaknima (*Yamada 1998*). Uticaj osmotskog pritiska na hidrataciju aktomiozina je proučavan i procenjuje se da se oko 2500 molekula vode otpušta kada se glava miozina vezuje za filament aktina (*Puolanne i Halonen 2010*).

Molekuli vode mogu da prođu kroz ćelijski zid, bilo difuzijom kroz fosfolipidne dvoslojne membrane ili preko akvapora (AQP) - kanala kroz koje voda prolazi kroz proteinsku ćelijsku membranu što omogućava brži transport vode kroz ćelijske membrane. AQP4 je pronađen u skeletnim mišićima, posebno u mišićima koji se brzo grče i prolaze kroz brze promene zapremine usled mišićne kontrakcije. Međutim, predloženo je da AQP4 ne izgleda kao da ima važnu ulogu u fiziologiji mišića (*Puolanne i Halonen 2010*). Postoji inverzija polariteta ćelijske membrane *post mortem*, koja oslobađa ekstracelularne jone u sarkoplazmu i sarkolema se kida i curi (*Puolanne i Halonen 2010*).



## 2.8 . Uticaj raspodele jona na sistem mišićnih proteina i njihovo zadržavanje vode

### 2.8 1. Hofmeister-ova serija

*Hofmeister*-ova serija ima uticaj na raspodelu jona u filamentima aktina i miozina, na njihovu stabilnost i zadržavanje vode. *Hofmeister* je dao svoju čuvenu seriju (*Hofmeister* / liotropik serija) 1880., kad je pri ispitivanju uticaja jona na proteine, primetio da su neki joni imali snažniju karakteristike isoljavanja od drugih (*Puolanne i Halonen 2010*). Serija može da se koristi da bi se doneli zaključci o stabilnost proteina. Na primer, redosled efikasnosti u stabilizaciji proteina je  $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^-$  za anjone i  $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Mg}^+ > \text{Ca}^+$  za katjone (*Zhao, 2005*). Prema tome, optimalna stabilizacija bioloških makromolekula se dobija korišćenjem soli koja se sastoji od kozmotropskih anjona i kaotropskih katjona. *Hofmeister*-ovi efekti su demonstrirani brojnim tehnikama (*Colins 2007*). Iznenađujuće, ova serija, iako priznata od strane naučnika, je bila skoro zaboravljena, ali je došla do izražaja u poslednje vreme. Ovoj seriji nedostaje teorijsko objašnjenje: zašto različiti joni reaguju drugačije s proteinima? *Colins* je ponovo objasnio "Zakonom uskladjivanja afiniteta vode" (*Collins, 2007, Puolanne i Halonen. 2010*).

Uticaj jona na proteine prati *Hofmeister*-ova serija: proteini se stabilišu snažnim kaotropskim katjonima i kosmotropskim anjonima, a destabilišu kosmotropskim katjonima i kaotropskim anjonima (*Zhao 2005*). Efikasnost anjona i katjona da promovišu kapacitet zadržavanja vode takođe sledi iz *Hofmeister*-ove serije. Posle toga, predloženo je da NaCl ima funkcije da razara strukturu sastojaka proteina. Prema rezultatima NMR, dodavanje soli u meso izaziva to da više vode bude čvrsto vezano za miofibrilarni matriks dok ostatak vode postaje manje čvrsto vezan (*Bertram et al. 2002*).

Efikasnost jona u strukturi vode može takođe da se izvede iz *Hofmeister*-ove serije. Joni se akumuliraju oko naelektrisanog filameta, tako da se voda dovodi u ravnotežu povećanjem njene gustine, što izaziva proizvodnju *HD* vode oko naelektrisanog filameta, a smanjenjem gustine vode dolazi do proizvodnje *LD* vode, oko oblasti hidrofobnih filameta / između filameta (*Puolanne i Halonen 2010*). *Hofmeister*-ove soli menjaju svojstva između interfaze protein / voda, tako da ih kozmotropi čine više hidrofobnim, a kaotropi više hidrofilnim (*Der et al., 2007*). Prema eksperimentima, anjoni imaju odlučujući uticaj. Kaotropi destabilišu mnoge proteine, dok ih kozmotropi stabilišu. Kozmotropi povećavaju, a kaotropi smanjuju međupovršinski napon između proteina i vode, pri visokim koncentracijama soli (*Der et al 2007, Puolanne i Halonen M. 2010*). Anjonski kozmotropi su isključeni iz interfaze pri visokim koncentracijama, dok anjonski kaotropi imaju suprotnu težnju, posebno kad katjon

može da pristupi površini, što je u saglasnosti sa svojstvima strukturisanja vode kosmotropskim anjonima i sa svojstvima razbijanja strukture vode pomoću kaotropskih anjona. Slabo-hidratirani joni, kao što su  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$ , biće adsorbovani na nepolarne površine i interfaze ako su više izražene voda-voda veze nego slabije veze sa kaotropima (*Collins et al 2007, Puolanne i Halonen 2010*). Vredi napomenuti da uticaj jona na aktivnost i stabilnost enzima može da se objasni *Hofmeister*-ovom serijom (*Zhao, 2005*). Njih stabilišu kaotropski katjoni i kozmotropski anjoni, a destabilišu kozmotropski katjoni i kaotropski anjoni.

Skoro svi *Hofmeister*-ovi joni isoljavaju nepolarne grupe, a isoljavaju i peptidne grupe. Osnovni mehanizmi koji stoje iza ovih suprotnih uticaja još uvek su sporni. Koeficijent isoljavanja se povećava ako raste broj atoma ugljenika u alifatičnoj strani lanca aminokiselina, jer se hidrofobnost povećava u skladu s tim (*Puolanne i Halonen M. 2010*).

## 2.8 2. Zakon usklađivanja afiniteta vode

Kao što je već pomenuto, mišićno vlakno je višejedarna ćelija. Prema *Ling*-ovoj hipotezi udruživanja-indukcije, intracelularni  $\text{K}^+$  je adsorbovan na  $\beta$  i  $\gamma$  – karboksilne grupe ćelijskih proteina, odnosno na ostatke arginina ( $\text{pK}_R = 4.1$ ) i glutaminske kiseline ( $\text{pK}_R = 3.9$ ). Tako  $\text{K}^+$  neće biti slobodan i imaće manji uticaj na osmotske aktivnosti ćelije. *Ling* tvrdi da se  $\text{K}^+$  nalazi u A-segmentu i Z-liniji (*Puolanne i Halonen 2010*). Predloženo je da  $\text{K}^+$  ima veći afinitet nego  $\text{Na}^+$  ka negativno naelektrisanj polimernoj površini ćelije, jer više energije bi bilo potrebno da se uklone slojevi hidratacije  $\text{Na}^+$  koji ima veći hidratirani prečnika od  $\text{K}^+$  (*Puolanne i Halonen 2010*). S druge strane, prema *Chaplin*-u (2004),  $\text{Na}^+$  joni teže da se vežu za slabije karboksilne grupe ( $\text{pK}_a < 4.5$ ), dok se  $\text{K}^+$  jon radije vezuje za jače kiseline ( $\text{pK}_a < 3.5$ ). Postoji dokaz da zapravo  $\text{Na}^+$  ima jači afinitet prema površini proteina od  $\text{K}^+$  jona zbog lokalnih uparivanja  $\text{Na}^+$  jona s negativno naelektrisanim karboksilnim grupama u lance arginina i glutaminske kiseline (*Pollack 2003, Puolanne i Halonen 2010*). Karboksilnim grupama pripadaju preovlađujući anjoni bioloških sistema i oni su poznati kao kosmotropski. Pored ove jon-jon interakcije postoji slabija jon-dipol interakcija između  $\text{Na}^+$  jona i proteina osnovnog lanca (uglavnom amid karbonilna grupa), a čak postoji i slabiji doprinos s druge strane lanca.

Još jedan zaključak može da se izvede korišćenjem 'Zakona usklađivanja afiniteta vode' koji kvalitativno objašnjava *Hofmeister*-ove serije (*Collins et al. 2007*). Prema *Collins*-u, pozitivni i negativni joni koji se poklapaju u veličini i imaju jednake oblike naelektrisanja čine jonske parove. U *Hofmeister*-ovoj seriji, joni su raspoređeni u skladu sa svojom

gustinom površinskog naelektrisanja koja korelira sa svojim afinitetom vode (*Puolanne i Halonen 2010*). Ako protein sadrži kosmotropsku stranu lanca koja nosi naelektrisanje, poželjno je da je jonski par u obliku suprotnog naelektrisanja s drugim kosmotropom. Isto bi važilo i za kaotropnu stranu lanca proteina i kaotropne jone u rastvoru: slično voli slično. Glavni intracelularni anjoni (fosfati, sulfati, karboksilati, karbonati) su kosmotropski dok su glavni katjoni ( $K^+$ , lizin, arginin, histidin) kaotropni.  $Na^+$  se poklapa, na primer, s karboksilatima. *Collins* je rangirao jačine interakcija u vodenom rastvoru soli u sledećim opadajućem redosledu: dva kosmotropa > kosmotropi i vode > dva molekula vode > kaotropi i vode > dva kaotropa (*Collins et al. 2007*). Jon-uparivanje utiče na aktivnost elektrolita, kao i na osmotski pritisak rastvora. U odeljku 8.4 je pokazano kako 'Zakon usklađivanja afiniteta vode' može da se primeni prilikom objašnjavanja uticaja dodavanja NaCl na filamente aktina i miozina (*Puolanne i Halonen 2010*).

Interakcija između jona i proteina zavisi ne samo od toga koji su joni i proteini u pitanju, već i od pH i temperature, što čini celokupni sistem prilično složenim. Treba napomenuti da postoje suprotna mišljenja u vezi sa "Zakonom usklađivanja afiniteta vode" koja naglašavaju ulogu hidratacije vode. Prema tom mišljenju, zakon ne uzima u obzir mogućnost zajedničkog rastvarača para jona, umesto dodira između jonskog para koji gradi sa anjonima slabe karboksilne kiseline (*Puolanne i Halonen 2010*).

### **2.8.3. Pre- i post-mortem sarkomerne jonske vrste i jonske jačine**

Prilikom razmatranja mesa, koncentracija jona se obično daje u odnosu na njihovo mesto u mišićima, odnosno, bilo unutar ili van mišićnih vlakana (intra ili ekstracelularni). Međutim, znajući da intracelularna koncentracija ne mora da daje precizne jonske jačine unutar sarkomere, ostaje pitanje koja je jonska jačina za koju postoji najveći interes. S druge strane, jonska jačina je neposredno povezana sa elektrostatičkim uticajem, gde se pojavljuju slobodni joni u rastvoru i tako smanjuju jačinu elektrostatičkih interakcija između naelektrisanih površina (skrinig efekat). Kad se koncentracija slobodnih jona povećava i ovaj uticaj se povećava. Ovde se reč slobodan mora naglasiti, pošto joni upareni s vlaknima proteina ne učestvuju u jonskoj jačini i ne utiču na skrinig efekat.

Pored razlikovanja ekstra i intracelularne koncentracije u mišićima i intra i ekstra-koncentracije sarkomere u mišićnim vlaknima, druga podela bi trebalo da bude napravljena na osnovu jonske koncentracije i jonske jačine. *Pre mortem* jonska jačina (fiziološka jonska jačina) intracelularne tečnosti obično zauzima 0.15 M, a vrednost se izračunava, na primer,

po *Alberts-u* i *Ganong-u*, dok je *post-mortem* jonska jačina procenjena na 0,19 M - 0,26 M (*Puolanne i Halonen 2010*). Pitanje je, koliko su pouzdane ove vrednosti. One mogu biti izračunate ili na osnovu pojedinačnih jonskih koncentracija, merenih *in vitro* ili dobijene na osnovu tačke mržnjenja celog mišića na odgovarajućem osmotskom pritisku. Međutim, bilo bi neophodno da se znaju prave jonske jačine unutar sarkomere.

Zbog stabilnog negativnog naelektrisanja u miofilamentima, katjoni su koncentrisani, a rastvorljivi anjoni su u velikoj meri isključeni iz miofibrila. Znatno više negativnog potencijala je pronađeno u A-segmentu nego u I-segmentu u rastvorima bez ATP-a, a uniformna raspodela naelektrisanja je nađena u rastvorima koji sadrže ATP. S druge strane, prema drugoj studiji, negativni potencijal je najniži u I-segmentu, srednji u A-segmentu, a najveći u Z-disku, što može da se tumači time što I-segment ima najveću koncentraciju anjona koji su sposobni da difunduju i najnižu koncentraciju katjona koji su sposobni da difunduju (*Puolanne i Halonen 2010*).

Jedna od glavnih razlika između *pre-i post-mortem* jonske koncentracije u mišićima je u vezi s  $\text{Na}^+$  jonima. U *pre-rigor-u* sadržaj natrijuma je 0,142 M i 0,01 M u ekstracelularnom i intracelularnom prostoru, kako su našli Aberle, Forrest, Gerrard, i Mills 2001 (*Puolanne i Halonen 2010*). Od *rigora*, pa nadalje, ATP vođen Na / K pumpom prestaje i koncentracije će težiti da se izjednače, što je dovelo do toga da intracelularna koncentracija  $\text{Na}^+$  iznosi 0.027 M. (*Offer i Knight, 1988*).  $\text{Na}^+$  joni su praktično isključeni iz živih mišićnih vlakana, da bi se sprečilo taloženje soli unutar ćelija (kao što je predloženo *Hofmeister-ovom* serijom). Kao što je pomenuto ranije, glavni intracelularni anjoni su kosmotropski, kao što to definiše "slično voli slično", i "Zakon usklađivanja afiniteta vode". Dakle,  $\text{K}^+$  je preovlađujući intracelularni katjon (koncentracija oko 0.15 M). Intracelularni  $\text{Ca}^{2+}$  ima koncentraciju oko  $4 \times 10^{-2} - 10^{-4}$  puta nižu od ekstracelularne koncentracije, koja je sama po sebi prilično niska (oko 0.0025 M), a intracelularni  $\text{Mg}^{2+}$  je veoma složen sa ATP-om i drugim anjonima. S druge strane, koncentracija intracelularnog  $\text{Cl}^-$  jona je niska (oko 0.003 M), jer se takmiči sa DNK za pozitivno naelektrisana vezujuća mesta proteina (*Collins 2007*).

Posle uginuća vlakana, dešavaju se promene u jon propustljivosti sarkoleme (*Puolanne i Halonen 2010*). Kad vlakno ulazi u stanje *rigora*, polupropustljivost sarkoleme počinje da nestaje. Tako da će  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i  $\text{Ca}^{2+}$  joni biti u mogućnosti da difunduju u sarkoplazmu. Međutim, čak i iako su ekstracelularne koncentracije  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  prilično visoke (oko 0,15 M za  $\text{Na}^+$  i 0,1 M za  $\text{Cl}^-$ ) ekstracelularna zapremina mišića iznosi samo oko jedne desetine ukupne zapremine mišića, tako da će njihova koncentracija biti znatno razređena u mišićnim

vlaknima. Još uvek nije poznato da li svi joni koji ulaze u sarkoplazmu difunduju u sarkomere. F-actin je okružen oblakom kontra-jona, koji se u fiziološkim uslovima sastoji uglavnom od  $K^+$  jona (*Gartzke & Lange, 2002, Puolanne i Halonen 2010*). Međutim, kad  $Na^+$  difunduje kroz sarkomeru, verovatno postoji konkurencija između  $K^+$  i  $Na^+$  kontra-jona koji okružuju F-aktin. Takođe je sugerisano da supstancije malih molekulskih masa, posebno neorganski elektroliti bivaju adsorbovani na različite makromolekule u stanju *pre-rigora* mišića, čime se smanjuje osmotska aktivnost (*Puolanne i Halonen 2010*). Sve u svemu, veoma malo se zna o ponašanju jona u mesu *post mortem*. Ipak, *Millman* (1998) je tvrdio da jonska jačina utiče na filamentalnu rešetku više od elektrostatičke sile ili naelektrisanja filamenata (*Puolanne i Halonen 2010*).

#### **2.8.4. Dodavanje soli**

U eksperimentima, naučnici često pokušavaju da imitiraju fiziološke uslove jonske jačine, koji su procenjene na oko 0,15 M. Ova jonska jačina se postiže dodavanjem ili NaCl ili KCl (*Collins et al 2007*). Kad se meso konzervira sa NaCl, NaCl može delimično biti zamenjen KCl jer je NaCl štetan po zdravlje. NaCl, međutim, ponaša se veoma različito u odnosu na KCl, što je činjenica koja se često potpuno zanemaruje. NaCl se sastoji od kosmotropskog katjona i kaotropnog anjona, dok su kod KCl, i katjon i anjon kaotropni. Tako, u skladu sa „Zakonom usklađivanja afiniteta vode“, ove dve soli utiču na ćelijske strukture proteina na sasvim drugačiji način.

Soljenjem mesa dolazi do porasta jonske jačine *post-mortem*. So difunduje kroz ultrastrukturu mesa i na kraju dospeva do sarkomere. Pitanje je koliko to utiče na preovlađujuću jonsku jačinu unutar sarkomere? Ako je najveći broj jona soli u obliku jonskih parova s različitim grupama proteina, uticaj bi mogao biti zanemarljiv. Vezivanje jona smanjuje osmotski pritisak i takođe ima uticaj na pH vrednost. Miozin i aktin se klasifikuju kao u soli rastvorljivi proteini, međutim, njihove karakteristike rastvorljivosti su veoma različite. Kad je jonska jačina slanog rastvora iznad 0.25M, debela vlakna počinju progresivno da se ugrađuju u molekule miozina. Na visokim koncentracijama (npr. 0.6M KCl), so rastvara vlakno miozina. Topljenje proteina povećava viskoznost intracelularne vode. Međutim, vlakno aktina se ne rastvara, čak i na 2.7 M NaCl (~ 13% rastvor) ni pri koncentraciji KCl-a na sobnoj temperaturi, dok je na 0 ° C, koncentracija KCl od 0.3 - 0.7 M uzrok delimične depolimerizacije aktina (*Puolanne i Halonen 2010*). Ovo podržava tvrdnju *Offera*-a i *Trinick*-a (*Puolanne i Halonen 2010*) koja ukazuje na to da dodavanje NaCl-a izaziva

depolimerizaciju debelih filamenata do molekula miozina, ali oni zadržavaju svoje unakrsne mostove vezane za filamente aktina koji se ne depolimerizuje.

Povećane jonske jačine smanjuju interakcije između aktina i miozina, u opuštenim, aktivnim i ukočenim mišićima. U sarkomeri, uočeno je da se ekstrahuje u A- i Z- segmente, što izaziva bubrenje I-segmenta i pucanje strukture M-linije. Kao što je predložio *Hamm* (1972) nasuprot *Offer*-u i *Knight*-u (1988), povećanje elektrostatičkog odbijanja između miofilamenta, širi razmak između rešetki i smanjuje intermiofibrilarni prostor (*Puolanne i Halonen 2010*).

Kad su mali komadi mesa uronjeni u koncentrovane NaCl rastvore, postoji inicijalno skupljanje koje prati bubrenje ograničeno endomizijumom. Na miofibrilarnom nivou, najveće bubrenje je pri koncentraciji oko 1 M NaCl (5,8%). *Hamm* je (1960) primetio da NaCl izaziva oticanje miofibrila ali natrijum-acetat ga ne izaziva. Tako je *Hamm* (1972) zaključio da se Cl<sup>-</sup> joni u većem stepenu nego Na<sup>+</sup> joni vezuju za miofibrile i indukuju oticanje. Na-acetat povećava sposobnost vezivanja vode manje nego NaCl, jer se acetat anjoni vezuju za proteine mišića u suštini mnogo slabije nego Cl<sup>-</sup> joni (*Puolanne i Halonen 2010*).

N-terminalni F-actin je veoma negativan i privlači katjone. Kao što je pomenuto ranije, F-actin je okružen oblakom kontra-jona koji se u fiziološkim uslovima uglavnom sastoji od K<sup>+</sup> jona. Katjoni mogu da se kreću paralelno u odnosu na osu F-aktina, ali ne pod pravim uglom. Kao negativno naelektrisan F-aktin se kompenzuje oblakom kontra-jona (*counter-ion cloud*), a slobodni anjoni su u velikoj meri isključeni. Dvovalentni joni (npr. Ca<sup>2+</sup>) vezuju se čvršće za F-aktin od jednovalentnih jona. Ca<sup>2+</sup> se vezuje za I-segment).

Mesna industrija bi mogla biti zainteresovana za manipulisanje mišićnim vlakanim pomoću različitih soli. Važno je da se ne smatra samo da F-actin i filamenti miozina imaju ukupno negativno naelektrisanje već da se ono prostire dublje u njihov aminokiselinski sastav kako bi se razumeo uticaj dodavanja soli na miofibrile. Prema *Hofmeister*-ovoj seriji, optimalna stabilizacija bioloških makromolekula može da se postigne korišćenjem soli koja se sastoji od kosmotropskih anjona i kaotropkih katjona. NaCl, se naprotiv, sastoji od kosmotropskih katjona i kaotropkih anjona. Na fiziološkoj pH vrednosti, povećanje jonske jačine ostavlja naelektrisanje tankog filamena praktično netaknuto, dok kod debelih filamenata naelektrisanje se povećava naglo ka višim negativnim vrednostima (*Puolanne i Halonen 2010*). Predložen je sledeći mehanizam za dodavanje NaCl u meso. Prema „Zakonu usklađivanja afiniteta vode“, Na<sup>+</sup> jon gradi jonski par s negativno naelektrisanim karboksilatima arginina i glutaminske kiseline u filamentu miozina. Ukoliko se grade jonski

parovi između njih,  $\text{Na}^+$  jon neutrališe negativno naelektrisanje karboksilata. Neki od  $\text{Na}^+$  jona može da bude u dipol-jon interakciji s karbonilnim grupama proteina iz osnovnog lanca. Pored toga, oni čine oblak kontra - jona oko dvostrukog heliksa negativno naelektrisanog monomera F-aktina, čime se zamenjuje fiziološki oblak  $\text{K}^+$  jona.  $\text{Na}^+$  joni grade strukturu, dok  $\text{K}^+$  joni razgrađuju strukturu. Nagomilavanje  $\text{Na}^+$ -jona oko F-aktina bi na taj način moglo da poveća količinu *LD* vode.

Predloženo je da  $\text{Cl}^-$  jon bude vezan za miofilamente čineći ih uglavnom negativno naelektrisanim, što dovodi do odbijanja molekula miozina, bubrenja filamenata miozina i, shodno tome, celog miofibrila. Takođe je predloženo da se  $\text{Cl}^-$  joni otpuštaju kad dobiju dovoljno toplotne energije, jer tada slabe veze soli, čime dolazi do oticanja. S obzirom na to da je filament miozina sagrađen od molekula miozina, rep miozina (laki meromiozin) ima mnogo pozitivno naelektrisanih strana lanca koje bi, u principu, mogle biti napadnute od strane  $\text{Cl}^-$  jona, a takođe i mnogo negativno naelektrisanih aminokiselina koje bi mogao da privuče  $\text{Na}^+$  jon.  $\text{Cl}^-$  je mali, slabo-hidratizirani kaotrop i lako gradi parove jona s pozitivno naelektrisanim kaotropnim grupama proteina, kao i s pozitivno naelektrisanim arginin, histidin, i lizin ostacima filameta miozina (*Collins 2007., Puolanne i Halonen 2010*). Pored toga, pošto kaotropi odbijaju vodu, anjonski kaotropi će biti adsorbovani na nepolarnim površinama, pa je predloženo da se  $\text{Cl}^-$  joni adsorbuju na hidrofobne aminokiselinske lance (leucin, valin i alanin) na spoljašnjoj površini filameta miozina, na nepolarne strane lanca arginina, histidina i lizina, ili s obzirom na to da je vlakno miozina verovatno šuplje, takođe i na hidrofobna jezgra i na unutrašnju površinu. Tako, bi  $\text{Na}^+$  mogao da stupi u interakciju i s filamentima aktina i sa filamentima miozina, dok bi se efekat  $\text{Cl}^-$  odnosio samo na vlakna miozina. Ukupni rezultat može da bude povećanje negativnog neto naelektrisanja za filamente miozina.  $\text{NaCl}$ , povećava rastvorljivost proteina mesa, što znači da smanjuje interakcije između dva proteina (*Puolanne i Halonen 2010*).  $\text{NaCl}$ , rastvara filamente miozina, što može da izazove adsorpciju  $\text{Cl}^-$ -jona na hidrofobne lance aminokiselina filameta miozina.  $\text{Cl}^-$  se klasifikuje kao anjonski kaotrop i, kao što je pomenuto, kaotropi teže da učine međufaznu površinu proteina i vode više hidrofilnom, što bi moglo da dovede do raspada. Raspad filameta miozina će izložiti hidrofobne aminokiseline od jezgra vlakna miozina vodi, što bi moglo da uslovljava rast količine *LD* vode. Istovremeno, kako se vlakno razlaže do odgovarajućih molekula, površina se povećava (*Puolanne i Halonen 2010*). S druge strane, nagomilavanje  $\text{Na}^+$  jona u okolini F-aktina čini međupovršinu F-aktina i vode više hidrofobnom i tako dolazi do daljeg povećanja količine *LD* vode.

Osmotski model predložen od strane *Offer*-a i *Knight*-a (*Offer i Knight 1988*) - električne sile privlače  $\text{Na}^+$  jone veoma blizu površine filameta i izazivaju osmotske sile. Sama vlakna nisu naznačena u njihovom modelu. Međutim, dodir jona će nastati putem karboksilata ako je u pitanju vlakno miozina, što neće uticati na osmozu. Ako je u pitanju filament aktina, koji će biti okružen oblakom  $\text{Na}^+$  jona, Donnan-osmotski efekat bi mogao da igra ulogu (*Puolanne i Halonen 2010*).

### 2.8.5. Površinske sile

Izgleda da postoji naznaka da površinske sile igraju ulogu u mišićnom sistemu koloidnih proteina. Da bi se dala gruba procena površine proteina koja je u interakciji sa sarkoplazmom mišićnog vlakna, mogu da se koriste sledeći proračuni. Prva pretpostavka je da su filamenti glatki cilindri, iako u stvarnosti nisu. Praktičan alat za izračunavanje oblasti površina dostupnih za vodu (ASA) za miofilamente ne postoji, jer dostupnim programi su samo za proteinske molekule poznatih sastava, a ne za proteinske agregate. Takođe, početne vrednosti su ispod proseka, i one znatno variraju u praktičnim uslovima.

Ako je razmak u rešetki  $d$  (stanje *rigora*, pH vrednost 5,6) (*Puolanne i Halonen 2010*) 37.5 nm, to će dati površine jedinica ćelije od  $1,2 \times 10^3 \text{ nm}^2$ . Pod pretpostavkom da je miofibrilarni obim od  $1 \text{ dm}^3$  (oko 1 kg) 70% mišića, a sarkomera dužine 2,5  $\mu\text{m}$ , biće  $2,3 \times 10^{17}$  jedinica ćelija sarkomere ukupno. U svakoj jedinici ćelije postoji jedno vlakno miozina. Dakle, pošto je odnos aktin:miozin 4:1, broj filamenata aktina u 1 kg mišića je  $9,2 \times 10^{17}$ . Koristeći vlakno miozina dimenzije  $16 \times 1600 \text{ nm}$  sa 600 puta  $4 \times 7 \times 17 \text{ nm}$ , S1 jedinica / vlakno, a za aktin  $6 \times 1000 \text{ nm}$ , ukupne površine filamenata aktina i miozina bi bile reda veličine  $102\,000 \text{ m}^2$ , od kojih su samo S1 jedinice miozina veličine oko  $66.000 \text{ m}^2$ . Čini se da, kad se raspravlja o zadržavanju vode u mesu, uticaji S1 jedinice su potcenjeni u odnosu na osovinu miozina i vlakno aktina. Mora da se posebno ima u vidu da je njihova izoelektrična tačka oko 6,5 odnosno da su pozitivno naelektrisani u normalnom opsegu pH vrednosti mesa.

Treba naglasiti da je ovo pojednostavljeno, pošto nije poznato šta je efikasna površina filameta dostupna za vodu. Pored toga, područje Z-linije, ostali citoskeletni proteini, vlakna ili komponente vlakana (kao što su S2 jedinice) nisu procenjeni. Ako se zrnasta struktura vlakana na koloidnom nivou, ili čak struktura raščlanjena do atoma, uzme u obzir, procenjuje se da je oblast površine dostupne za vodu mnogo veća. Šta god da je zapravo ova oblast, ona mora biti veoma velika (*Puolanne i Halonen 2010*).



Površinski napon između faza čiste vode i vazduha je  $73 \text{ mJ/m}^2$ . U neobjavljenom eksperimentu, Starr-a i Offer-a (*Puolanne i Halonen 2010*) pokazano je da površinski napon između faza kapanja vode i vazduha je  $33 \text{ mJ/m}^2$ . Nema podataka o površinskom naponu između sarkoplazme i miofilamenata, ali on mora da bude niži od prethodnih vrednosti. Dakle, promena slobodne energije, reda veličine  $\text{mJ/m}^2$ , izazvana je dodatkom soli, promenom pH vrednosti, denaturacijom itd i može da se koristi kao pokazatelj promene u zadržavanju vode. Na primer, jedna jedinica pH promene, odnosno protona od  $10^{-7}$  do  $10^{-6}$  M (u stvari iznos protona je  $50 \text{ mmol/kg}$ , zbog kapaciteta puferovanja), ili  $20 \text{ g NaCl}$  je u interakciji s međupovršinom sarkoplazme (recimo, od  $102000 \text{ m}^2$ ), i izaziva dramatične promene zapremine miofibrila. Offer i Trinick (1983) su pokazali da filament miozina nabubri, a da se jedinice lakog meromiozina otpuštaju sa osovine debelih filamenata, što uveliko povećava dostupne površine proteina. Ipak, prema Offer-u i Trinick-u (1983), molekuli miozina su i dalje vezani za filamente aktina, pa se sistem u toj fazi možda može smatrati, tzv. sudarom polielektrolita (*Puolanne i Halonen 2010*). Bilo bi korisno proučavati površinske napone miofibrilarnih slobodnih rastvora različitih pH, soli i sastojaka soli, temperature, itd, pa da se pokuša da se povežu ovi podaci s podacima površine proteina. Na kraju, malo je opisano u literaturi o kaotropnom / kosmotropskom uticaju pH na različite jone i parove jona u odnosu na sisteme mišićnih proteina i njihove promene tokom proizvodnje. Mišićni proteini takođe imaju ulogu u strukturisanju vode. S1 jedinice različitih molekula miozina su oko  $10 \text{ nm}$  udaljene, što znači da postoji veoma gusta mreža, normalna na miofibrilarnu osu u sarkomeri. Izoelektrična tačka izolovanih S1 jedinica je  $6.5$ , a samim tim S1 jedinice mogu da nose pozitivnija lokalna naelektrisanja od drugih delova vlakna u mesu ove pH vrednosti. Ovo svojstvo može da poveća afinitet hloridnih jona prema S1 jedinicama, koje mogu biti deo objašnjenja uticaja hloridnih jona na vezivanje vode (*Puolanne i Halonen 2010*). Wennerstrom (1999) takođe razmatra hidrofobne efekte kad se dve hidrofobne površine nađu zajedno. Prema Wennerstrom-u, hidrofobne sile, nisu toliko bitne, ali energija dolazi iz povećanja elektrostatičke kohezije molekula vode, kad su hidrofobni materijali udruženi. Pored toga, treba imati na umu da su miofibrilarni sistem i gelovi sagrađeni od rastvorljivih proteina triodimenzioni. U miofibrilu, udaljenost između vlakna miozina i vlakna aktina je manja od dužine stotinu molekula vode. Ima, takođe, poprečnih mostova (npr. Z-linije, aktomiozin mostovi, srednja vlakna, itd) koji povećavaju poroznost sistema. Ovo stvara dodatni problem, jer površinske sile objašnjavaju interakciju između rastvora (vode) i proteina, ali ne objašnjavaju zadržavanja najvećeg dela vode. Ako

je, na primer, jedno vlakno miozina uronjeno u rastvor, ne može da se govori o zadržavanju vode. Strukturni aspekti takođe moraju da se uzmu u razmatranje. Predloženo je da više pažnje treba posvetiti poprečnim uticajima S1 + S2 jedinice, pored uobičajenog razmatranja koje se bavi odnosom miozinska osovina – aktin filament (*Puolanne i Halonen 2010*).

## 2.9. Struktura i raspodela vode u mišićnom tkivu *in vivo*

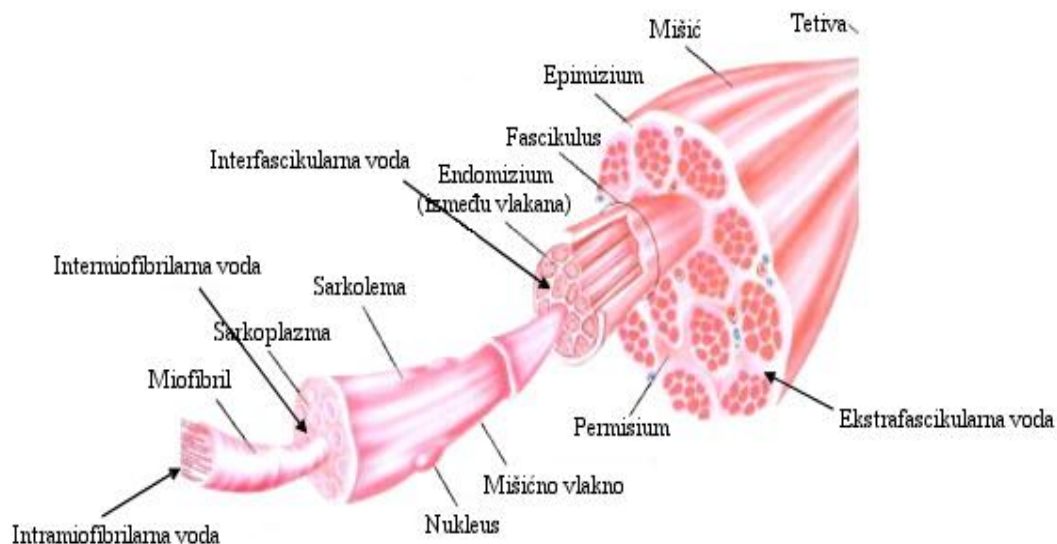
Mišićno tkivo sadrži oko 75% vode. Ostale značajne komponente uključuju proteine (oko 20%), lipide (oko 5%), ugljene hidrate (oko 1%) vitamine i minerale (oko 1% iz analize pepela). Najveći deo miofibrilarne vode, oko 85% se nalazi unutar guste miofibrilarne proteinske mreže (intramiofibrilarno), dok se 15% nalazi izvan ove mreže. Sa anatomskog gledišta voda u mišićnom tkivu je rasprostranjena u intrafibrilarnoj i ektrafibrilarnoj mreži.

Voda u intrafibrilarnoj mreži je smeštena u miofibrilarnom prostoru između debelih i tankih vlakana (filamenata)

Voda u ektrafibrilarnom prostoru nalazi se :

- u sarkoplazmi, u prostoru između miofibrila (intermiofibrilarno)
- u prostoru između mišićnih vlakana i u interfascikularnom prostoru
- u ektrafascikularnom prostoru (*Pearce et all 2011*).

Mesto i raspodela vode u anatomskim delovima mišića prikazana je na Slici 9.



**Slika 9.** Raspodela vode u anatomskim delovima mišića (*Pearce et all 2011*)

Sa biofizičkog gledišta miofibrilarna voda može da se podeli u tri osnovne grupe i to:

- 1) voda vezana za protein preko proteinskih hidrofilnih grupa-čvrsto vezana voda,

- 2) zarobljena ili nepokretna, imobilizovana voda, karakteriše je manje uređena struktura (s obzirom na elektrostatska privlačenja),
- 3) slobodna voda koju održavaju kapilarne sile i čija je molekulska orijentacija potpuno nezavisna od elektrostatskog privlačenja (*Puolanne i Halonen M. 2010*).

### **2.9.1. Voda vezana za protein**

Glavna odlika vode vezane za protein je veoma smanjena pokretljivost, što dovodi do njene nepokretnosti, zbog čvrstine veze, čak i pri upotrebi jakih mehaničkih ili fizičkih sila kao što su zamrzavanje ili grejanje (*Fennema, 1985*). Vezana voda predstavlja veoma mali deo ukupne vode prisutne u ćeliji mišića i čini oko 0.5g vode po gramu proteina. Ukupna koncentracija proteina u mišiću čini 200mg/g. Prema tome vezanu vodu čini manje od 1/10 ukupne vode mišića. Količina vezane vode se gotovo ne menja ili je njena promena veoma mala u *post-rigor* mišiću (*Huff-Lonergan i Lonergan 2005*). Vezana voda se neprekidno razmenjuje sa okolnim molekulima vode uključujući i nepokretnu vodu. (*Huff-Lonergan & Lonergan, 2005; Offer i Trinick, 1983*).

### **2.9.2. Nepokretna voda**

Ukupno 85% sadržaja vode u miofibrilama čini nepokretna, imobilizovana voda. Nalazi se u debelim filamentima i između debelih i tankih miofibrila. Imobilizirana voda je posredno preko međudejsava s čvrsto vezanom vodom u vezi s proteinom (ili drugim makromolekulima) pomoću prostornih (sternih) efekata i/ili pomoću vodoničnih mostova (*Huff-Lonergan i Lonergan, 2005, Pearce et all 2011*). Nepokretna voda se nalazi u strukturnim elementima mišića, ali nije vezana za sam protein. U ranom *post mortem* periodu nepokretna voda ne otiče slobodno iz tkiva, ali može da se otkloni sušenjem i lako se pretvara u led pri smrzavanju. Nepokretna voda je značajna u *rigor* procesu i konverziji mišića u meso. Usled strukturnih promena mišića i snižavanjem pH vrednosti može da dođe do oticanja imobilizirane vode. Za vreme pretvaranja mišića u meso (zrenje) ova vrsta vode može da bude pokretljiva zbog promene strukture mišićne ćelije i promene pH vrednosti. Neki od uzroka koji mogu da doprinesu zadržavanju nepokretne, imobilisane vode uključuju delovanje na ukupno neelektrisanje miofibrilarnih proteina i na strukturu mišićnih ćelija i njihovih delova kao i veličina ekstramiofibrilarnog prostora (*Huff-Lonergan i Lonergan 2005, Offer i Trinic, 1983*).

### **2.9.3. Slobodna voda**

Slobodna voda se nalazi u sarkoplazmatskom delu mišićne ćelije u dugačkim uskim prolazima, gde je voda povezana međusobnim unutarmolekulskom i međumolekulskim silama sa okolnom proteinskom osnovom. To je voda koja može nesmetano da ističe iz tkiva. Ova vrsta vode se ne menja u *pre-rigor* mesu, ali kasnije, menjanjem uslova, može da dođe do njeng oticanja, koje zatim omogućava promene i kretanje nepokretne, imobilisane vode. Slobodna voda je lako pokretljiva delovanjem slabih fizičkih sila pri skupljanju miofibrila do kojeg dolazi u periodu *rigor mortis*, koji je definisan kao vreme u kojem nema dostupnog ATP-a za otpuštanje miozina iz aktomiozinskog kompleksa (*Honikel 2004., Bell 1996.*).

Raspodela i pokretljivost vode prisutne u mišićima imaju veliki uticaj na osnovne karakteristike kvaliteta mesa kao što su sočnost, mekoća (nežnost), čvrstina i izgled (*Trout 1988, Huff-Lonergan & Lonergan, 2005, Pearce et al 2011*).

### **2.9.4. Post mortem proteoliza**

Nađeno je da postoji veza između stanja proteina mišićne ćelije i procesa oticanja vode, tako da su važna saznanja o činiocioma regulacije i procesu post mortem proteolize glavnih proteina mesa. U procesu *post mortem* proteolize osnovnu ulogu igraju enzimi endogenoznog kalpain (*calpain*) ( $\alpha$ - i  $\mu$ -kalpain) sistema. Supstrati ovih enzima su proteini kao što su desmin, sinemin, talin i vinkulin. Ovi proteini grade citoskeletalnu mrežu, konstrukciju mišićne ćelije. Brza proteoliza proteina intermedijarnih filamenata, kao što je desmin, povezana je sa kapacitetom vezivanja vode i mekoćom, nežnošću mesa svinja. Bitno je da se poznaje endogenozni inhibitor  $\alpha$ - i  $\mu$ -kalpaina, kalpastatin (*Huff-Lonergan & Lonergan, 2005*). Nađeno je da varijacije u genu koji kodira kalpastin, s obzirom na regulaciju aktivnosti kalpaina, doprinose razlikama u kavlitetu svinjskog mesa.

### **2.9.5. Post mortem oksidacija proteina**

Post mortem i u periodu zrenja u mišiću dolazi do značajnog povećanja procesa oksidacije miofibrilarnih proteina, što dovodi do pretvaranja nekih aminokiselinskih ostataka (histidin) a to dovodi do stvaranja intra i/ili inter disulfidnih mostova. Ovo može da dovede do inaktivacije ili modifikacije aktivnosti kalpaina. Nađena je razlika između brzine oksidacije kod različitih životinja. Do ove razlike dolazi zbog različite ishrane životinja, razlike u pasminama, ante mortem stresu i post mortem rukovanju. Razlike u načinu antioksidativne

odbrane utiču na aktivnost kaplaina pa tako i na proteolizu (*Huff-Lonergan & Lonergan, 2005*).

## **2.10. Termalna analiza hrane**

Hrana predstavlja složenu smešu vode, ugljenih hidrata, proteina, lipida i raznovrsnih komponenata. Upotreba diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) za praćenje denaturacije proteina ili želiranja skroba veoma je učestala u analiziranju hrane. Metode termalne analize se dosta koriste u proučavanjima topljenja, kristalizacije lipida, koji se pojavljuju u složenim polimorfnim oblicima koji se odlikuju složenim pojavama rekristalizacije. Ugljiko hidrati i proteini u sistemima hrane se uglavnom mešaju s vodom i odlikuju se faznim prelazima prvog reda (topljenje, kristalizacija) i prelazima stanja (denaturacija, želiranje, staklasti prelaz) (*Roos 2003*). Sve nabrojane termalne karakteristike hrane su od velikog značaja za razumevanje odnosa između fizičko-hemijskih karakteristika i promena u kvalitetu hrane. Zbog toga metode termalne analize predstavljaju važne analitičke tehnike u fizičko-hemijskoj karakterizaciji hrane i njenih komponenata (*Slade i H. Levine, 1991, Roos 2003, Roos 1995, Kalichevsky 1992, Parker et al 1996, Moates et al 2001, Talja et al 2001, Laaksonen 2002*).

Ugljeni hidrati i proteini u kontrolisanom sistemu hrane retko se nalaze u ravnotežnom stanju, te tako teže građenju amorfni, ne kristalnih struktura (*Slade i Levine 1991, Slade i Levine 1995*). Dobro su poznati primeri pečenih proizvoda, ekstrudirane hrane, dehidratiranih namirnica i smrznute hrane koje su amorfne ili delimično amorfne stanja. U ovim sistemima pri odstranjivanju vode, što predstavlja deo proizvodnog procesa, dolazi do građenja nekristalnog, amorfne stanja ugljenih hidrata i proteina. Ovakvi materijali pokazuju raznolike promene tokom vremena koje utiču na trajnost proizvoda. Njihove termalne osobine podsećaju na termalne osobine nekristalinih sintetičkih polimera (*Roos 1995*). Pokazalo se da staklasti prelazi amorfne materijala hrane prate strukturne promene hrane i njenu teksturu. Takođe je navedeno da utiču na difuziju, te tako i na brzine hemijskih i enzimskih reakcija (*Slade i Levine 1991, Slade i Levine 1995, Roos 2003*). Uopšteno gledano, amorfne strukture su daleko stabilnije u čvrstom, staklastom stanju na temperaturama ispod temperature staklastog prelaza ( $T_g$ ) (*Slade i Levine 1995*). Na temperaturama bliskim staklastom prelazu ili temperaturama ispod staklastog prelaza čvrsto stanje se pretvara u stanje superohlađene tečnosti (*Roos 1995, Roos 2003*). Na primer

dehidratisana staklasta hrana ima čvrstu i krutu konzistenciju, dok na temperaturama iznad temperature staklastog prelaza postaje gnjecava, mekana i raskvašena. Ovakve promene imaju značajan uticaj na senzorne karakteristike hrane (*Moates et al 2001*). Postoji nekoliko promena u hrani koje utiču na njen kvalitet, a javljaju se pri promeni temperature staklastog prelaza. Ove promene mogu biti lepljenje, nagomilavanje praškaste hrane i produkata koji sadrže šećere, kolaps pri sušenju smrzavanjem i rušenje dehidratisane strukture materijala, poremećaji u hrskavosti, kristalizacija amorfni šećera, rekristalizacija želatinoznog skroba, građenje leda i rekristalizacija u smrznutoj hrani i do nekog stepena neenzimsko tamnjenje i enzimske reakcije (*Roos 2003*).

Značaj metoda termalne analize u praćenju fizičko-hemijskih odlika sistema hrane veoma je porastao od kako je shvaćeno da su fizičko-hemijske odlike, što se naročito odnosi na smrznutu i na osušenu hranu koji su koncentrovani sistemi, u neposrednoj vezi s fizičkim neravnotežnim stanjem ovih materijala (*Roos 2003*). Upotreba metoda termalne analize i podaci dobijeni ovim metodama su od velike koristi za kontrolu kvaliteta hrane u samom procesu prerade kao i tokom skladištenja.

### **2.10.1. Neravnotežno stanje i prelazi neravnotežnog stanja**

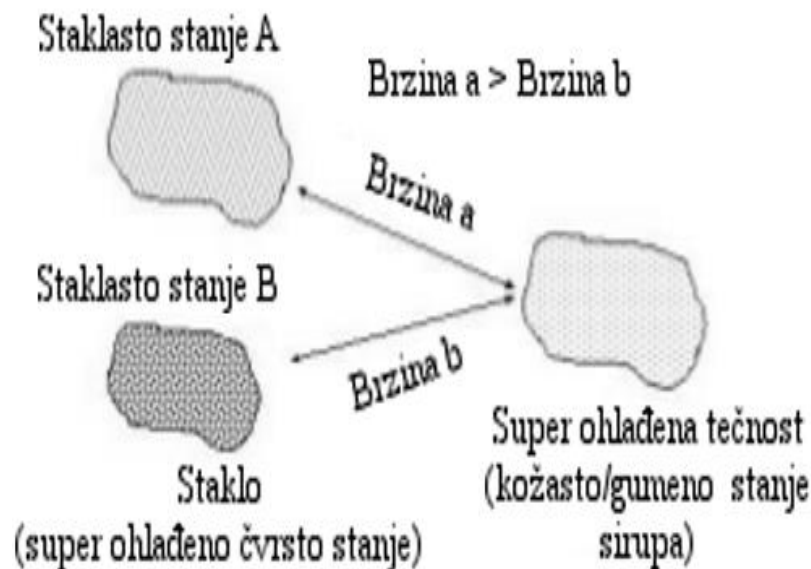
Fazni prelazi su klasifikovani prema termodinamičkim promenama koje se odvijaju na temperaturama prelaza (*Roos, 1995*). Fazne prelaze prvog reda odlikuje prekid prvog izvoda termodinamičke funkcije. Tako na primer, na temperaturi prelaza postoji prekid (diskontinuitet) toplotnog kapaciteta i koeficijenta termalne ekspanzije. Tipični primeri prelaza prvog reda su oni koji se odvijaju između tri osnovna stanja materijala, gasnog, tečnog i čvrstog stanja. Na temperaturama faznih prelaza drugog reda postoji stepenasta promena u osobinama koje su u diskontinuitetu kod prelaza prvog reda. Na primer, amorfni materijal ima promenu toplotnog kapaciteta pri staklastom prelazu i stoga ova promena stanja ima neka termodinamička svojstva tipična za prelaze drugog reda. Staklasti prelaz je osobina sistema koji nije u ravnoteži, tj. neravnotežnog sistema. Zbog toga ovaj prelaz ne može da bude označen kao pravi fazni prelaz.

Amorfne i delimično amorfne strukture u hrani nastaju pri preradi hrane u momentu kad se na primer odstranjuje voda pri pečenju, koncentrovanju, dehidrataciji, smrzavanju i ekstruziji (*Roos, 1995*). Ovi superohlađeni, amorfni neravnotežni materijali vremenom trpe promene približavajući se ravnotežnom stanju, kao što je, na primer, kristalno stanje. Nadalje u zavisnosti od brzine otklanjanja rastvarača ili hlađenja do čvrstog stanja, gradi se staklasto

stanje. Staklasto stanje sreće se i u hrani s niskim procentom vlage, dehidratiranoj ili smrznutoj hrani u kojima se formira koncentrovana faza rastvorka pri zamrzavanju tj. u vremenu stvaranja leda u materijalu. Čiste komponente hrane kao što su amorfni šećeri, pokazuju uglavnom jedan staklasti prelaz koji može da se vidi upotrebom raznih analitičkih tehnika kao što su mehanička, termalna ili neka od spektroskopskih tehnika (Roos, 1995).

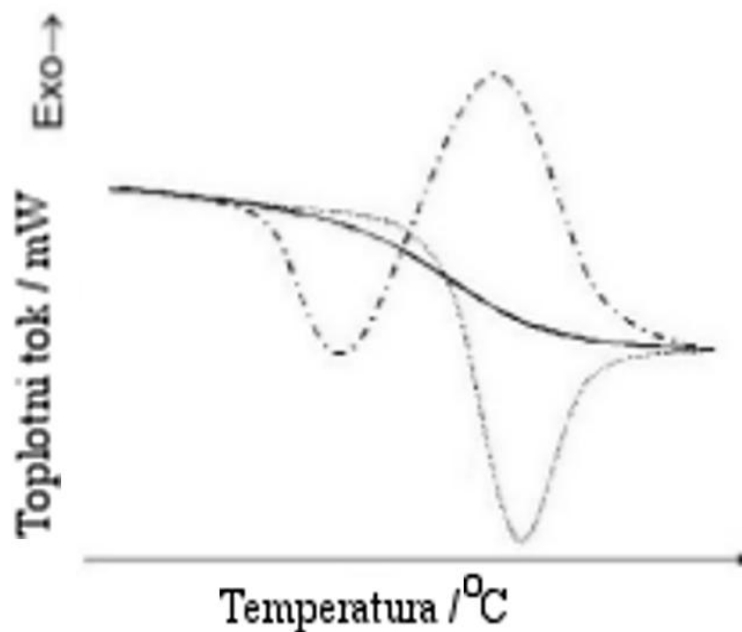
Na Slici 9. dat je šematski prikaz uticaja brzine hlađenja na staklasta svojstva.

Česta pojava u stvarnim sistemima hrane je da su komponente hrane delimično amorfne (ugljeni hidrati kao što su škrob i šećeri i proteini) te su mnoge komponente delimično ili nisu uopšte mešljive te tako dolazi do stvaranja nekoliko faza u mikrostrukturi hrane.



**Slika 10.** Šematski prikaz uticaja brzine hlađenja na staklasta svojstva. Velike brzine hlađenja izazivaju staklasto stanje sa relativno velikom slobodnom zapreminom i velikom entalpijom (Roos, 2003).

Staklasti prelaz se dešava i pri hlađenju i pri grejanju, te takođe pri otklanjanju ili sorpciji plastifikatora, ili rastvora ili oboje. Kao prelaz stanja i zbog neravnotežne prirode amorfne faze, staklasti prelaz zavisi od vremena. Zbog toga metode koje koje koriste različite eksperimentalne vremenske skale (npr. frekvenciju) daju različite temperature i mesta staklastog prelaza. U zavisnosti od brzine nastajanja staklastog stanja i moguće promene s vremenom samog staklastog stanja (starenje), različite relaksacije mogu da se zabeleže u za posmatrani staklasti prelaz Slika 10. (Roos, 2003).



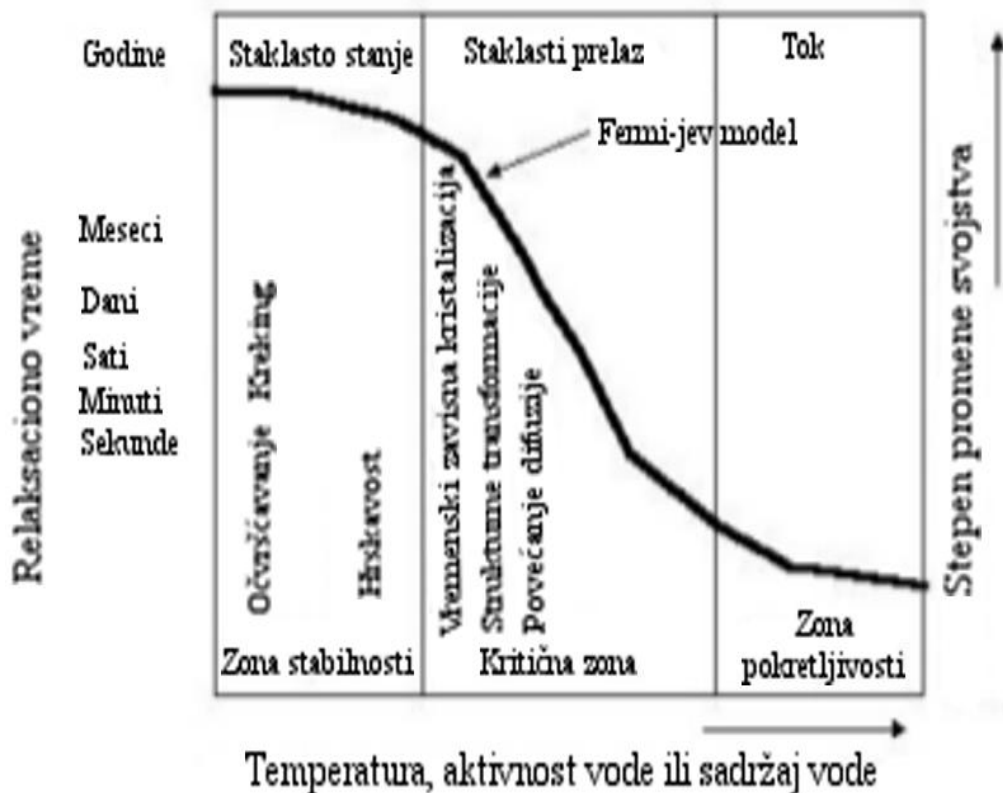
**Slika 11.** Entalpijska relaksacija amornog materijala pri staklastom prelazu.

Vidljiva je egzoterma za staklasto stanje sa velikom slobodnom zapreminom i velikom entalpijom, dok je kod materijala kojima je potrebna toplota da bi pretrpeli prelaz u superohlađenu tečnost vidljiva endoterma (Slika 11.) (Roos, 2003).

### 2.10.2. Staklasti prelaz i plastifikacija vodom

Staklasti prelaz se obično dešava na temperaturema od oko 10-150°C ispod temperature topljenja komponente, što je primenljivo na šećere (Roos 1993). Ove promene viskoziteta i karakteristika tečljivosti utiču na lepljivost i zgrudvavanje prahova, hrskavost i kristalizaciju i rekristalizaciju čvrstih amorfnih i rekristalizaciju leda u smrznutom sistemu (Roos 1993). Jedan od osnovnih uzroka za ove promene je smanjeno relaksaciono vreme mehaničke promene kao što je prikazano na Slici 12. (Roos, 2003).





**Slika 12.** Uticaj temperature, aktivnosti vode ( $a_w$ ) ili sadržaja vode na relaksaciono vreme i na relativne brzine mahaničkih promena amorfno biološkog materijala (Roos, 2003).

Uz promene mehaničkih osobina vezanih za staklasti prelaz, navodi se da staklasti prelaz može da utiče na brzine reakcija koje su kontrolisane difuzijom u amorfnom sistemu hrane. Ovaj uticaj je nezavisan od temperature, pH i koncentracije reaktanta i proizvoda (Roos, 1995, Roos, 2003). Reaktanti i molekuli amorfne osnove hrane mogu da grade zasebne faze i da izazovu podjelu i kretanje vode, tako utičući na lokalne reakcije u mikrostrukturi hrane. Može da se zaključi da su molekulska kretanja u staklastom stanju ograničena na molekulske vibracije i rotacije u homogenom sistemu hrane na isti način kao i u homogenom sintetičkom polimeru dok se u stanju superohlađene tečnosti pojavljuje translatorska pokretljivost. Hrana je veoma heterogen sistem i pokretljivost njenih molekula može da bude daleko ispod zabeleženih makroskopskih ili uobičajenih temperatura staklastih prelaza. Izučavanja delovanja staklastog stanja sistema hrane na brzinu reakcije pokazala su da staklasti prelaz može da deluje na difuziju i posredno na brzinu reakcija, posebno na reakcije neenzimskog tamnjenja. Shodno tome, brzine reakcija mogu da se značajno povećaju na temperaturama iznad staklastog prelaza, ali može da se dogodi i reakcija ispod merenog makroskopskog

staklastog prelaza. To zavisi od drugih činilaca koji utiču na brzine reakcija kao što su koncentracije reaktanata, pH, temperatura i sadržaj vode (Roos, 2013).

Termalne osobine hrane su važne za razumevanje odnosa između svojstava hrane i promena u kvalitetu hrane. Koncentrovani sistemi hrane (hrana s niskim procentom vlage i smrznuta hrana) retko se nalaze u stanju ravnoteže, te imaju težnju da grade amorfne, tj. nekristalne strukture. Promene koje su vezane za staklasti prelaz u takvim namirnicama mogu značajno da utiču na stabilnost, npr: lepljivost i stvrdnjavanje prahova, na svežinu i hrskavost grickalica i cerealija (pahuljica žitarica) za doručak, kristalizaciju amorfni šećera, na rekristalizaciju skrobnog želea, na građenje leda i rekristalizaciju smrznute hrane i na brzinu ne-enzimskog tamnjenja i enzimske reakcije. Odnosi između staklastog prelaza, vode i uticaja vode na plastifikaciju i relaksaciono vreme može da se prikaže u dijagramima stanja. Dijagrami stanja su korisni kao mape stabilnosti u kontroli i praćenju brzina promena pri preradi i skladištenju hrane (Rahman et al 2003, Rahman 2006, Sablani et al 2009, Shi et al 2009, Shi et al 2012).

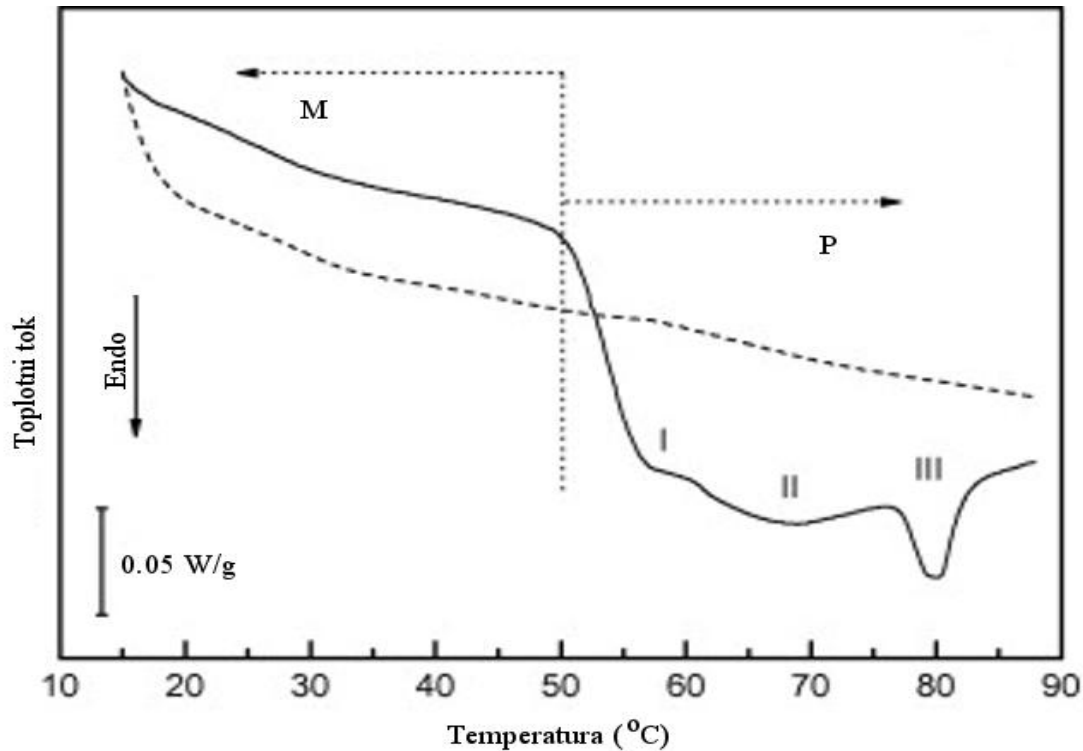
Metode termalne analize daju makroskopski uvid i podatke o faznom stanju i faznim prelazima u hrani i u biološkim sistemima. Međutim, ove tehnike ne daju saznanja o heterogenosti mikrostrukture hrane ili bioloških uzoraka. Postoje dopunske tehnike koje je mogu da se upotrebe kako bi se dobio potpuniji uvid i razumevanje o svojstvima amorfni materijala hrane (Cordela et al 2002). Posebno je bitno saznanje o mestimičnoj mikrostrukтури, promenama i stanjima i interakcijama vode kao i o faznim razdvajanjima i uticajima fazni razdvajanja na promene stabilnosti i kinetičke promene amorfni sistema.

### **2.10.3. Termalna analiza mesa**

#### **2.10.3.1. Sveže meso**

Prednost diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) je u tome što mogu da se analiziraju složene mešavine proteina velikih koncentracija, što je slučaj kod mesa. Na tipičnoj DSC krivoj mišićnog tkiva mogu da se uoče tri osnovna endotermna termalna prelaza (Slika 13). Prvi prelaz s temperaturnim maksimumom između 54-58°C predstavlja termalnu denaturaciju miozina (Kawakami et al 1971, Martens & Vold, 1976; Wright 1984, Kono 1992, Markov et al 2010, Liu 2014). Drugi prelaz koji ima temperaturni maksimum između 65 i 67°C odgovara termalnoj denaturaciji kolagena (Martens & Vold, 1976; Stabursvik & Martens 1980, Bozec 2011) i sarkoplazmatskih proteina (Stabursvik 1980, Xiong 1987). Treći prelaz je termalna denaturacija aktina koja se odvija u temperaturnom opsegu od of

80°C do 83°C. Za drugi prelaz je pokazano da oba izolovana proteina aktomiozin i miozin i njihove podjedinice imaju termalnu denaturaciju u istom temperaturnom području. Proučavanja termalne denaturacije titina svinjskog i goveđeg mesa DSC analizom pokazala su da denaturacija ovih proteina predstavlja jedinstven endotermni pik s temperaturnim maksimumom prelaza na temperaturi od on 78.4°C za goveđe meso i 75.6 °C za ove proteine iz svinjskog mesa (Ding, 2014).



**Slika 13.** Tipična DSC kriva svežeg mesa sa: M- temperaturni opseg topljenja masti; P- temperaturni opseg denaturacije proteina: tri endotermna prelaza koja odgovaraju I- denaturaciji miozina; II- denaturaciji proteina sarkoplazme i kolagena; III- denaturaciji aktina (Fernandez-Martín et al 2009).

Proučavanja proteina rastvornih u solima (*SSP salt soluble proteins*, miofibrilarnih proteina) pokazala su da do protein-protein interakcija i geliranja dolazi u temperaturnom opsegu od 36-40°C, bez obzira na anatomske razlike i porekla mišića (Tornberg 2013). Ova istraživanja su vršena merenjem turbiditeta i merenjem krutosti (Boyer 1996, Sun i Holley 2011). Markov i saradnici (Markov et al 2010) su upotrebom DSC i DLS (*dynamic light scattering- dinamičko rasejavanje svetlosti*) metoda analizirali agregaciju dve S1 izoforme miozina.

Pokazali su da brzina procesa agregacije ne zavisi od koncentracije proteina, te da je stepen agregacije ograničen ireverzibilnom denaturacijom proteinskog domena.

### **2.10.3.2. Tehnološki obrađeno meso**

Visoki zahtevi kupaca prehrambenih proizvoda odnose se na garancije visokog kvaliteta, kao i na sigurnost proizvoda za vreme termalnih procesa koji su nezaobilazni u prehrambenoj industriji (*Ishiwatari et al 2013*). Činioci koji određuju kvalitet prehrambenih proizvoda, pa i proizvoda od mesa su njihova tekstura, kapacitet vezivanja vode kao i ukus i miris. Kako bi se održao visoki kvalitet i s obzirom na očuvanje odlika funkcionalne hrane (biološke, nutritivne vrednosti) i s obzirom na tehnološka svojstva proizvoda, neophodna je odgovarajuća kontrola termičkih procesa radi očuvanja i poboljšavanja ovih svojstava.

Tehnološkom obradom meso - proteini mesa trpe različite uticaje spoljašnje sredine kao što su jonska jačina (NaCl), temperatura obrade, pritisak, prisustvo aditiva. Nađeno je da primena pritiska pri preradi mesa može da izazove značajnu denaturaciju proteina mesa i pri nenedenurišućim, niskim temperaturama, a u nekim slučajevima može da značajno smanji procenat denaturacije pri tretmanu na temperaturama denaturacije (*Fernandez-Martin et al 2000*). Pokazano je da je za razumevanje složenih reoloških odlika obrađenog mesa od najvećeg značaja saznanje o stepenu denaturacije tretiranih proteina tj. saznanje o prisustvu proteina u prirodnom stanju (*native-like proteins*) koji su preostali posle prerade (*Fernandez-Martin et al 2000*). Odgovarajući modeli, kao što su kinetički modeli su veoma korisni jer omogućavaju da se predvide i opišu moguće promene. Uticaj stepena denaturacije proteina mesa na njegovu teksturu i druge bitne karakteristika kao što su gubitak mase, promene boje, bile su predmet mnogih radova. Ove studije se bave kinetičkom analizom promena koje se dešavaju u hrani od mesa za vreme termalnog tretmana i sušenja mesa. Definisane su promene teksture vezane za stepen denaturacije proteina mesa za vreme grejanja (*Ishiwatari 13, Bertola et al. 1994*), gubitak mase mesa za vreme kuvanja (*Bertola et al. 1994, Garcia-Segovia et al. 2007*), promene boje ribljeg mesa pri pečenju (*Nakamura et al. 2011, Mastuda et al. 2013*) i promene "umami" komponente mesa pri kuvanju (*Ishiwatari et al. 2011*).

Rezultati dobijeni u ovim radovima korišćeni su u empirijskim kinetičkim modelima kako bi se opisala tekstura i gubitak mase. Ove empirijske jednačine su odlične u praktičnoj primeni ali treba naglasiti da je njihova primena ograničena s obzirom na to da kinetički parametri mogu da zavise od uslova zagrevanja (*Ishiwatari, 2013*). Kinetička analiza denaturacije

proteina je prihvatljiva pošto denaturacijom proteina dolazi do promena u teksturi mesa i gubitka mase za vreme termalnog procesa. *Ishiwatari i saradnici (Ishiwatari et al 2013)* su u svom radu pokazali u makro sistemu mesa postojanje kuantitativne zavisnosti između stepena denaturacije i kvaliteta mesa, tj. njegove teksture i stanja vode. U ovom radu proučavani su uticaji stepena denaturacije proteina na teksturu mesa i stanje vode. Kao prvo, definisani su kinetički parametri denaturacije proteina mesa korišćenjem DSC metode. Prema dobijenim rezultatima kinetičke analize DSC metodom, pripremljeni su uzorci mesa sa definisanim stepenom denaturacije zbog tretiranja uzoraka na određenim temperaturama u određenom vremenskom periodu. Na taj način dobijeni su uzorci sa određenim stepenom denaturacije miozina i aktina. Uzorci su podvrgnuti analizi teksture i magnetnoj rezonanci ( $^1\text{H}$  MRI). Nađeno je da je uticaj denaturacije miozina na modul elastičnosti zanemarljiv, kao i na gubitak mase. Pokazalo se da je denaturacija aktina imala veliki uticaj na povećanje modula elastičnosti i na gubitak mase uzoraka mesa. Rezultati MRI su pokazali da do promene stanja dolazi u samom početku denaturacije što je u suglasnosti s nađenim gubitkom mase.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Materijali i metode

##### 3.1.1. Svinjsko meso *Longissimus dorsi*

Sveže svinjsko meso (*Longissimus dorsi*), 48h *post mortem*, nabavljeno je u mesari u Novom Sadu, očišćeno je od spoljne, vidljive masnoće i vezivnog tkiva i isečeno u komade veličine (1x1x1) cm.

Osnovni hemijski sastav svinjskog mesa *Longissimus dorsi* (vlaga, proteini, pepeo i masti) određen je pomoću standardnih metoda:

- Određivanje sadržaja vode (suve materije) na osnovu standarda *SRPS ISO 1442:1998*, Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja vlage (Referentni metodi);
- Određivanje sadržaja proteina na osnovu standarda *SRPS ISO 1871:1992*, Poljoprivredno-prehrambeni proizvodi - Opšta uputstva za određivanje azota metodom po Kjeldalu;
- Određivanje sadržaja ukupnog pepela na osnovu standarda *SRPS ISO 936:1999*, Meso i proizvodi od mesa - Određivanje ukupnog pepela;
- Određivanje sadržaja ukupne masti na osnovu standarda *SRPS ISO 1443:1992*, Meso i proizvodi od mesa. Određivanje sadržaja ukupne masti

Određeni osnovni hemijski sastav svežeg svinjskog meso (*Longissimus dorsi*) korišćenog, u ovom radu, za osmotsku dehidraciju bio je : vlaga 75.6%, proteini 21.7%, , ukupne masti 1.3%, ukupni pepeo 1.2%.

##### 3.1.2. Osmotska dehidracija svinjskog mesa u melasi šećerne repe i osnovni hemijski sastav melase šećerne repe

Postupak osmotske dehidracije izvršen je na Tehnološkom fakultetu, Univerzitet u Novom Sadu po proceduri opisanoj u radu *Šuput et al 2013*. Osmotska dehidracija je izvršena u eksperimentalnom pilot postrojenju za diskontinualnu osmotsku dehidraciju, koje je projektovano i konstruisano na Tehnološkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu za potrebe naučnog projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije TR20112 (2008-2011) (*Lević et al 2009*).

Sveže svinjsko meso (*Longissimus dorsi*), 48h *post mortem*, je očišćeno od spoljne masnoće i vezivnog tkiva i isečeno u komade veličine (1x1x1) cm, zatim je izvršena osmotska dehidracija pomoću melase šećerne repe (koncentracije suve rastvorne mase  $80 \text{ kg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) koja

je nabavljena iz domaće šećerane (Crvenka). Dehidracija je izvršena pri temperaturi od 22°C u vremenu od 5 sati. Odnos osmotskog rastvora prema mesu je bio 5:1 (w/w). Posle završene osmotske dehidracije meso je spakovano u folije (providne folije sastava PVC//PE–EVOH-PE) u atmosferi gasa 30%CO<sub>2</sub>+70%N<sub>2</sub>. (Šuput et al 2013.). Uzorci su analizirani (DSC, TGA) nakon 7, 15, 30, 45 i 60 dana.

Za potrebe eksperimenta, melasa šećerne repe nabavljena je iz šećerane u Crvenki, Srbija, i do upotrebe čuvana je u zatvorenim plastičnim posudama na sobnoj temperaturi. Prosečan sadržaj suve materije u melasi, određen refraktrometrom, iznosio je 84,54%.

U tabeli 3.1 prikazan je osnovni hemijski sastav melase šećerne repe primenjene u eksperimentima. Kako bi se postigle željene koncentracije osmotskog rastvora melasa je razređivana destilovanom vodom (Lončar 2014.).

**Tabela 3.** Osnovni hemijski sastav melase šećerne repe primenjene u istraživanju (Lončar 2014.)

Sadržaj	
Suva materija, (%)	84,54
Saharoza, (%)	49,79
Ukupni redukujući šećeri, (%)	52,23
Invertni šećer, (%)	0,49
Kalijum, mg/100g	2399,76
Natrijum, mg/100g	446,21
Kalcijum, mg/100g	266,31
Magnezijum, mg/100g	56,39
Gvožđe, mg/100g	4,41
Zink, mg/100g	0,98
Mangan,mg/100g	0,22

### 3.1.3 Rehidracija osmotski dehidratiranog svinjskog mesa

Process rehidracije osmotski dehidratiranog svinjskog mesa izvršen je na temperaturama 20°C, 30°C, 40°C i u različitim vremenima rehidracije koja su iznosila za svaku temperaturu 15, 30, 40 i 60 min.

Komadi dehidratiranog mesa su uranjani u dejonizovanu vodu, držani na određenoj temperaturi u zadanom vremenu. Posle 15, 30, 40 i 60 min rehidracije, na zadanim temperaturama, izvršena je termalna analiza (DSC i TGA) uzoraka. Procenat rehidracije (R) izračunat je po sledećoj jednačini (Babić et al 2009):

$$R = \frac{W_r - W_f}{W_0 - W_f} \times 100 \quad (4)$$

gde je  $W_r$  masa rehidratiranog uzorka (g);  $W_f$  masa osmotski osušenog uzorka (g);  $W_0$  masa svežeg uzorka (g).

Peleg-ov (Peleg, 1988) model je korišćen za modelovanje procesa rehidracije. Pelegov model je dvoparametarski model koji opisuje sorpcione krive vode.

$$X_t = X_0 \pm t / k_1 + k_2 t \quad (5)$$

gde je:  $X_0$  početni sadržaj vode izražen u odnosu na suhu masu u (kg vode) (kg s.m.)<sup>-1</sup>

$X_t$  sadržaj vode u vremenu  $t$  (min)

$k_1$  Pelegova konstanta brzine izražena u min (kg s.m.) (kg vode)<sup>-1</sup> koja se odnosi na prenos mase i na brzinu na samom početku rehidracije ( $t = t_0$ ),

$k_2$  je Pelegova konstanta kapaciteta izražena u (kg s.m.) (kg vode)<sup>-1</sup> koja se odnosi na maksimalnu apsorpciju vode.

Kada  $t \rightarrow \infty$  dobija se jednačina

$$X_e = X_0 \pm 1 / k_2 \quad (6)$$

Gde je  $X_e$  ravnotežni sadržaj vode ((kg vode) (kg s.m.)<sup>-1</sup>) u vremenu  $t \rightarrow \infty$ .

“±” je “-” pri dehidraciji ili “+” pri rehidraciji.

## 3.2. Metode termalne analize

### 3.2.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Priprema uzoraka

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija uzoraka svežeg i osmotski dehidratiranog mesa urađena je na instrumentu DSC Q 1000, diferencijalni skenirajući kalorimetar,

*TA Instruments, New Castle, Delaware, USA, sa TA Instruments RCS* sistemom hlađenja.

Temperatura i entalpija instrumenta je kalibrisana po standardnom uputstvu proizvođača pomoću metala indijuma čija je tačka topljenja  $T=156.59^\circ\text{C}$ , i entalpija topljenja  $\Delta H=28.18$



J/g (*Della Gtta et al 2006*). Sva snimanja su urđena u struji azota čistoće 99.999% pri brzini protoka gasa od 50 ml/min u DSC ćeliji i 60 ml/min pri termogravimetrijskoj analizi.

Uzorci svežeg i osmotski dehidratisanog mesa, izmerene mase 9-13mg na analitičkoj vagi *Metler Toledo AE 163, Toledo AE 163*, snimani su u otvorenim aluminijumskim ćanćićima i u hermetički zatvorenim aluminijumskim ćanćićima proizvođaća *TA Instruments*. Hermetičko zatvaranje ćanćića izvršeno je pomoću prese za zatvaranje ćanćića *Blu press* proizvođaća *TA Instruments*.

DSC analiza uzoraka rehidratisanog osmotski dehidratisanog svinjskog mesa, mase 9-13mg, provedena je u otvorenim aluminijumskim ćanćićima proizvođaća *TA Instruments*.

Temperaturski opseg snimanja u otvorenim ćanćićima iznosio je od -90°C do 120°C i brzina grejanja Hr=5°C/min.

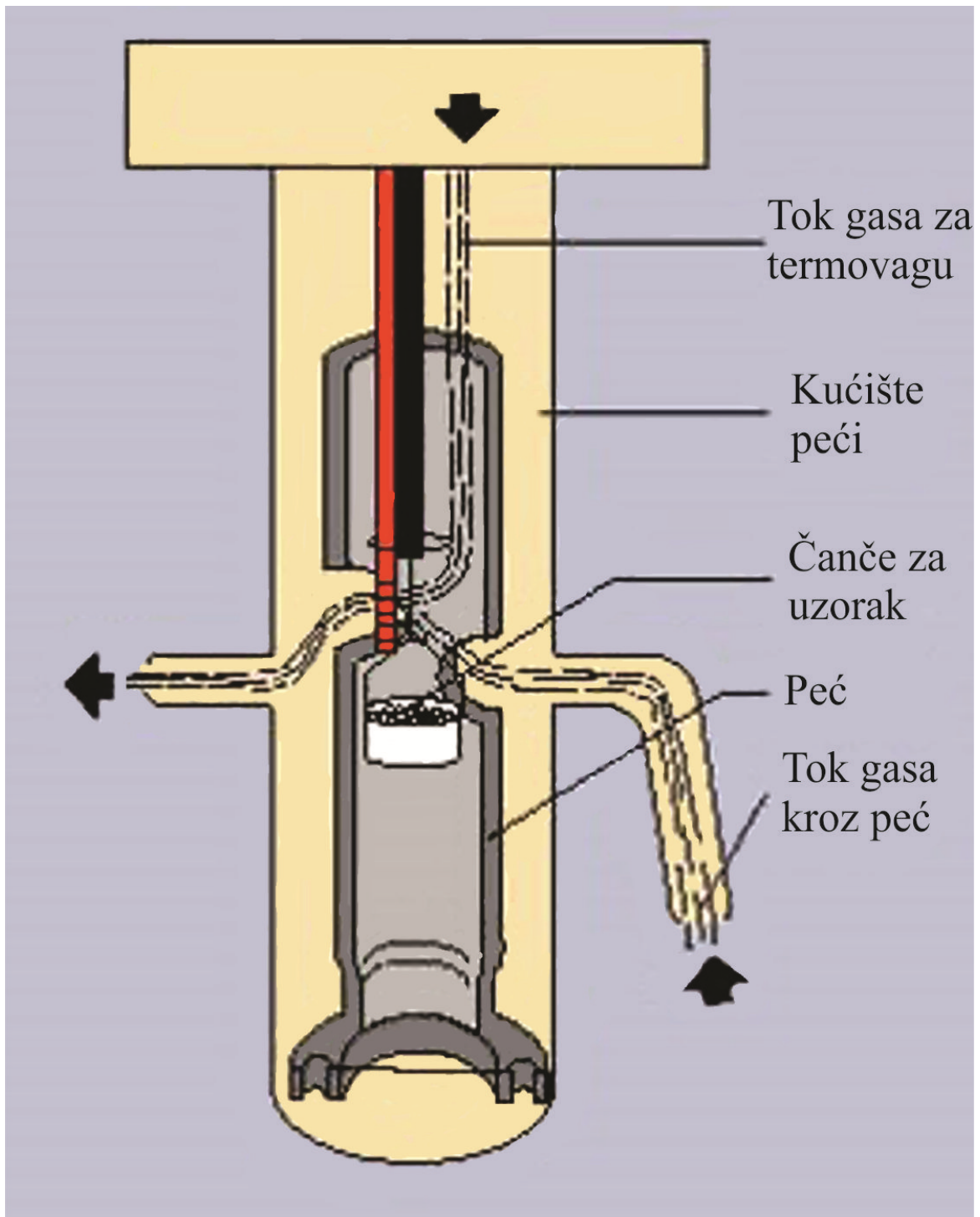
Temperaturski opseg snimanja u hermetički zatvorenim ćanćićima iznosio je od 5°C do 120°C pri brzini grejanja Hr=5°C/min. Posle prvog grejanja snimano je drugo grejanje istog uzorka pri istim uslovima.

Za određivanje kinetičkih parametara termalne denaturacije proteina mesa uzorci su zatvarani u hermetičke ćanćiće i snimani u temperaturskom opsegu od 5°C do 120°C pri različitim brzinama grejanja. Za uzorke svežeg mesa snimani su brzinama grejanja: Hr=0.5°C/min, Hr=1°C/min, Hr=1.5°C/min, Hr=2°C/min, Hr=3°C/min, Hr=5°C/min, Hr=7.5°C/min, Hr=10°C/min, a za uzorke osmotski dehidratisanog mesa brzine snimanja su iznosile Hr=0.5°C/min, Hr=1°C/min, Hr=1.5°C/min, Hr=2°C/min, Hr=3°C/min, Hr=5°C/min, Hr=7.5°C/min, Hr=10°C/min.

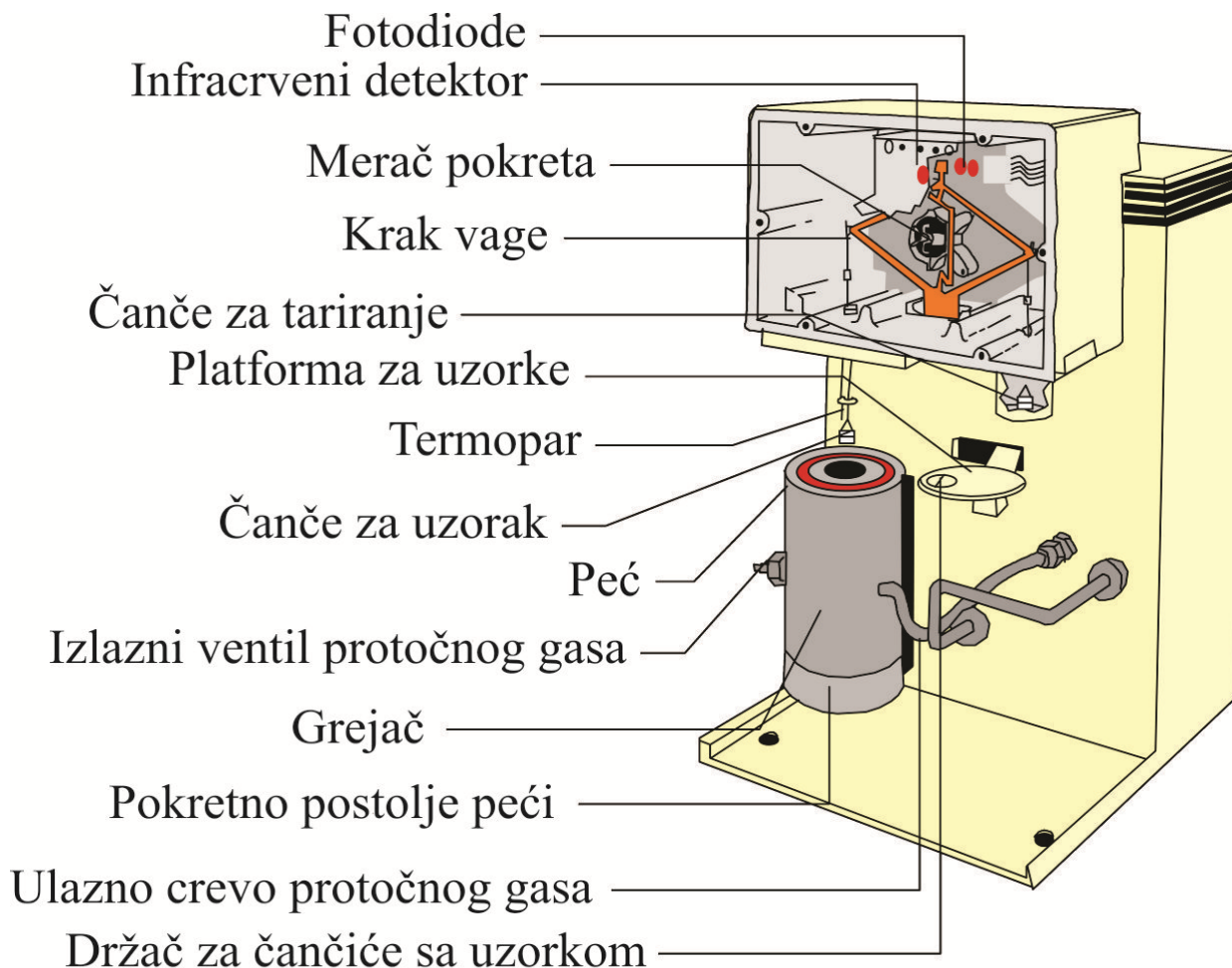
Uzorci melase šećerne repe pre osmotske dehidratacije i posle osmotske dehidratacije, kao i osušene melase (ostatak na 105°C) snimani su u temperaturskom opsegu od -90°C do 60°C u tri ciklusa: grejanje 90°C do 60°C, Hr=10 °C/min, hlađenje 60°C do (-90°C), Hr=5°C/min i ponovno grejanje 90°C do 60°C, Hr=10 °C/min. Masa uzorka melase iznosila je 5-6 mg, a snimanja su izvršena u hermetički zatvorenim aluminijumskim ćanćićima.

Dobijene DSC krive obrađene su u specijalizovanom programu za obradu DSC krivih *TA Universal analysis 2000*. dobijenom od proizvođaća opreme *TA Instruments*.





**Slika 15:** Šematski prikaz TGA peći instrumenta TA Q500.



**Slika 16:** Šematski prikaz instrumenta TGA Q500, TA

### 3.2.3. Modulovana diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (MDSC)

Modulovana diferencijalna skenirajuća kalorimetrija uzoraka osmotski dehidratisanog mesa i melase urađena je na instrumentu *DSC Q1000* diferencijalni skenirajući kalorimetar, *TA Instruments*, *New Castle, Delaware, USA*, sa *TA Instruments RCS* sistemom hlađenja, pri modulovanim uslovima rada instrumenta. Kalibracija instrumenta na temperaturu, entalpiju i toplotni kapacitet izvršena je po standardnoj proceduri proizvođača za modulovane uslove rada instrumenta pomoću metala indijuma čija je tačka topljenja  $t=156.5985^{\circ}\text{C}$ , entalpija topljenja  $\Delta H=28.18 \text{ J/g}$  i pomoću safira. Sva snimanja su sprovedena u struji azota čistoće 99.999% pri brzini protoka gasa od 50 ml/min u DSC ćeliji.

Uzorci osmotski dehidratisanog, mesa izmerene mase 9-13 mg na analitičkoj vagi *Metler* snimani su u hermetički zatvorenim aluminijumskim čančicama proizvođača *TA Instruments*.

Hremetičko zatvaranje čančića izvršeno je pomoću prese za zatvaranje čančića *Blu press* proizvođača *TA Instruments*.

MDSC analiza uzoraka osmotski osušenog mesa izvršena je u temperaturskom opsegu od -90°C do 120°C, pri modulacijama temperature od  $\pm 0.5^\circ\text{C}$  u vermenskom periodu od 60s pri brzini grejanja 2C/min.

Uzorci melase šećerne repe pre osmotske dehidracije i posle osmotske dehidracije, kao i osušene melase (ostatak na 105°C) snimani su u temperaturskom opsegu od -90°C do 60°C u tri ciklusa: grejanje 90°C -60°C, Hr=10 °C/min, hlađenje 60°C-(-90°C), Hr=5°C/min i ponovno grejanje 90°C -60°C, Hr=10 °C/min. Masa uzorka melase iznosila je 5-6 mg, a snimanja su izvršena u hermetički zatvorenim aluminijumskim čančićima. Vлага melase je određena standardnom metodom JUS ISO 1442: 1997.

MDSC analiza uzoraka izvršena je u temperaturskom opsegu od -90°C do 60°C, pri modulacijama temperature od  $\pm 0.8^\circ\text{C}$  u vermenskom periodu od 60s pri brzini grejanja Hr=5°C/min.

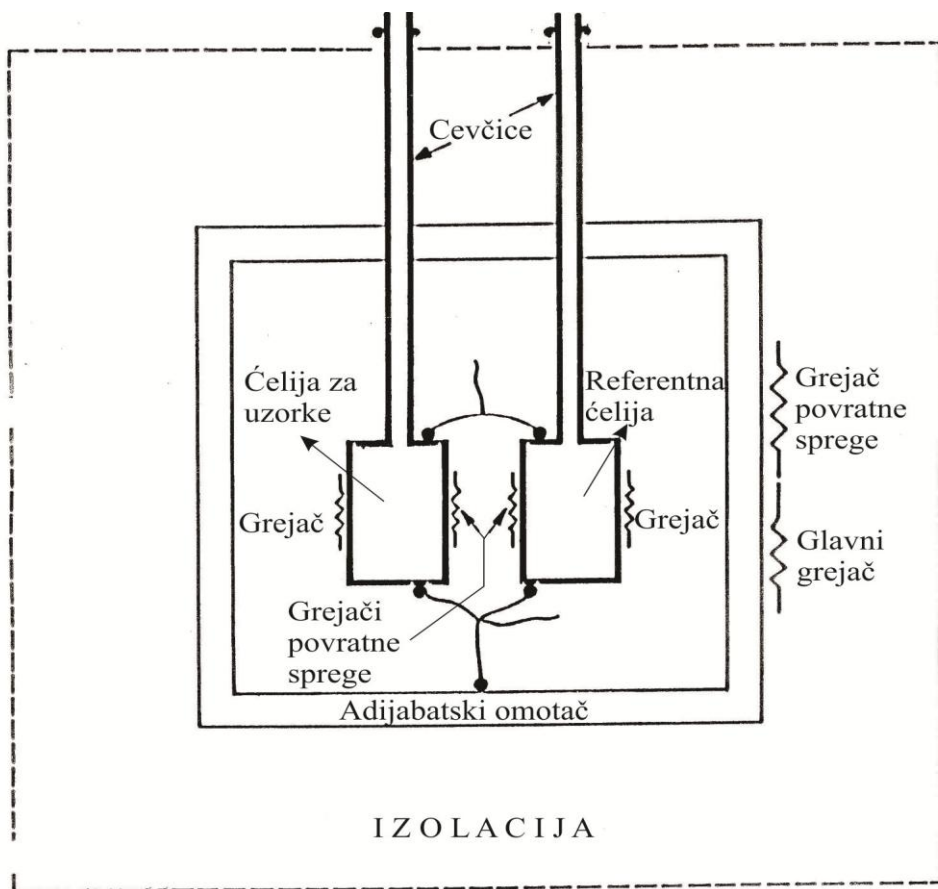
Dobijene MDSC krive obrađene su u posebnom programu za obradu DSC krivih *TA Universal analysis 2000* dobijenom od proizvođača operme *TA Instruments*

### **3.2.4. Diferencijalna skenirajuća mikro kalorimetrija (mikro DSC)**

Mikrokalorimetrijska DSC analiza proteina albumina goveđeg seruma (*bovine serum albumin*, BSA čistoće 98%, Frakcija V, nabavljenog od *Boehringer Mannheim* Nemačka) koncentracije 3mg/ml u dejonizovanoj vodi i u rastvorima različitih koncentracija cinkove soli  $\text{ZnCl}_2$  ( $\text{ZnCl}_2$  p.a. nabavljen je od *Merck-Alkaloid*, Skopje) koje su iznosile: 0.05 mM, 0.300 mM, 0.450 mM, 1mM i 20 mM, podešen pH=6.2, uradjena je na diferencijalnom skenirajućem kalorimetru tipa MC2 DSC proizvođača *Micro Cal, Northampton MA, USA*. Ono što ovaj kalorimetar čini posebno osetljivim jeste način toplotnog izolovanja ćelije sa uzorkom i referentne ćelije. Obe su smeštene u adijabtsku komoru od aluminijuma koja se, takođe, zagreva posebnim grejačima. Temperaturski opseg snimanja je bio od 20°C do 100°C, pri brzini grejanja Hr= 1.5°C/min. Svi rastavori su degazirani pre snimanja kako bi se onemogućilo stvaranje mehurića rastvorenog vazduha tokom zagrevanja u ćeliji instrumenta. Instrument meri adsorbovanu toplotu pri termalnoj denaturaciji proteina (ili nekih drugih bioloških molekula prisutnih u rastvoru) koja prelazi iz native, biološke konformacije, strukture u denaturisanu inaktivnu strukturu. Protein smešten u ćeliju kalorimetra pri grejanju od 20°C do 100°C prolazi kroz endotermni proces razmotavanja (*unfolding*), što se pokazuje

na DSC krivoj kao promena toplotnog kapaciteta ( $C_p$ ). Temperaturski maksimum ove promene, vrh pika  $T_m$ , predstavlja temperaturu denaturacije proteina, dok površina ispod pika predstavlja entalpiju denaturacije proteina  $\Delta H^{cal}$ . Od dobijene DSC krive denaturacije proteina oduzima se prethodno snimljena DSC kriva samog rastvora bez prisustva proteina, kako bi se oduzeo toplotni efekat ( $C_p$ ) samog rastvora. Principi metode i instrumenta opisani su u literaturi (Privalov, 1980.)

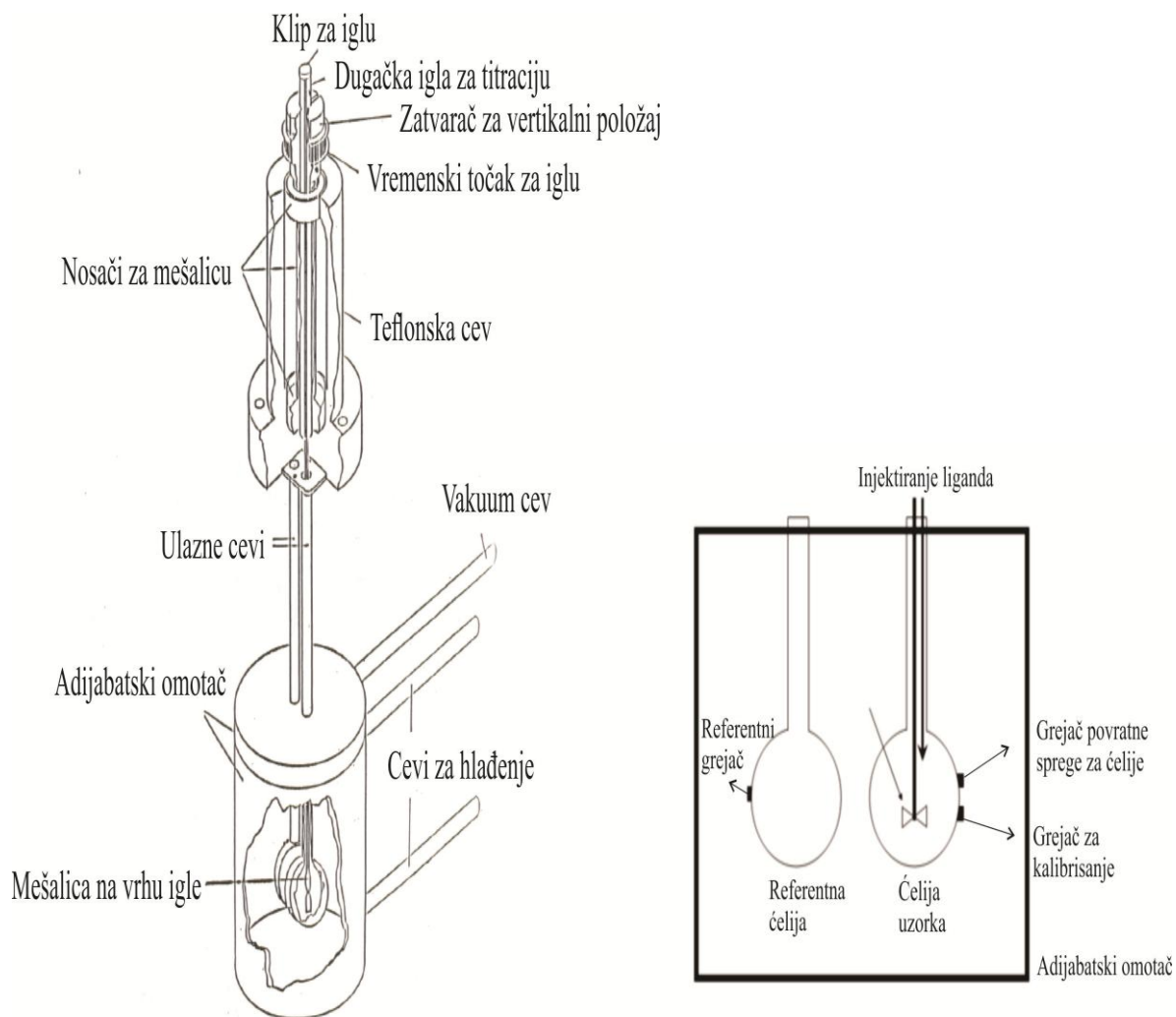
Dobijene DSC krive denaturacije proteina obrađene su pomoću programa specijalizovanog za obradu DSC rezultata *MicroCal Origin*, dobijenog od proizvođača instrumenta *MicroCal*.



**Slika 17.** Šematski prikaz ćelije adijabatskog mikro- kalorimetra MC-2 proizvođača *MicroCal Inc.*

### 3.2.5. Izotermalna titraciona mikro-kalorimetrija (ITC)

Interakcija albumina goveđeg seruma (BSA, čistoće 98%, *Boehringer Mannheim* (Fraction V) i različitih jona ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) ispitana je izotermalnom titracijom mikro kalorimetrijom (ITC) pomoću instrumenta *Micro Cal Omega*, *Micro Cal, Northampton MA, USA*. Svi rastvori su degazirani pre snimanja kako bi se onemogućilo stvaranje mehurića rastvorenog vazduha tokom zagrevanja u ćeliji instrumenta. Koncentracija BSA u svim eksperimentima iznosila je 0.050mM rastvorenog u dejonizovanoj vodi. Protein je titrovao 20mM rastvorom  $ZnCl_2$ , 300 mM KCl, NaCl,  $AlCl_3$ ,  $NiSO_4$ ,  $Pb(NO_3)_2$ ,  $CdSO_4$  i  $CuSO_4$  u dejonizovanoj vodi sa 20 injekcija od 5 $\mu$ l rastvora soli. Svako titriranje je vršeno u razmacima od 10 min, a samo titrovanje je trajalo 15 s. Instrument meri oslobođenu ili adsorbovanu toplotu pri interakciji proteina (ili nekog drugog makromolekula prisutnog u rastvoru) sa ligandom (joni, drugi molekuli). Dobijeni rezultati su obrađeni (određena je entalpija  $\Delta H$  pojedinačne titracije) te je dobijena titraciona kriva. Titraciona kriva je obrađena metodom nelinearnog fitovanja upotrebom specijalizovanog programa dobijenog od proizvođača za obradu ITC krivih *Micro Cal ORIGIN*, te su dobijeni parametri interakcije: broj mesta vezivanja N, konstanta vezivanja K i entalpija vezivanja  $\Delta H$ . Pre fitovanja od dobijene titracione krive oduzeta je bazna linja, koja predstavlja toplote razblaženja liganda u dejonizovanoj vodi. Svi eksperimenti su urađeni pri temperaturi od 25°C. Dobijene ITC krive obrađene su pomoću programa specijalizovanog za obradu ITC rezultata *MicroCal Origin*, dobijenog od proizvođača instrumenta. Principi metode i instrumenta opisani su u literaturi (*Brandts, et al, 1990*).



**Slika 18.** Šematski prikaz ćelije izotermalnog titracionog kalorimetra OMEGA proizvođača MicroCal Inc. Northampton MA, SAD

Termodinamički parametri vezivanja: slobodna energija ( $\Delta G$ ) vezivanja izračunata je po jednačini:

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (7)$$

gde je  $R$  gasna konstanta ( $R$  8.314 J/molK),  $T$  temperatura i  $K_A$  konstanta vezivanja i entropija vezivanja ( $\Delta S$ ) izračunata je po jednačini:

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (8)$$

Gde je  $\Delta H$  entalpija vezivanja,  $\Delta G$  slobodna energija vezivanja i  $T$  temperatura (*Brandts, et al, 1990, Liu et al 2005*).



### 3.2.6. Metoda određivanja aktivnosti vode ( $a_w$ )

Vrednosti aktivnosti vode ( $a_w$ ) svežih i osmotski dehidratiranih uzoraka mesa određivane su pomoću termoanalitičkih metoda tj. pomoću DSC i TGA kao što je opisano u literaturi (*da Silva, 2008*).

Oblik slobodne zamrzavajuće vode i njen sadržaj predstavljeni su kao aktivnost vode ( $a_w$ ). Aktivnost vode definisana je kao odnos parcijalnog pritiska vode u smeši ( $p$ ) i parcijalnog pritiska čiste vode ( $p^*$ ):

$$a_w = \frac{p}{p^*} \quad (9)$$

U veoma razblaženim rastvorima, gde koncentracija rastvorka teži nuli, rastvarač se ponaša po Raoulovom (*Raoult*) zakonu:  $x_A = p_A/p_A^*$ , (gde je  $x_A$  molski udeo komponente A u rastvoru,  $p_A$  parcijalni pritisak komponente A, parcijalni pritisak čiste komponente). U ovim uslovima može da se kaže da je aktivnost približno jednaka molskom udelu rastvarača, koji može da se izrazi kao:

$$a_w = x_a = \frac{n_1}{n_1 + \sum n_i} \quad (10)$$

Gde je  $n_1$  broj molova vode,  $\sum n_i$  broj molova rastvorene materije (rastvoraka) svih rastvorljivih vrsta.

Ove obe veličine mogu se odrediti eksperimentalno pomoću termoanalitičkih tehnika (DSC i TGA).  $n_1$  broj molova vode, se određuje iz TGA krivih, određivanjem gubitka vode, dok se  $\sum n_i$  broj molova rastvorene materije (rastvoraka) svih rastvorljivih vrsta određuje iz DSC krivih, na osnovu krioskopskog pomaka temperature topljenja leda ( $\Delta T$ ), primenom jednačine:

$$\Delta T_f = K_f b \quad (11)$$

Gde je ( $\Delta T$ ) krioskopski pomak temperature;  $K_f$  = krioskopska konstanta (za vodu iznosi  $1.86 \text{ K mol kg}^{-1}$ );  $b$  = molalitet ( $b = n_i/m_{\text{rastvarača(kg)}}$ ) (*da Silva, 2008*).

### 3.2.7. Određivanje slobode vode

Količina slobodne vode u svežem mesu izračunata je po obrascu koje je postavio *Quinn* (*Kumagai et al 1985, Quinn et al 1988 i Tylewicz et al. 2011*)

$$X_w^F = \frac{\Delta H}{\Delta H_0} \quad (12)$$

Gde je  $X_w^F$  količina slobodne vode (vode koja se može zamrznuti) u uzorku (g/g<sub>fw</sub>),  $\Delta H_0$  (333.88 J/g) je teorijska entalpija topljenja leda na 0 °C, a  $\Delta H$  entalpija topljenja leda u uzorku.

a usavršio *Tolstorebrov* (*Tolstorebrov et al, 2014*):

$$\chi_{led} = \frac{\int_{T'}^{T_f} IdT}{\int_{T'_m}^{T'} IdT} \quad (13)$$

Nesmznuta voda (“*ufreezible water*”, *UFW*) je iskazana kao grami vode po gramu suve mase (SM) uzorka i izračunata na način koji su dali *Goni* i saradnici (*Goni et al, 2007*).

$$UFW = \frac{W_{voda} - (\Delta H_{uzorak} / \Delta H_{voda})}{DM} \quad (14)$$

Gde je *UFW* nesmrznuta voda u uzorku (g/g<sub>SM</sub>),  $\Delta H_{voda}$  (333.88 J/g) je teorijska entalpija topljenja leda na 0 °C, a  $\Delta H_{uzorak}$  entalpija topljenja leda u uzorku,  $DM = SM$  suva masa uzorka.

### 3.3. Analiza sastava makroelemenata osmotski dehidratisanog svinjskog mesa melasom šećerne repe, svežeg mesa i melase

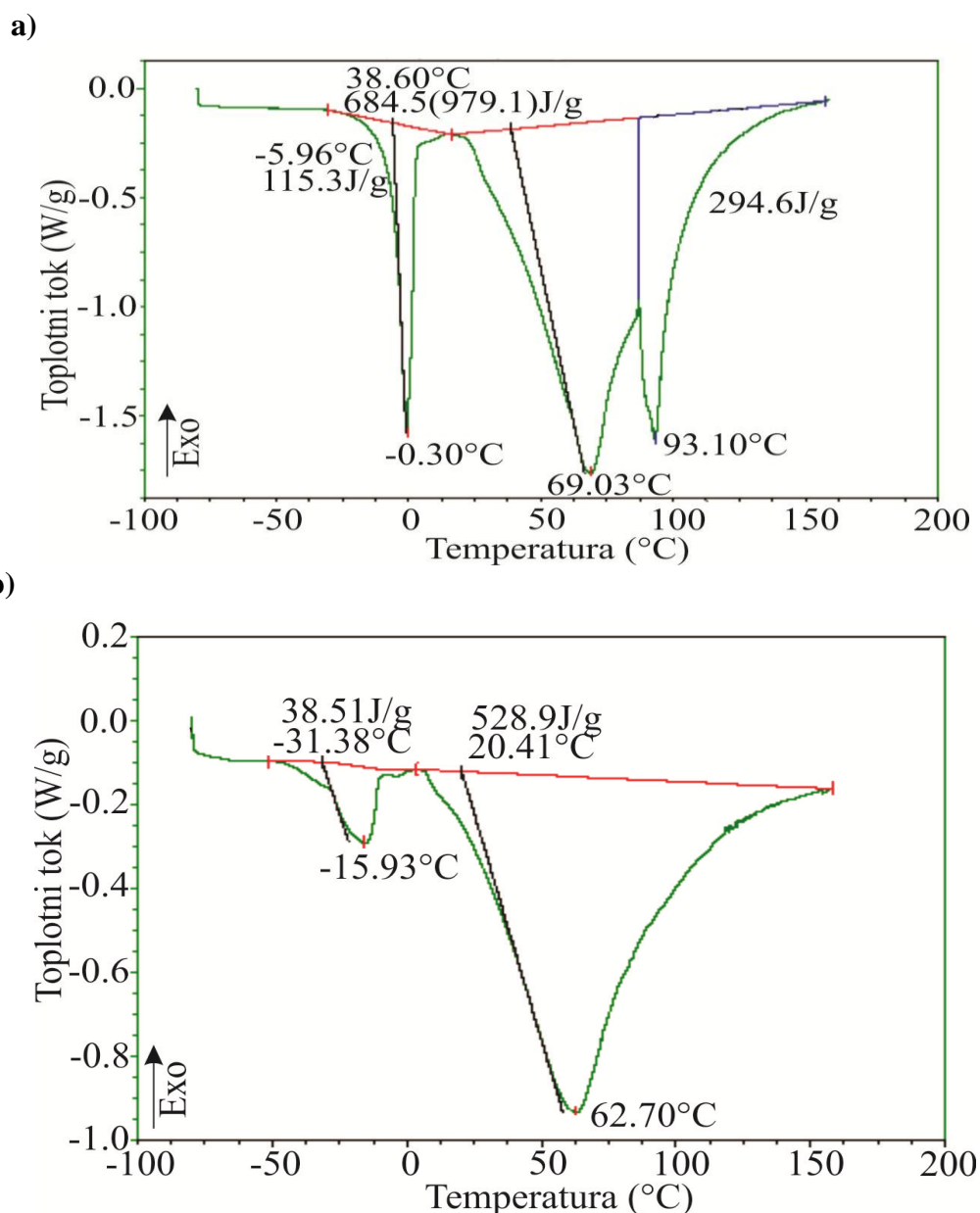
Uzorci svežeg mesa, melase i osmotski dehidratisanog svinjskog mesa *Longissimus dorsi* su pripremljeni za analizu makroelemenata kombinovanjem termalnog tretmana na 360°C i tretmana kiselinama na 160°C. Uzorci (mase od oko 5 g) su tretirani sa 4.5ml 65% HNO<sub>3</sub> i

10.5 ml 35% HCl. Tretman je ponavljan do dobijanja belog sedimenta koji je potom rastvoren u 0.07 M HNO<sub>3</sub>. Sadržaj makroelemenata određen je metodom optičke emisijske spektrometrije indukovano spregnutom plazmom (ICP-OES) pomoću instrumenta *Scientific ICAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, United Kingdom*, spektrometar opremljen sa *RACID86 Charge Injector Device (CID) detector, standard glass concentric nebulizer, quartz torch i alumina injector*. Uzorci su analizirani sa tri ponavljanja.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i termogravimetrijska analiza (TGA) svežeg i osmotski dehidratiranog svinjskog mesa

DSC krive svežeg i osmotski dehidratiranog mesa prikazane su na Slici 19. Sveže i dehidratirano meso je snimano u otvorenim čančićima, u temperaturnom opsegu od 90°C do 150°C i pri brzini grejanja 5°C/min.

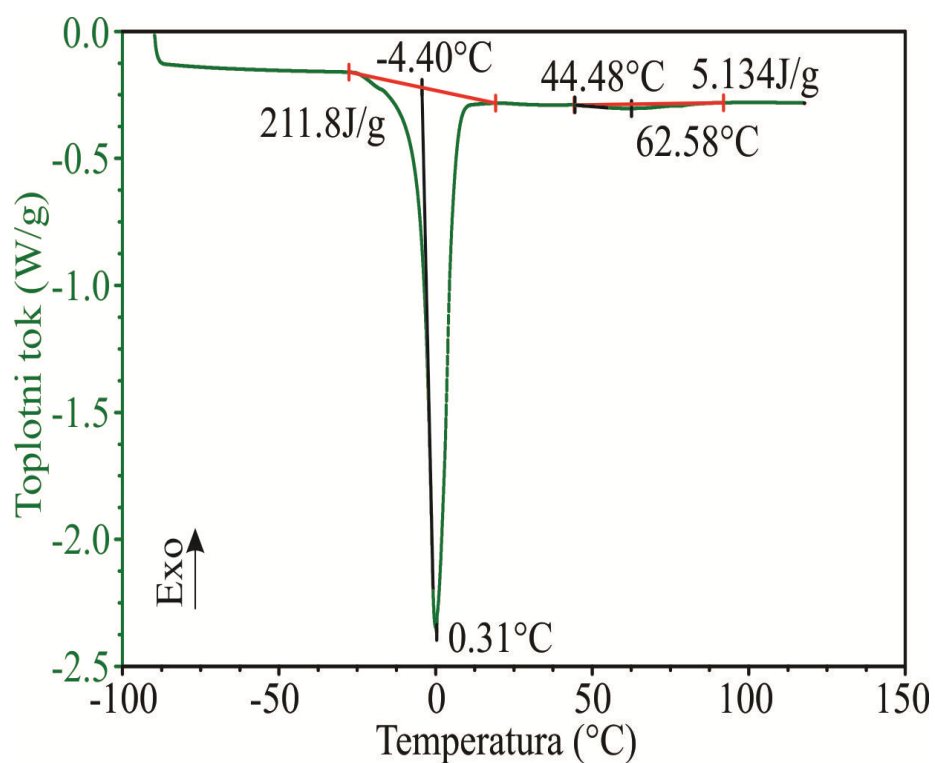


**Slika 19.** DSC krive a) svežeg i b) osmotski dehidratiranog svinjskog mesa u otvorenim aluminijumskim čančićima.

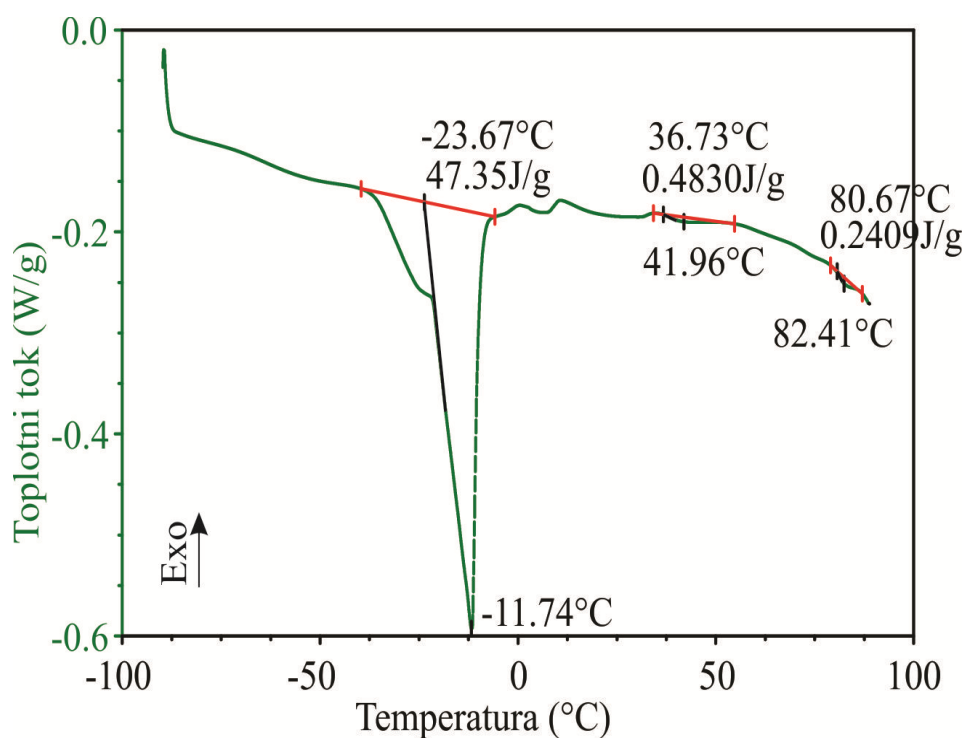
Na termogramu dobijenom za sveže meso na Slici 18. a) vidljiva su tri endotermna prelaza i to sa temperaturskim maksimumom prelaza na temperaturama od  $-0.3^{\circ}\text{C}$ ,  $69^{\circ}\text{C}$  i  $93^{\circ}\text{C}$ . Prvi pik sa temperaturskim minimumom na  $T_{m1} = -0.3^{\circ}\text{C}$  je endotermni prelaz koji se završava u užem temperaturskom rasponu, jasno je definisan i s velikim stepenom simetrije, entalpija prelaza iznosi  $\Delta H_1 = 115.3 \text{ J/g}$ . Drugi prelaz s temperaturskim minimumom  $T_{m2} = 69^{\circ}\text{C}$  je složen, entalpija prelaza iznosi  $\Delta H_2 = 684.5 \text{ J/g}$ , preklopljen je s trećim prelazom ( $T_{m3} = 93^{\circ}\text{C}$ , entalpija trećeg prelaza  $\Delta H_3 = 294.6 \text{ J/g}$ ). Drugi prelaz se odvija u širokom temperaturskom opsegu (od oko  $80^{\circ}\text{C}$ ), ukazujući na složenost termalnih procesa koji se odvijaju u uzorku u temperaturskom opsegu od  $10^{\circ}\text{C}$  do  $120^{\circ}\text{C}$ . Treći endotermni prelaz, s temperaturskim minimumom na  $T_{m3} = 93^{\circ}\text{C}$ , i entalpijom od  $\Delta H_3 = 294.6 \text{ J/g}$  je delimično preklopljen s drugim endotermnim prelazom, ali je očigledno da se odvija u užem temperaturskom opsegu od oko  $20^{\circ}\text{C}$ , ukazujući na koherentnost, tj. visoki stepen kooperativnosti termalnog procesa koji se koji se odvija. Na DSC termogramu dobijenom za osmotski sušeno meso Slika 18.b) vidljiva su dva endotermna prelaza s temperaturskim minimumima na  $T_{m1s} = -15^{\circ}\text{C}$ , s entalpijom prelaza  $\Delta H_{1s} = 38.6 \text{ J/g}$  i  $T_{m2s} = 62^{\circ}\text{C}$ , a entalpija drugog prelaza  $\Delta H_{2s} = 528.9 \text{ J/g}$ . Prvi pik s minimumom na  $T_{m1s} = -15^{\circ}\text{C}$  je na nižoj temperaturi minimuma pika u odnosu na prvi endotermni pik zabeležen kod svežeg mesa ( $T_{m1} = -0.3^{\circ}\text{C}$ ). Ovaj prelaz kod osmotski osušenog mesa je složen i proteže se u širem temperaturskom rasponu (od oko  $30^{\circ}\text{C}$ ) u poređenju s prvim endotermnim prelazom kod svežeg mesa ( $-0.3^{\circ}\text{C}$ ). Drugi endotermni prelaz, vidljiv na DSC krivoj dobijenoj za osmotski sušeno meso s minimumom na  $T_{m2s} = 62^{\circ}\text{C}$ , takođe se odvija se u širokom temperaturskom opsegu (od oko  $80^{\circ}\text{C}$ ), kao i kod drugog endotermnog prelaza dobijenog na DSC krivoj svežeg mesa.

DSC krive svežeg i osmotski dehidratiranog svinjskog mesa u hermetički zatvorenim aluminijumskim čančićima u temperaturskom opseg  $-90^{\circ}\text{C}$  do  $150^{\circ}\text{C}$ , prikazane su na Slici 20. a) i b).

a)



b)



**Slika 20.** a) DSC kriva svežeg svinjskog mesa u hermetički zatvorenim aluminijumskim čančićima. b) DSC kriva osmotski dehidratiranog svinjskog mesa u hermetički zatvorenim aluminijumskim čančićima.

Na termogramu dobijenom za sveže meso Slika 19. a) vidljiva su dva endotermna prelaza: prvi endotermni prelaz sa temperaturskim minimumom prelaza ( $T_m$ ) na temperaturi od  $0.3^\circ\text{C}$ , temperaturom početka prelaza (*onset*,  $T_o$ ) od  $-4.4^\circ\text{C}$  i entalpije prelaza  $\Delta H_1=211.8\text{J/g}$ . Drugi endotermni prelaz sa temperaturskim minimumom na  $62.6^\circ\text{C}$ , entalpije prelaza  $\Delta H_2=5.13\text{J/g}$  i temperaturom početka prelaza  $44.5^\circ\text{C}$ . Na termogramu dobijenom za osmotski sušeno meso, Slika 19. b), nađena su tri endotermna prelaza: jedan endotermni prelaz sa temperaturskim minimumom prelaza na temperaturi od  $-117^\circ\text{C}$ , temperaturom početka prelaza od  $-23.7^\circ\text{C}$  i entalpije prelaza  $\Delta H_1=47.3\text{ J/g}$ . Drugi endotermni prelaz sa temperaturskim minimumom na  $41.96^\circ\text{C}$ , entalpijom prelaza  $\Delta H_2= 0.48\text{ J/g}$  i temperaturom početka prelaza  $36.73^\circ\text{C}$ . Treći endotermni prelaz sa temperaturskim minimumom ( $T_m$ ) na  $82.4^\circ\text{C}$ , entalpijom prelaza  $\Delta H_2= 0.24\text{ J/g}$  i temperaturom početka prelaza  $80.67^\circ\text{C}$ . Upoređivanjem dobijenih rezultata može da se vidi da je prvi endotermni pik na termogramu osmotski sušenog mesa pomeren ka nižim temperaturama za oko  $11^\circ\text{C}$  u poređenju s prvim endotermnim pikom na termogramu dobijenom za uzorak svežeg mesa. Takođe, entalpije prelaza se razlikuju, te je entalpija prvog endotermnog prelaza za osmotski sušeno meso ( $\Delta H_1=47.3\text{ J/g}$ ) značajno umanjena u poređenju sa entalpijom dobijenom za prvi pik svežeg mesa ( $\Delta H_1=211.8\text{ J/g}$ ). Takođe postoje značajne razlike s obzirom na temperaturski minimumom i entalpije drugog prelaza ako se uporede termogrami svežeg i osmotski sušenog mesa. Tako je drugi endotermni pik na termogramu osmotski sušenog mesa pomeren ka nižim temperaturama za oko  $20^\circ\text{C}$  u poređenju sa prvim endotermnim pikom dobijenim za uzorak svežeg mesa. Takođe entalpije prelaza se razlikuju, te je entalpija drugog endotermnog prelaza za osmotski sušeno meso ( $\Delta H_1=0.48\text{ J/g}$ ) manja u poređenju sa entalpijom dobijenom za drugi pik svežeg mesa ( $\Delta H_1=5.13\text{ J/g}$ ). Na Slici 21. prikazano je svinjsko meso *Longissimus dorsi* osmotski dehidratirano u melasi šećerne repe.



**Slika 21.** Svinjsko meso (*Longissimu dorsi*) osmotski dehidratirano u melasi čecerne repe.

#### 4.1.1. Slobodna voda

Količina slobodne vode u svežem mesu izračunata je po obrascu koji je dao Quinn (*Quinn et al, 1988, Kumagai et al 1985, i Tylewicz et al. 2011*)

$$X_w^F = \frac{\Delta H}{\Delta H_0} \quad (12)$$

gde je  $X_w^F$  količina slobodne vode (vode koja se može zamrznuti) u uzorku (g/g<sub>fw</sub>),  $\Delta H_0$  (333.88 J/g) je teorijska entalpija topljenja leda na 0 °C, and  $\Delta H$  entalpija topljenja leda u uzorku,

a usavršio Tolstorebrov (*Tolstorebrov et al, 2014*):

$$\chi_{led} = \frac{\int_{T_m}^{T_f} IdT}{\int_{T_m}^{T_f} IdT} \quad (13)$$

Nesmrljiva voda (*UFW*) je iskazana kao grami vode po gramu suve mase (*SM*) uzorka i izračunata na način koji su dali Goni i saradnici (*Goni et al 2007*):

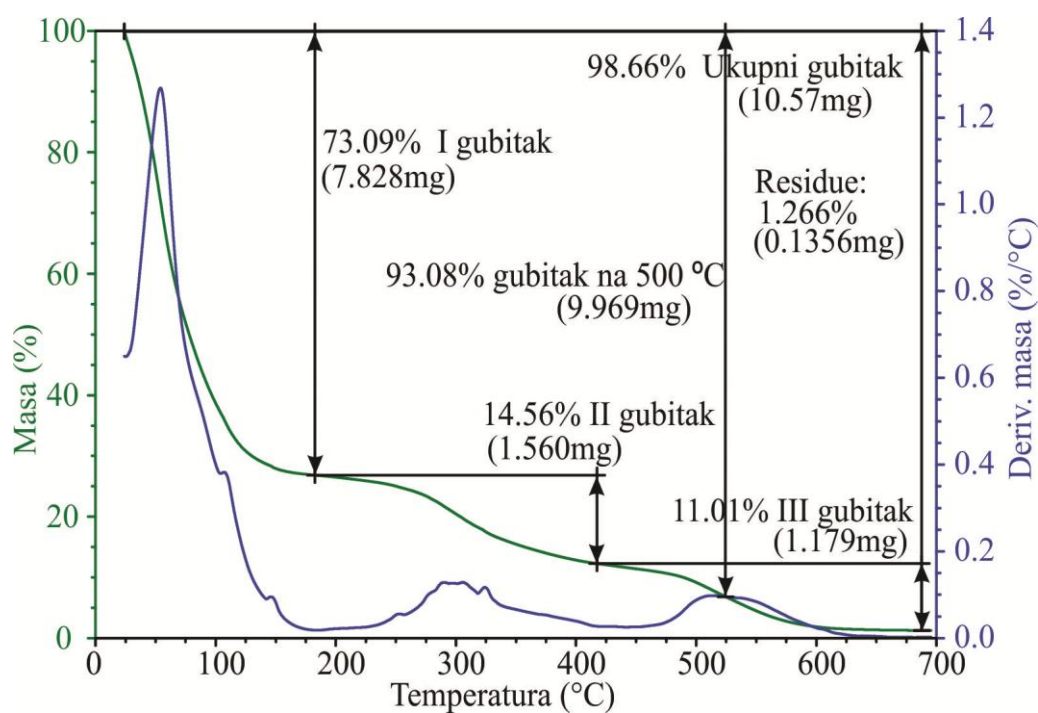
$$UFW = \frac{W_{voda} - (\Delta H_{uzorak} / \Delta H_{voda})}{DM} \quad (14)$$

Gde je nesmrzljiva voda (*UFW*) (voda koja se ne može zamrznuti) u uzorku (g/g<sub>SM</sub>),  $\Delta H_{voda}$  (333.88 J/g) je teorijska entalpija topljenja leda na 0 °C, i  $\Delta H_{uzorak}$  entalpija topljenja leda u uzorku,  $DM = SM$  suva masa uzorka. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 4.

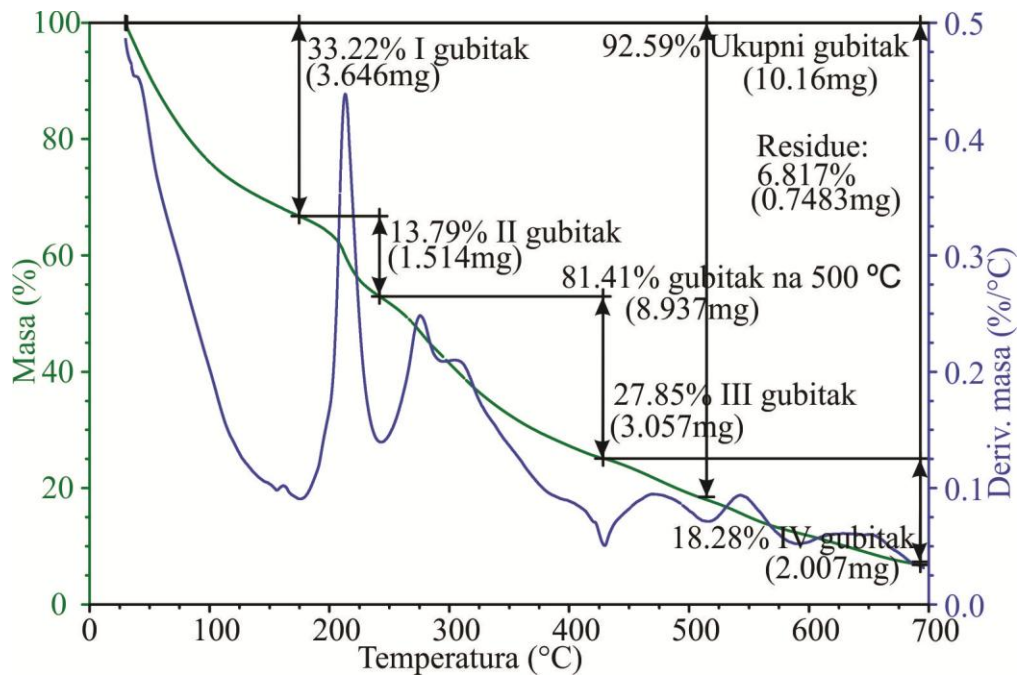


**Tabela 4:** Vrednosti za vlagu, količinu slobodne vode ( $X^W_F$ ), temperature topljenja leda ( $T_{m1}$  temperatura početka prelaza), nesmrzljiva voda (UFW) u uzorku svežeg svinjskog mesa i osmotski dehidratiranog svinjskog mesa dobijene iz DSC i TGA krivih.

uzorak	Vlaga (%)	$X^W_F$ (g/g <sub>fw</sub> )	$T_{m1}$ (°C)	UFW (g/g SM)	UFW (% s obzirom na ukupnu vlagu)	$X^W$ (% s obzirom na ukupnu vlagu)
sveže svinjsko meso	73%	0,634	-4.40	2.49	11.6	61.4
Osmotski dehidratirano svinjsko meso	46%	0,141	-23.76	0.86	5.6	40.3



**Slika 22. a)** TGA i dTG krive svežeg svinjskog mesa. Temperaturni opseg od 20°C do 700°C .



**Slika 22. b)** TGA i dTG krive osmotski dehidratiranog svinjskog mesa. Temperaturski opseg od 20°C do 700°C .

TGA i dTG krive svežeg i osmotski dehidratiranog svinjskog mesa prikazane su na Slici 22. a) i b). Na termogramu dobijenom za sveže meso jasno se mogu da se uoče tri gubitka mase. Prvi gubitak mase određen za sveže svinjsko meso nađen u opsegu temperature od 20°C do 200°C iznosio je 73%. Drugi gubitak u temperaturskom opsegu od 200°C do 400°C iznosio je 14.5% i treći gubitak u temperaturskom opsegu od 400°C do 700°C iznosio je 11.0%. Ukupni gubitak mase do 700°C iznosio je za sveže svinjsko meso 98.6%, a ostatak na 700°C iznosi 1.3%.

Dobijene TGA i dTG krive za uzorke mesa osmotski dehidratiranog u melasi, su nešto složenije u poređenju s termogramima za sveže svinjsko meso. Vidljiva su četiri gubitka mase. Prvi gubitak mase za osmotski sušeno svinjsko meso iznosi 33.2 % i nalazi se u temperaturskom opsegu od 20°C do 160°C, što je uži temperaturski opseg od temperaturskog opsega odobijenog za prvi gubitak mase svežeg svinjskog mesa. Drugi gubitak mase, koji iznosi 13.8%, odvija se u temperaturskom opsegu od 160°C do 250°C, treći gubitak mase sastoji se od dva prekopljena gubitka mase, što nije slučaj za odgovarajući gubitak mase kod svežeg mesa, i iznosi 27.8%. Četvrti gubitak mase dobijen za osmotski dehidratirano svinjsko meso iznosi 18.26% i odvija se u temperaturskom opsegu od 400°C do 700°C.

Ukupni gubitak mase do 700°C za osmotski dehidratirano svinjsko meso iznosio je 92.6%, a ostatak na 700°C iznosi 6.8%.

Iz prikazanih DSC rezultata dobijenih za a) sveže i b) osmotski dehidratirano svinjsko meso u otvorenim aluminijskim čančićima (Slika 18.) mogu da se vide tri endotermna prelaza sa minimumima oko -0.3 °C, 69°C i 93°C kod svežeg mesa koji odgovaraju sledećim procesima: prvi topljenju leda, drugi odgovara procesu isparavanja vode koji se odvija u istom temperaturnom opsegu između 20°C i 100°C kao i denaturacija proteina mesa (H.C. Bertram et al. 2006, Bertola, Bevilacqua, & Zaritzky, 1994; Stabursvik & Martens, 1980; Stabursvik, Fretheim, & Frøystein, 1984; Wright, 1984) i dva endotermna prelaza kod osmotski dehidratiranog mesa sa minimumima na -15°C, i 62°C. Procesi denaturacije proteina pri ovim uslovima nisu jasno izraženi zbog istovremenog isparavanja vode. Ovaj proces energetski prevladava procese denaturacije proteina, tako da je jedino izražen pik koji odgovara denaturaciji aktina,  $T_m=93^\circ\text{C}$ , (Stabursvik and Martens, 1980) u slučaju svežeg mesa, dok u kod osmotski dehidratiranog mesa ovaj pik nije vidljiv.

Eksperimentalni uslovi snimanja u otvorenim aluminijskim čančićima u širokom temperaturnom opsegu od -90°C do 150°C omogućavaju praćenje termalnih svojstava mesa s obzirom na razlike u termalnim karakteristikama koje su izazvane promenom količine vode s u uzorku, pri uslovima atmosferskog pritiska.

Tako DSC krive dobijene za sveže svinjsko meso imaju karakterističan simetričan prelaz sa temperaturnim minimumom  $T_{m1} = -0.3^\circ\text{C}$  koji odgovara topljenju leda. Oblik ovog endoternog prelaza  $T_{m1} = -0.3^\circ\text{C}$  je s visokim stepenom simetrije pika koja ukazuje na topljenje leda tj. ukazuje na vodu koja nije naročito jako vezana za ćelijske zidove ili za proteine mesa. Zbog toga nije došlo do velikog kriokopskog pomaka temperature topljenja s obzirom na čistu vodu (teorijski 0°C) i entalpije topljenja  $\Delta H_1=115.3\text{J/g}$  (teorijski 334 J/g). Takva voda je definisana kao slobodna voda (*free water*) te može da se zaključi iz dobijenih DSC rezultata za sveže meso da se veliki procenat vode u svežem mesu nalazi kao slobodna voda (Rahman 2009, Guizani et al 2013). Količina slobodne vode u svežem mesu izračunata je po obrascu koje je postavio Tolstorebrov 2014 (Tolstorebrov et al 2014, Cheng et al, 2014 i Tylewicz et all 2011) :

$$X_w^F = \frac{\Delta H}{\Delta H_0} \quad (12)$$

Gde je  $X_w^F$  količina slobodne vode u uzorku (g/g<sub>fw</sub>),  $\Delta H_0$  (333.88 J/g) je teorijska entalpija topljenja leda na 0 °C, i  $\Delta H$  entalpija topljenja uzorka.

Dobijeni rezultati količine slobodne vode u uzorcima su iznosili je  $X_w^F = 0,634$  g/g<sub>fw</sub> za sveže i za osmotski sušeno meso  $X_w^F = 0,141$  g/g<sub>fw</sub>.

Fizičko-hemijske osobine hrane bogate vodom su temperaturno zavisne, s posebnom osetljivošću u temperaturnom opsegu u kojem dolazi do faznih promena vode. Ova temperaturna oblast zavisi od sastava hrane i definisana je početnom temperaturom smrzavanja i temperaturom eutektika. Najveći broj faznih promena se uglavnom odvija u užem temperaturnom opsegu. Termalna svojstva hrane su uveliko zavisna od količine smrznute vode, kao i od količine vode koja se ne smrzava čak i na niskim temperaturama (Lind, 1991).

Rezultati dobijeni iz DSC krivih za sveže i osmotski sušeno meso dali su podatke o početnoj, (*onset*) temperaturi smrzavanja vode i topljenja leda u svežem i osmotski dehidratiranom svinjskom mesu u otvorenim čančićima. Iz DSC termograma topljenja leda u uzorku svežeg svinjskog mesa u hermetički zatvorenim Al-čančićima, Slika 19.a), karakteristična su dva termalna događanja. Prvo, vidljiv je stepenasti pomak toplotnog toka na niskoj temperaturi, a zatim sledi glavni endotermalni pik. Prvo termalno dešavanje, stepenasti pomak, se odnosi na staklasti prelaz koji je izazvan koncentrovanjem uzorka usled smrzavanja i koncentrovanjem čvrste faze u uzorku. Sledeće termalno dešavanje je endotermalni pik koji je posledica topljenja kristala leda koji odgovaraju slobodnoj i vezanoj vodi. (Bchir et al. 2009). Kod uzoraka svinjskog mesa koje je osmotski dehidratirano, Slika 19. b), dolazi do promena s obzirom na slobodnu vodu i vezanu vodu te dolazi do pomaka ka nižim temperaturama početne temperature topljenja leda u poređenju sa svežim mesom (Slika 19. a). Ovo se očigledno dešava zbog osmotskog tretmana uzorka čime se u uzorak dovode materije iz melase (šećeri...). Time dolazi do smanjenja sadržaja vode u tkivu mesa i preraspodele odnosa slobodne i nesmrzljive vode.

Na DSC krivoj osmotski dehidratiranog mesa u otvoreniom aluminijunmskim čančićima, vidljiv je, na prvom endotermalnom piku koji odgovara topljenju leda  $T_m = -15^\circ\text{C}$  (Slika 18. b)) preklapljeni manji endotermalni pik s temperaturnim minimumom na nešto višoj temperaturi  $T_m$  oko  $-4^\circ\text{C}$  što može da se tumači, s obzirom na temperaturne minimume prelaza, kao topljenje leda koje odgovara jače i slabije vezanoj vodi. Rezultati dobijeni termogravimetrijskom analizom uzoraka svežeg i osmotski dehidratiranog mesa su u

saglasnosti s rezultatima DSC analize, pošto se gubitak vode koji se dešava do 200°C kod osmotski dehidratiranog mesa odvija u dva stepena, Slika 21.b). Jasno su izražena dva gubitka mase i na TG i dTG krivoj (I i II gubitak mase), što ukazuje na postojanje dva tipa energetski različito vezane vode. Prvi tip vode je slabije vezana voda koja se gubi do 120°C i njena količina iznosi 33.32%, dok je jače vezana voda vidljiva kao gubitak mase do 200°C i iznosi 13.79%. Iz dobijenih rezultata izračunata je slobodna voda (Tabela 4.) Odnos slabije i jače vezane vode u osmotski dehidratiranom mesu je promenjen u poredjenju s vodom iz svežeg mesa, gde jače vezana voda nije vidljiva iz DSC i TGA rezultata. Iz rezultata može se zaključiti da je u osmotski dehidratiranom mesu količina slobodne vode smanjena (Tabela 4), te da je preostala slobodna voda energetski jače (gubitak do 200°C Slika 21. b)), vezana za tkivo mesa nego kod svežeg gde je vidljiv samo jedan tip slobodne vode: jedan simetričan endotermni pik  $T_m -0.3^\circ\text{C}$  (Slika 18.a) i jednostepeni gubitak mase do (200°C) zabeležen na TGA krivoj Slika 21. a). Ovakva termalna dešavanja (DSC rezultati) su kod uzoraka podvrgnutim osmotskoj dehidraciji zapazili su i drugi autori ( Ross, 1986, Bachir et al 2009, Ohkuma et al. 2008, Cornillon 2000), tako Cheng i saradnici (Cheng et al 2014) koji su proučavali termalne karakteristike osmotski dehidratiranih jagoda dolaze do sličnih zaključaka. Što se tiče osmotski dehidratiranog mesa, u novijoj literaturi nema mnogo podataka o količini slobodne vode prisutne u osmotski dehidratiranom mesu. Roos je (Ross, 1986) je na osnovu DSC analize dao vrednosti za sadržaj slobodne vode (*frozen water*) u svežem mesu severno američkog jelena koja je iznosila 59.8%, dok je nesmrzljiva voda (*unfreezible water*) iznosila 15.1%. Rezultati za sadržaj slobodne vode (*frozen water*) dobijeni u ovom radu iznose 61.4% i za nesmrzljivu vodu (*unfreezible water*) 11.6% za sveže svinjsko meso. Rezultati za sadržaj slobodne vode (*frozen water*) dobijeni za osmotski u melasi sušeno svinjsko meso iznose 40.3% i za nesmrzljivu vodu (*unfreezible water*) 5.6%. Nešto je više podataka o sadržaju slobodne vode u mesu riba. Tako su Tolstorebrov i saradnici (Tolstorebrov et al 2014) odredili slobodnu vodu mišića bakalara (*atlantic cod*) koja se kretala u opsegu od 5.1 do 8.5 % .

Fricke i saradnici (Fricke et all 2001) su u svom radu prikazali tabelarno literaturne vrednosti dobijene za količine slobodne vode za različite namirnice Tabela 5.

**Tbela 5.** Slobodna voda (frakcija leda), specifični toplotni kapacitet, entalpija i toplotna provodljivost različitih namirnica s obzirom na slobodnu vodu (*Fricke et all 2001*).  $w_{wo}$  maseni udeo vode u nesmrznutoj hrani.

<b>Termalno svojstvo</b>	<b>Broj rezultata</b>	<b>Materijal</b>
Frakcija leda	13	sok od naranče ( $w_{wo}=0.89$ )
	14	teletina ( $w_{wo}=0.74$ )
	14	bakalar ( $w_{wo}=0.82$ )
Toplotni kapacitet	10	bakalar ( $w_{wo}=0.89$ )
	10	teletina bez masti ( $w_{wo}=0.82$ )
	7	jagnjeći bubrezi ( $w_{wo}=0.798$ )
	7	jagnjeće slabine( $w_{wo}=0.649$ )
	7	umereno masne jagnjeće slabine( $w_{wo}=0.444$ )
	7	masne jagnjeće slabine ( $w_{wo}=0.775$ )
	7	teletina ( $w_{wo}=0.775$ )
	7	teletina ( $w_{wo}=0.775$ )
Entalpija	5	sok od jabuke ( $w_{wo}=0.872$ )
	5	sok od naranče( $w_{wo}=0.89$ )
	16	bakalar ( $w_{wo}=0.80$ )
	16	bakalar ( $w_{wo}=0.84$ )
	16	Smuđ ( $w_{wo}=0.79$ )
	18	teletina bez masti ( $w_{wo}=0.74$ )
	16	bakalar ( $w_{wo}=0.82$ )
	16	bakalar ( $w_{wo}=0.82$ )
Toplotna provodljivost	32	teletina ( $w_{wo}=0.74$ )
	8	riba
	20	jagnjetina
	9	živinsko meso

Poznato je da mišićno tkivo sadrži oko 75% vode. Najveći deo miofibrilarne vode , oko 85% se nalazi unutar guste miofibrilarne proteineske mreže (intramiofibrilarno), dok se 15% nalazi izvan ove mreže. Sa anatomskog gledišta voda u mišićnom tkivu je raspoređena u intrafibrilarnoj i ektrafibrilarnoj mreži (*Pearce et all 2011*).

Voda u intrafibrilarnoj mreži je smeštena u miofibrilarnom prostoru između debelih i tankih filamenata.

Voda u ekstrasfibrilarnom prostoru nalazi se :

- u sarkoplazmi, u prostoru između miofibrila (intermiofibrilarno)
- u prostoru između mišićnih vlakana i u interfascikularnom prostoru
- u ekstrasfascikularnom prostoru (Slika 10.)

Gledano sa biofizičkog aspekta miofibrilarna voda može da se klasifikuje u tri osnovne grupe i to 1) voda vezana za protein preko proteinskih hidrofilnih grupa-čvrsto vezana voda, 2) zarobljena imobilizirana ili nepokretna voda, odlikuje je manje uređena struktura (s obzirom na elektrostatička privlačenja), 3) slobodna voda koju održavaju kapilarne sile i čija je molekulska orijentacija potpuno nezavisna od elektrostatičkog privlačenja.

Glavna odlika vode vezane na protein je veoma smanjena pokretljivost, što je čini nepokretnom, zbog čvrstine veze, čak i pri upotrebi jakih mehaničkih ili fizičkih sila kao što su zamrzavanje ili grejanje. (*Fennema, 1985*). Površina proteina ima veliki broj naelektrisanih grupa koje čvrsto vežu molekule vode i na taj način povećavaju njenu gustinu (*Cantor i Chimmel, 1980*). Sevurgun i autori su tek 1998. (*Sevurgun et al 1998*) dokazali pomoću metode rasejanja X- zraka pod malim uglom (*SAXS*) da prvi monosloj vode na proteinu ima prosečnu gustinu za 15% veću nego što je gustina same vode. Ovo su potvrdili Merzel i Smith (*Merzel i Smith 2002*) i objasnili fizičko poreklo ove pojave koristeći metode molekulske dinamičke simulacije (*MD*). Vezana voda predstavlja veoma mali udeo ukupne vode prisutne u ćeliji mišića i čini oko 0.5g vode po gramu proteina. Ukupna koncentracija proteina u mišiću čini 200 mg/g, prema tome vezana voda čini manje od 1/10 ukupne vode mišića. Količina vezane vode se gotovo ne menja ili je njena promena veoma mala u *post-rigor* mišiću (*Huff-Lonergan i Lonergan 2005*).

Offer i Cousin (*Offer i Cousin 1992*) su pokazali postojanje dve vrste intercelularnih prostora u *post mortem* mišiću i to: a) odmah nakon ubijanja pokazano je postojanje malog intercelularnog prostora, b) neko vreme *post mortem* pojavljuje se prvi intercelularni prostor između vlakna i perimisijuma i c) mišić u *rigor mortis* pojavljuje se prostor između vlakana u pojedinom snopu. Ukupni protok (*bulk flow*) izazvan kapilarnim silama odvija se u ovim intracelularnim prostorima (*Schmidt 2008*).

**Iz rezultata dobijenih u ovom radu jasno može da se zaključi da osmotskom dehidratacijom mesa u melasi šećerne repe dolazi do očekivanog gubitka vode ali i do promene u jačini interakcija preostale slobodne vode s proteinskom osnovom i smanjenja količine vezane vode u proteinskoj osnovi u poređenju s vodom svežeg**

mesa. Vezana voda smanjuje za oko 4%, a slobodna voda kod osmotski dehidratiranog mesa uopšteno ima energetski jaču interakciju za čvrstu proteinsku osnovu nego kod svežeg mesa, očigledno je postojanje dva energetska različita stepena interakcije ili veze slobodne vode u osmotski dehidratiranom svinjskom mesu. Može da se pretpostavi da ova dva energetska različita stepena jačine vezivanja vode odgovaraju slobodnoj vodi koju održavaju kapilarne sile (slabije vezana) i zarobljenoj tzv. imobiliziranoj vodi.

S obzirom na to da se oko 85% vode mišićnog tkiva nalazi unutar guste miofibrilarne mreže (intermiofibrilarno), a 15% se nalazi izvan ove mreže (ekstrafibrilarno), iz dobijenih rezultata može da se zaključi da osmotskom dehidratacijom dolazi do izuzetno velikih promena u mehaničkoj strukturi mesa. O veličini ovih promena najsvikovitije govori promena količine vezane vode koju odlikuje nepokretnost upravo zbog čvrstine veze čak i pri upotrebi jakih mehaničkih ili fizičkih sila kao što su zamrzavanje ili grejanje (*Fennema, 1985*). Očigledno je da osmotskom dehidratacijom dolazi do promene i pregrupisanja preostale slobodne vode u dva oblika što ukazuje na mehaničko strukturne promene u interfibrilarnoj mreži i pojednostavljivanje strukture proteinske osnove. Ovo pojednostavljivanje strukture proteinske osnove verovatno obuhvata fazne prelaze čvrsto-tečno koji se dešavaju u zatvorenim, prostorno geometrijskim ograničenjima gde su predviđeni pomaci temperature topljenja u zavisnosti od širine pora po Gibbs–Thomson-ovoj jednačini (*Jahnert et al 2008*). **Strukturne promene u interfibrilarnoj mreži i pojednostavljivanje strukture proteinske osnove su u smislu obrazovanja tri strukturna nivoa osmotski dehidratiranog mesa, koja se odnose na :**

- 1. strukturni nivo vode vezane na protein tj. postojanje proteinske strukture i posle osmotske dehidratacije (Strukturni nivo I);**
- 2. strukturni nivo mreže sa ujednačeno manjim porama tj. nivo energetski jače vezane nepokretne vode (Strukturni nivo II);**
- 3. strukturni nivo mreže sa ujednačeno većim porama tj. nivo energetski slabije vezane nepokretne vode (Strukturni nivo III).**

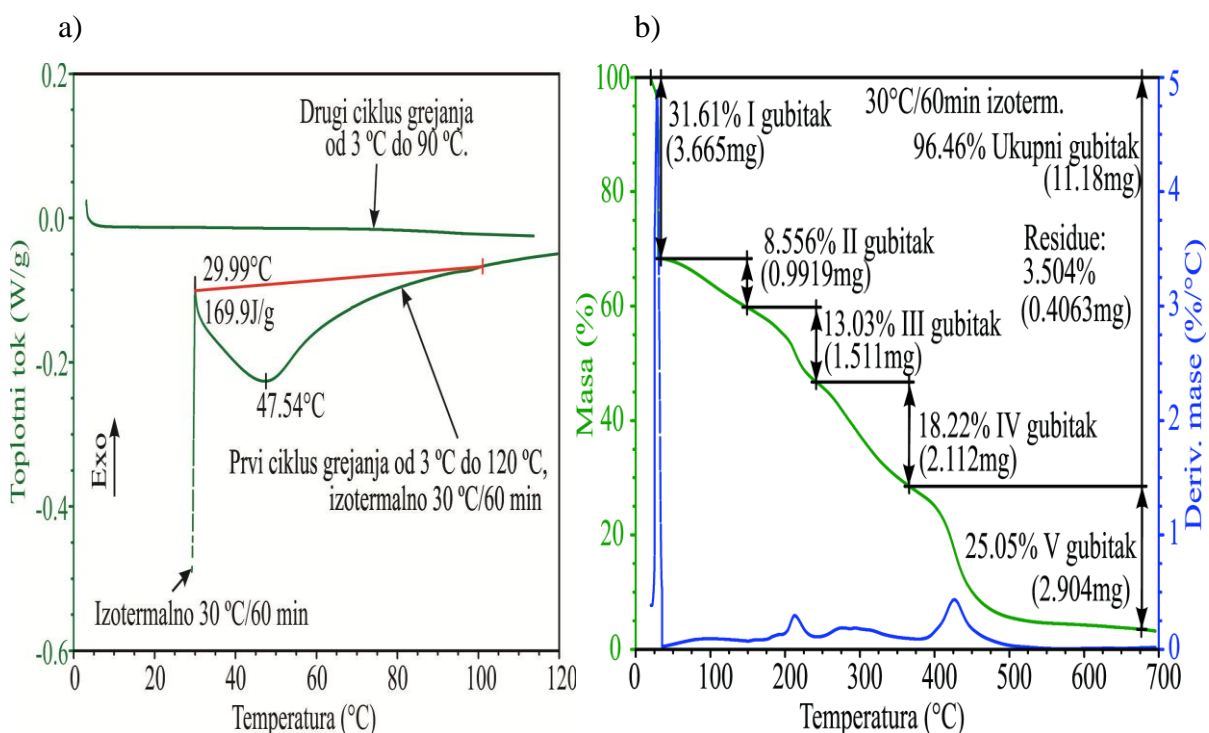
Iz dobijenih rezultata termogravimetrijske analize svežeg i osmotski osušenog svinjskog mesa dobijeni gubici mase se slažu sa literaturnim podacima. Tako su Deydier i radnici (*Deydier et al 2005*) TGA analizom našli da prvi gubitak do 180°C odgovara isparavanju vode, drugi gubitak zabilježen u temperaturnom rasponu od oko 180 do 300°C predstavlja



isparavanje jedinjenja male molekulske mase i/ili reakcije razlaganja. Sledeći gubitak mase u temperaturskom opsegu od 250°C do 500°C, je takozvani stepen sagorevanja gde se sva organska materija razlaže do H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> itd. Određeni procenat ostatka predstavnja pepeo. Dobijeni rezultati termalne anize svežeg i osmotski dehidratiranog svinjskog mesa ukazuju na slične strukturne promene mesa koje se dešavaju pri osmotskoj dehidraciji melasom šećerne repe kao i pri tretiranju mesa osmotskim rastvorima koji se sastoje od različitih soli (Marchetti et al 2013, Matinez-Alvarez i Gomez-Guillen 2006).

#### 4.1.2. Izotermalna DSC i TGA kalorimetrija osmotski sušenog svinjskog mesa

Izotermalnim tretmanom osmotski sušenog svinjskog mesa DSC i TGA termalnim tehnikama eksperimentalno je dodatno pokazano da može da se pretpostavi da ova dva energetska različita stepena jačine vezivanja vode odgovaraju **nivou energetska jače (strukturni nivo II) i energetska slabije vezane (Strukturni nivo III) imobilizirane, nepokretne vode**. Na Slici 23. prikazane su a) DSC kriva i b) TGA kriva dobijene pri izotermalnom tretmanu osmotski sušenog svinjskog mesa na 30°C u toku 40 min, a posle čega je nastavljeno snimanje DSC do 120°C i TGA do 700°C.

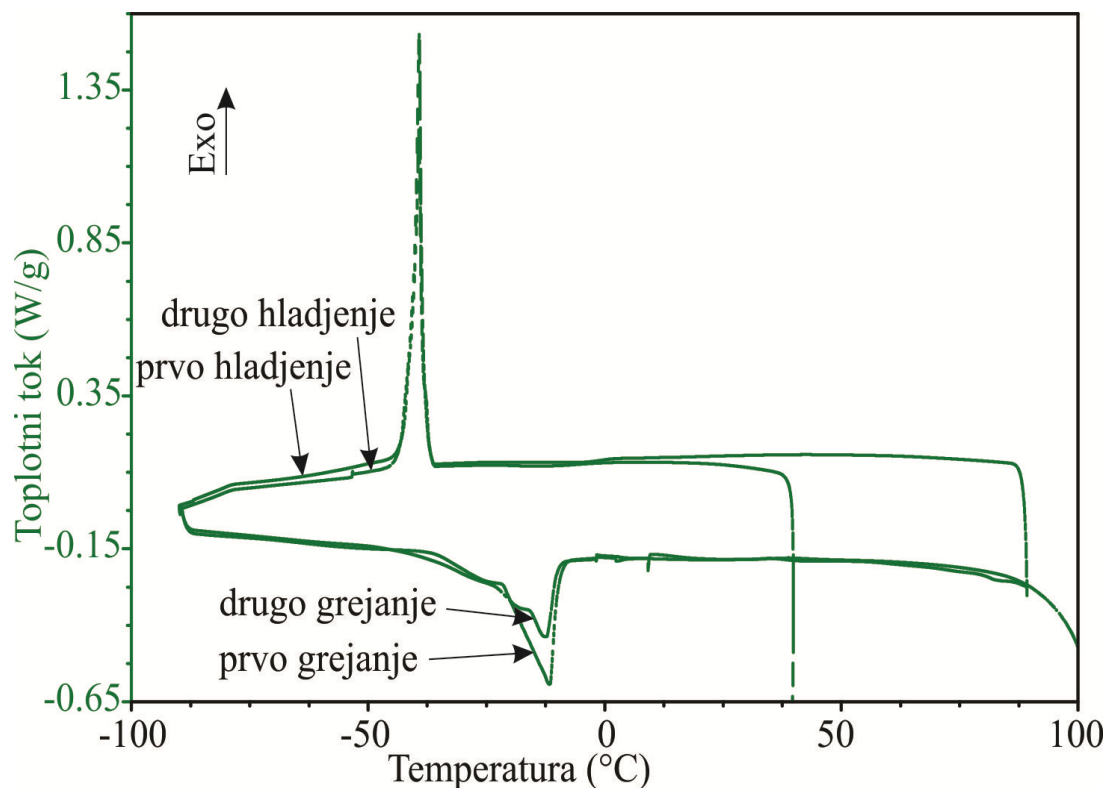


**Slika 23.** su a) DSC kriva i b) TGA kriva dobijene pri izotermalnom tretmanu osmotski sušenog svinjskog mesa na 30°C u toku 60 min, posle čega je nastavljeno snimanje DSC do 120°C i TGA do 700°C, pri brzini snimanja (Hr 5°C/min).

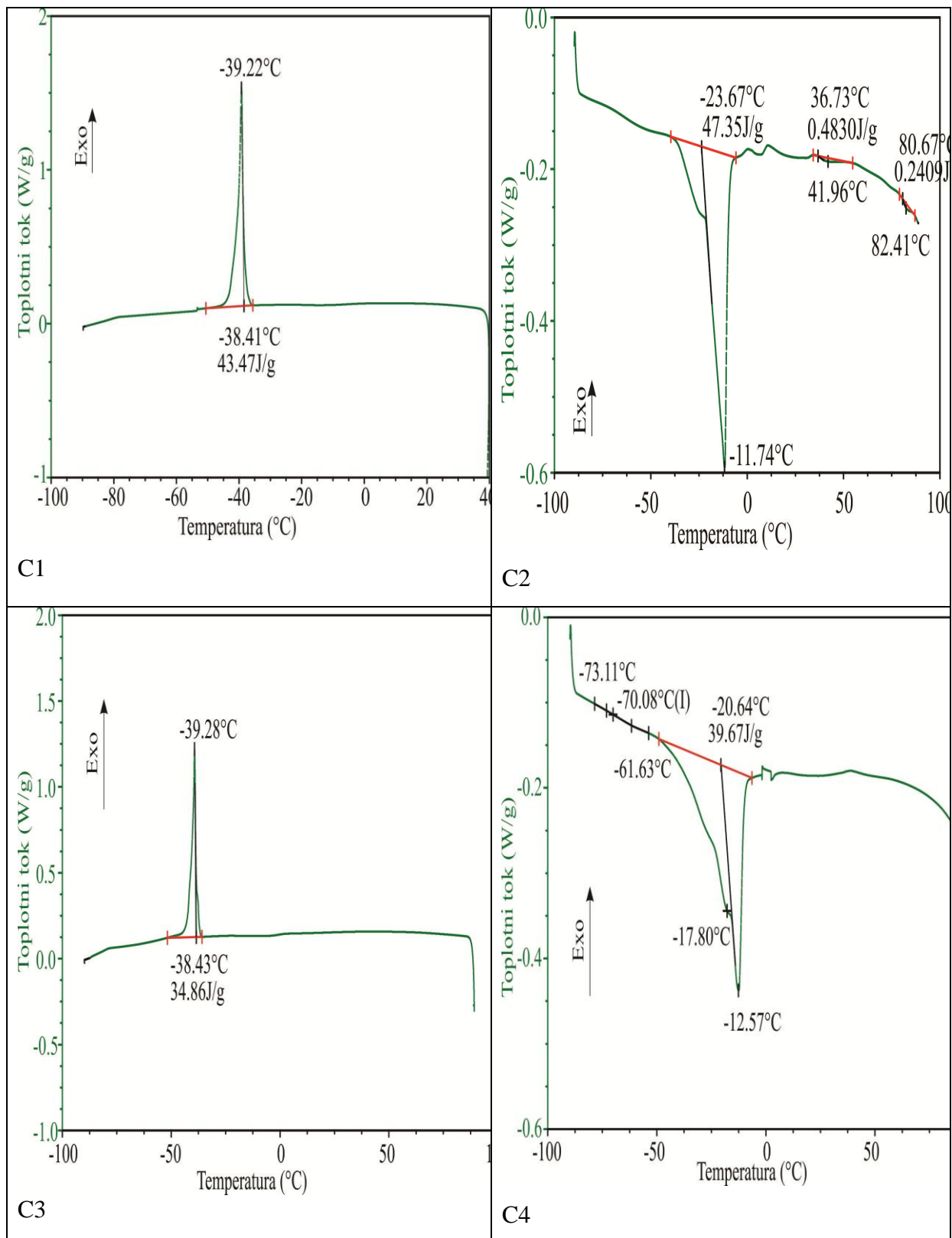
Očigledno je da pri izotermalnom tretmanu dolazi do gubitka dela slabije vezane vode, u ovom slučaju pri uslovima temperature od 30°C u vremenu od 40 min, gubitak slabije vezane vode, **strukturni nivo III**, iznosi oko 31.1%, dok je jače vezana voda **Strukturni nivo II**, prisutna u količini od 8.5% (Slika 21. b) TGA kriva).

#### 4.2. Ciklično zagrevanje i hlađenje osmotski sušenog svinjskog mesa DSC metodom

Cikličnim zagrevanjem i hlađenjem osmotski dehidratisanog svinjskog mesa, u temperaturskom opsegu od -90°C do 100°C, u hermetički zatvorenim čančićima, pokazano je da pri ponovljenom zagrevanju uzorka osmotski osušenog mesa (Slika 24. i Slika 25.C4) dolazi do promena endotermnog procesa topljenja vode. Može da se vidi da endotermni prelaz koj odgovara topljenju vode u uzorku, postaje jos složeniji ('rame' na -17°C, kojeg nema u prvom zagrevanju (Slika 25, C2) gde postoji samo rame na oko -14 °C, što ukazuje na dvostepenski proces koncentrovanja uzorka (*Bchir et al. 2009*), a opet ukazuje na strukturne promena i reorganizacijuproteinske osnove. To dalje pokazuje da dolazi do restrukturiranja usled promena u odnosu jače i slabije vezane vode (**strukturni nivo II i strukturni nivo III**)



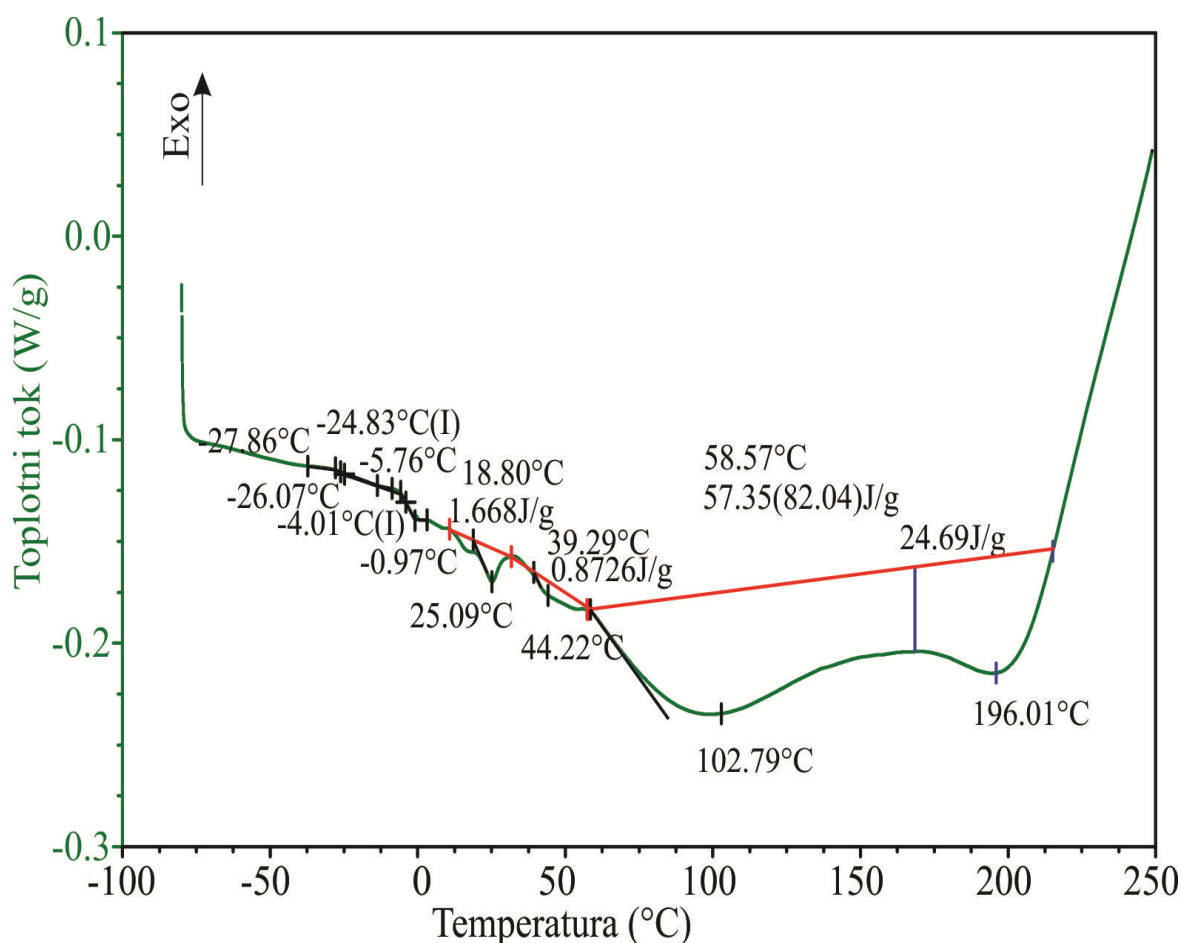
**Slika 24.** DSC krive cikličnog hlađenja i grejanja osmotski sušenog svinjskog mesa, zajednički prikaz svih ciklusa hlađenja i grjeanja.



**Slika 25.** DSC krive cikličkog hlađenja i grejanja osmotski sušenog svinjskog mesa u hermetički zatvorenim aluminijumskim čančićima: C1-hlađenje od 40°C do -90°C, Cr=5°C/min; C2-grejanje od -90°C do 90°C, Hr=5°C/min; C3- hlađenje od 40°C do -90°C, Cr=5°C/min; C4-grejanje od -90°C do 90°C.

### 4.3. DSC i TGA analiza svežeg mlevenog i osmotski, u meslasi osušenog mlevenog svinjskog mesa

Na Slici 26 prikazan je DSC termogram svežeg mlevenog svinjskog mesa u otvorenim aluminijumskim čančićima u temperaturnom opsegu od  $-90^{\circ}\text{C}$  do  $250^{\circ}\text{C}$ , a na Slici 27. dat je DSC termogram osmotski dehidratiranog mlevenog svinjskog mesa u otvorenim aluminijumskim čančićima. Temperaturni opseg bio je  $-90^{\circ}\text{C}$  do  $250^{\circ}\text{C}$ . Uspoređivanjem sa odgovarajućim DSC termogramima dobijenim za sveže i osmotski dehidratirano svinjsko meso, očigledna je razlika termalnih karakteristika. Ove razlike su proizašle zbog usitnjavanja i mlevenja svežeg mesa, čime su izazvane značajne promene strukture, kidanje strukturnih formacija mesa ektrafibrilarne i interfibrilarne mreže i samih miofbrila. Ove promene mogu da dovedu i do delimičnog kidanja miozina što dovodi do disocijacije miozinskih teških lanaca (*Thorarinsdottir et al 2002*). Pri tome dolazi do značajnih promena u sadržaju vode u ovakvom mesu (*Bertram et al 2002*), te dolazi do značajnog gubitka vode iz ektrafibrilarnog prostora. O tome svedoče TGA krive dobijene za sveže i osmotski dehidratirano meso Slike 27. i 28. Tako količina prisutne vode u svežem mlevenom mesu iznosi 6.2%, što je velka razlika u poređenju sa sa svežim svinjskim mesom gde je količina vode oko 75%. Isto tako osmotski dehidratirano mleveno svinjsko meso sadrži 3.6% vode (Slika 28), pa iz ovih razlika potiču i strukturne razlike proteinske osnove i termalna svojstva kao što je vidljivo iz DSC krivih svežeg i osmotski sušenog svinjskog mesa Slike 25. i 26.



**Slika 26.** DSC krive svežeg mlevenog svinjskog mesa u otvorenim aluminijumskim čačićima.

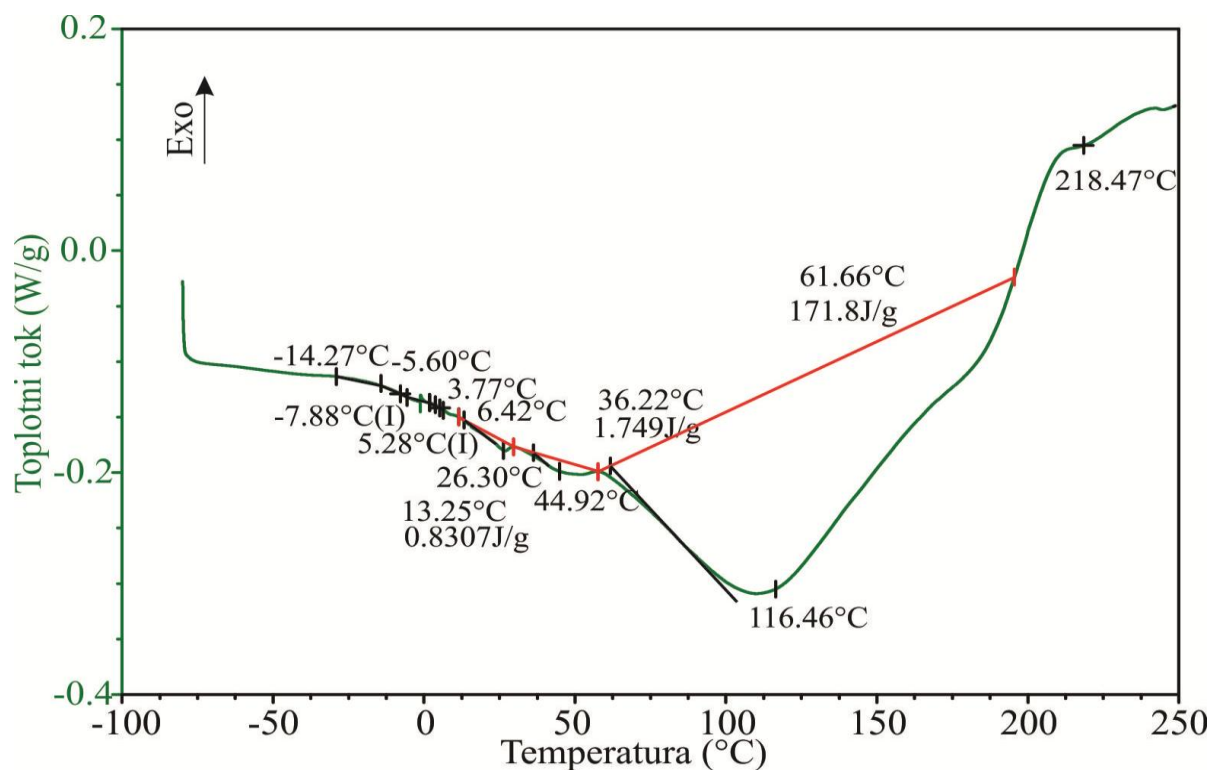
Na DSC krivoj svežeg mlevenog mesa vidljiva su dva staklasta prelaza ( $T_{g1}$  i  $T_{g2}$ ) na temperaturi  $-24.8^{\circ}\text{C}$  i  $-1.3^{\circ}\text{C}$ , za kojima slede endotermni prelazi na  $25^{\circ}\text{C}$  i  $44^{\circ}\text{C}$  a zatim preovlađujući dvosložni endotermni prelaz s minimumima temperatura na  $102^{\circ}\text{C}$  i  $196^{\circ}\text{C}$ . Staklasti prelazi potiču od smanjenja količine vode u uzorku. Takođe je vidljivo i izostajanje faznog prelaza topljenja leda, što ukazuje na odlike uzorka koji sadrži samo nesmrzavajuću vodu (*unfreezible water*).

DSC kriva dobijena za sveže mleveno meso veoma liči na DSC krivu koju su dobili Fernández-Martín (Fernández-Martín et al 2009) takođe za mleveno svinjsko meso u temperaturskom opsegu od  $10^{\circ}\text{C}$  do  $90^{\circ}\text{C}$ .

Karakteristična razlika u početnoj temperaturi smrzavanja (Lind 1991, Cheng et al 2014) za sveže i osmotski dehidratirano meso prethodno opisana, u ovom slučaju (mleveno meso) nepostojanja slobodne vode u uzorcima mesa, „zamenjuje“ karakterističan pomak

temperature staklastog prelaza  $T_g$ , ka višim temperaturama pri smanjenju vlage (*Telis i Sobrai 2002, Sunooj et al 2009*), koji se vidi iz DSC krivih svežeg mlevenog mesa i osmotski dehidratiranog mlevenog mesa.

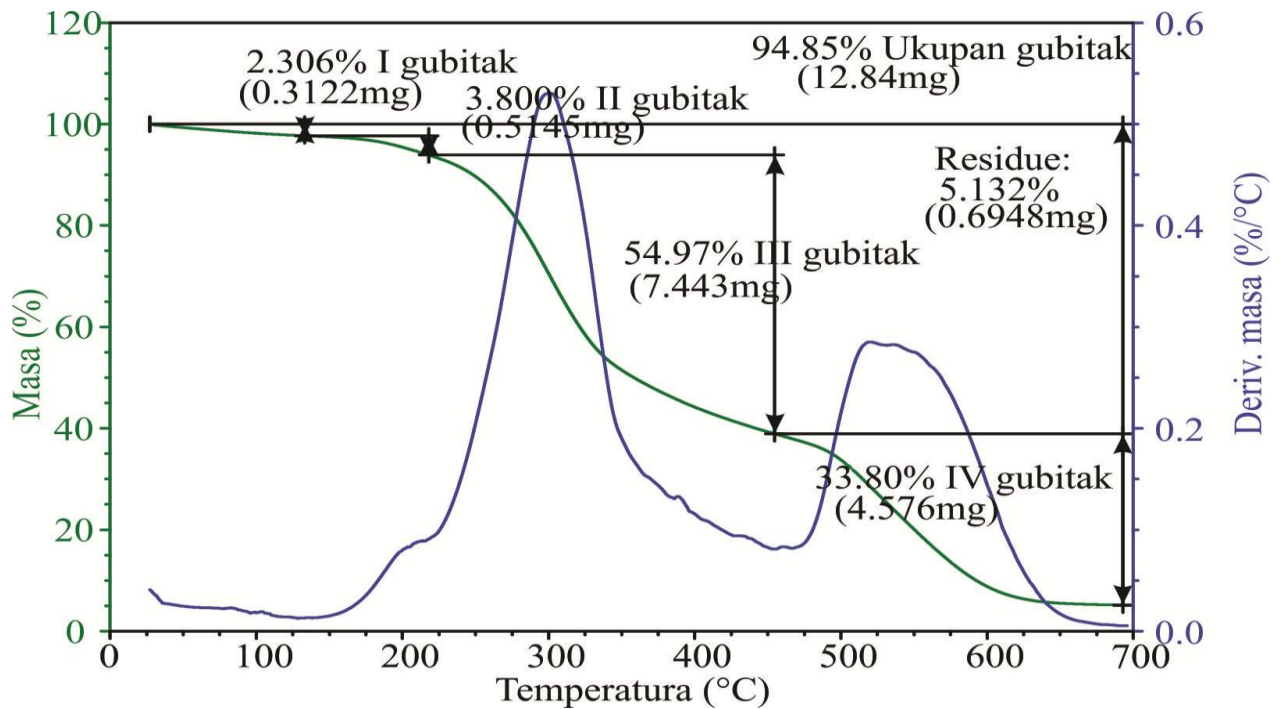
Pored toga, Marchetti i saradnici (*Marchetti et al 2013*) pokazali su da dodatkom soli u smešu mlevenog mesa dolazi do smanjenja termalne stabilnosti miofibrilarnih proteina. To dovodi da se termalna denaturacija miozina i aktina približavaju te da dolzi do pojave jednog termalnog endotermonog prelaza. Ovaj prelaz odgovara uglavnom denaturaciji aktina, kao što je nađeno u literaturi (*Kijowski & Mast, 1988; Graiver et al, 2006*) i što je takođe dobijeno iz DSC rezultata mlevenog mesa u ovom radu (Slika 27).



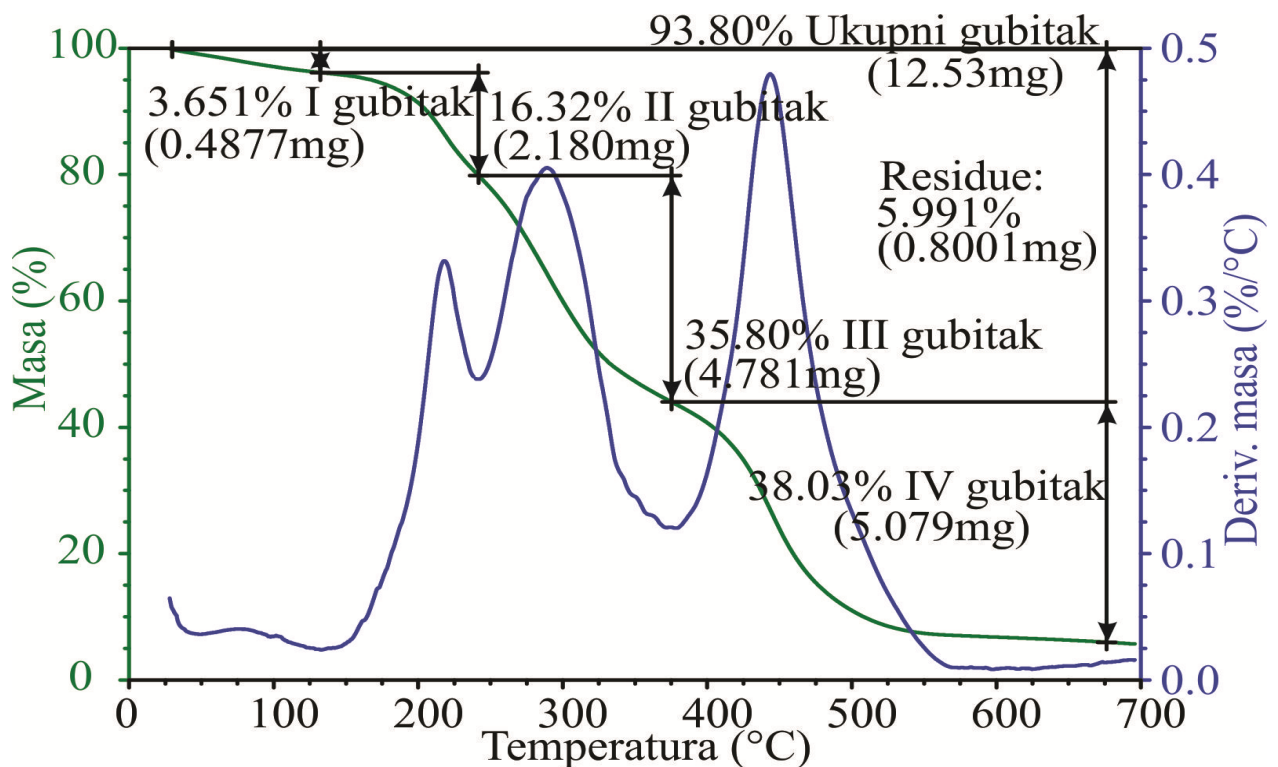
**Slika 27.** DSC kriva osmotski dehidratiranog mlevenog svinjskog mesa u otvorenim aluminijumskim čančićima.

Iz TGA krivih svežeg i osmotski dehidratiranog mesa (Slike 28 i 29) vidljiva je značajna promena količine i jačine vezivanja vode u svežem mlevenom mesu i osmotski dehidratiranom mlevenom mesu. Tako su u svežem mlevenom mesu vidljiva dva stepena gubitka vode (prvi gubitak 2.3% i drugi gubitak 3.9%), koji odgovaraju jače i slabije vezanoj nesmrzavajućoj vodi (nema prelaza koji odgovara topljenju leda na DSC krivima).





**Slika 28.** TGA d TG krive svežeg mlevenog svinjskog mesa. Temperaturski opseg 25°C do 700°C.



**Slika 29.** TGA d TG krive osmotski sušenog mlevenog svinjskog mesa. Temperaturski opseg 25°C do 700°C.

Kod osmotski sušenog mlevenog mesa gubitak vode je 3.6%, i odvija se jednostepeno, što ukazuje na homogeni karakter vezane nesmrzavajuće vode prisutne u ovom uzorku. Dalji

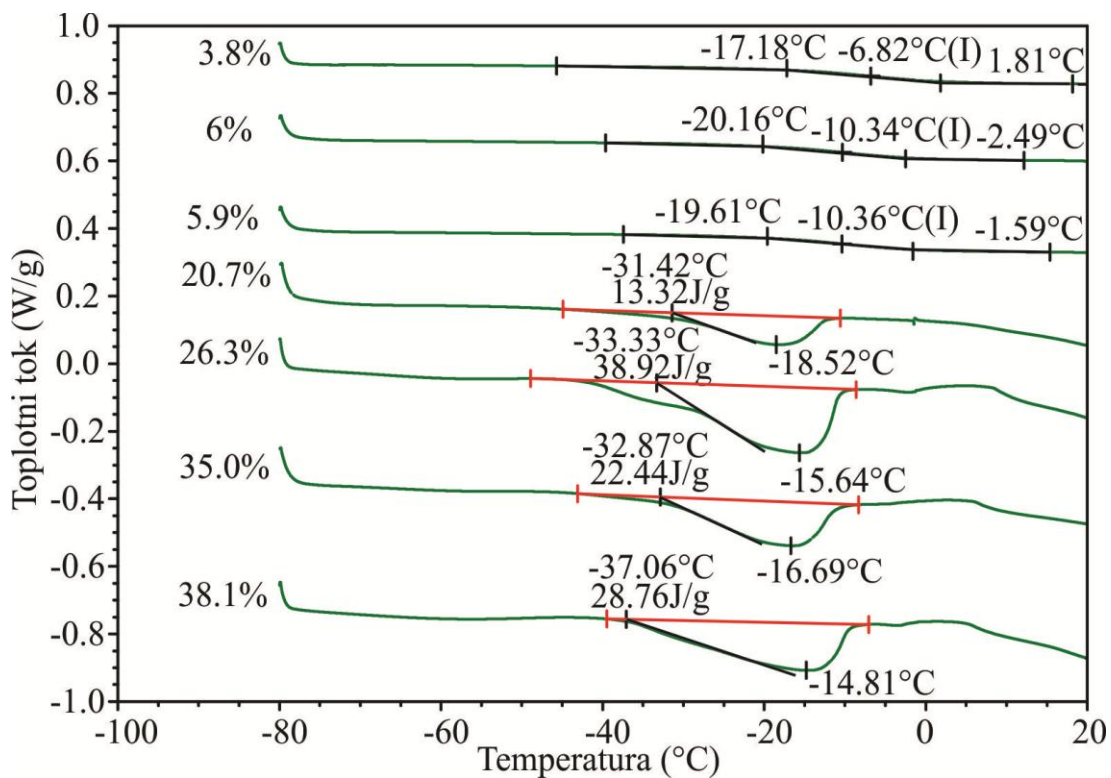
gubici mase do, oko 400°C i 600°C potiču od dvostepene potpune termalne razgradnje uzoraka (Deydier et al 2005). Dobijeni rezultati termogravimetrijske analize u potpunosti potkrepljuju rezultate dobijene DSC analizom.

#### **4.4. Staklasti prelaz osmotski dehidratiranog svinjskog mesa u melasi šećerne repe i svežeg svinjskog mesa**

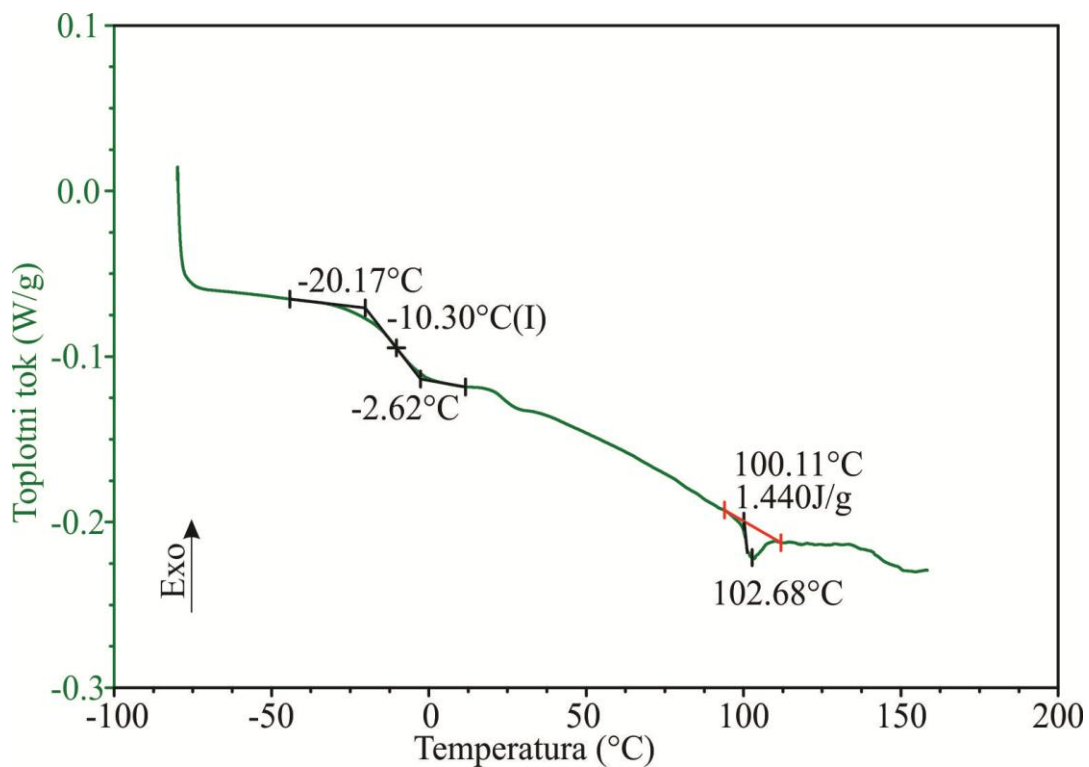
Termalno ponašanje uzoraka svinjskog mesa prikazano je na Slikama 19.a), b) i 20. .a), b). Sveže svinjsko meso s procentom vlage oko 75% karakteršu tri endotermna prelaza dobijena na DSC krivoj sa minimumima na -0.3 °C, 69 °C i 93 °C, kao što je već objašnjeno. Prvi predstavljaja topljenje leda, drugi endotermni prelaz s temperaturskim minimumom na 69°C je isparavanje vode i denaturacija proteina mesa i to proteina kolagena (Stabursvik and Martens, 1982) sa ukupnom entalpijom prelaza  $\Delta H$  970 J/g (Cofrades, & Jiménez-Colmenero, 2009). Treći pik predstavlja denaturaciju aktina (Stabursvik i Martens, 1980, Tornberg, 2005, Marchetti et al 2013). Osmotskom dehidratacijom dolazi do smanjenja količine vode u mesu tako da je dobijeno osmotski dehidratirano meso sa 38.1% vlage Slikma 18. b). Smanjenje entalpije prelaza koji odgovara isparavanju vode i denaturaciji proteina mesa u uzorku osmotski dehidratiranog mesa u odnosu na sveže svinjsko meso, potiče od smanjenja količine vode u uzorku dobijenom osmotskom dehidratacijom. Ovaj prelaz, u temperaturskom opsegu od 30-100 °C, kako su pokazali Marchetti i saradnici (Marchetti et al 2013) kod mesa tretiranog rastvorima soli dovodi i do smanjenja termalne stabilnosti miofibrilarnih proteina. Zbog toga se temperature miozina i aktina približavaju, dajući praktično jedan endotermni prelaz, sa eventualnim pojavljivanjem „ramena“ na temperaturi od oko 52°C (Fernández-Martín, López-López 2009). Slične termalne odlike su dobijene i za svinjsko meso osmotski dehidratirano u melasi šećerne repe, Slika 19. b).

Osmotski dehidratirano meso je podvrgnuto daljem sušenju na sobnoj temperaturi. Dobijeni su uzorci sa smanjenom količinom vlage i to sa 38, 35, 26, 20, 6 i 3,8% vlage. Ovi uzorci su podvrgnuti termalnoj analizi. Na Slikama 30. 31. i 32 prikazane su DSC i TGA krive uzoraka osmotski dehidratiranog mesa s različitim procentima vlage. U Tabeli 6. prikazani su rezultati dobijeni iz DSC i TGA krivih.

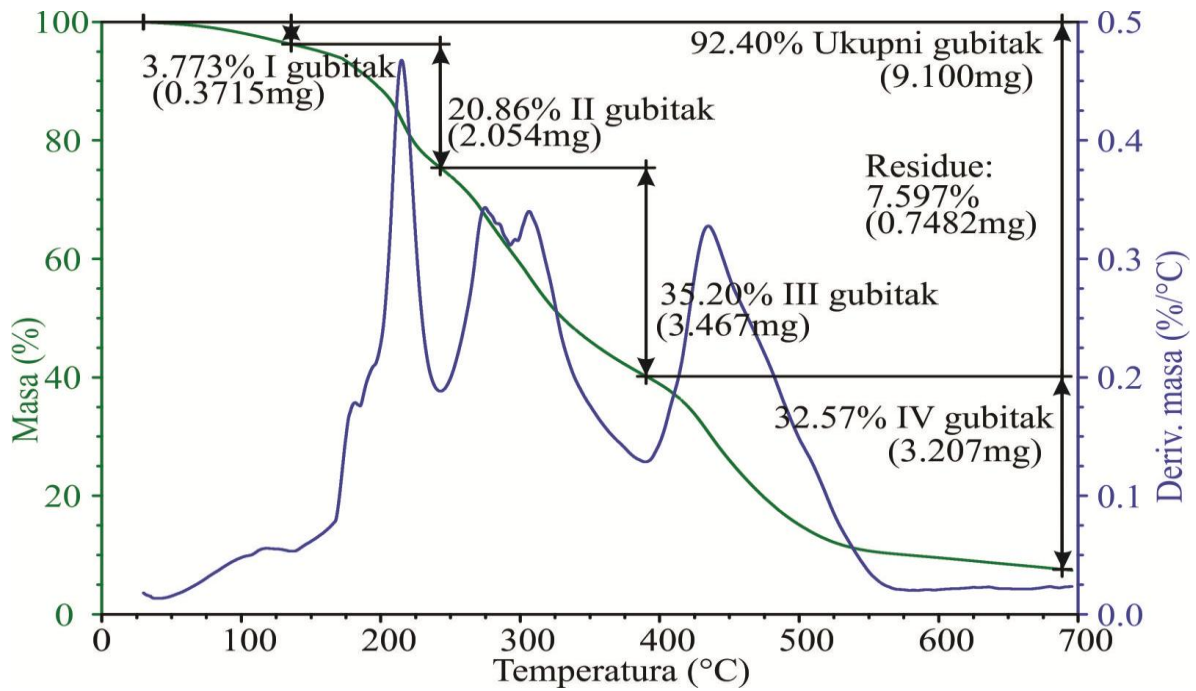




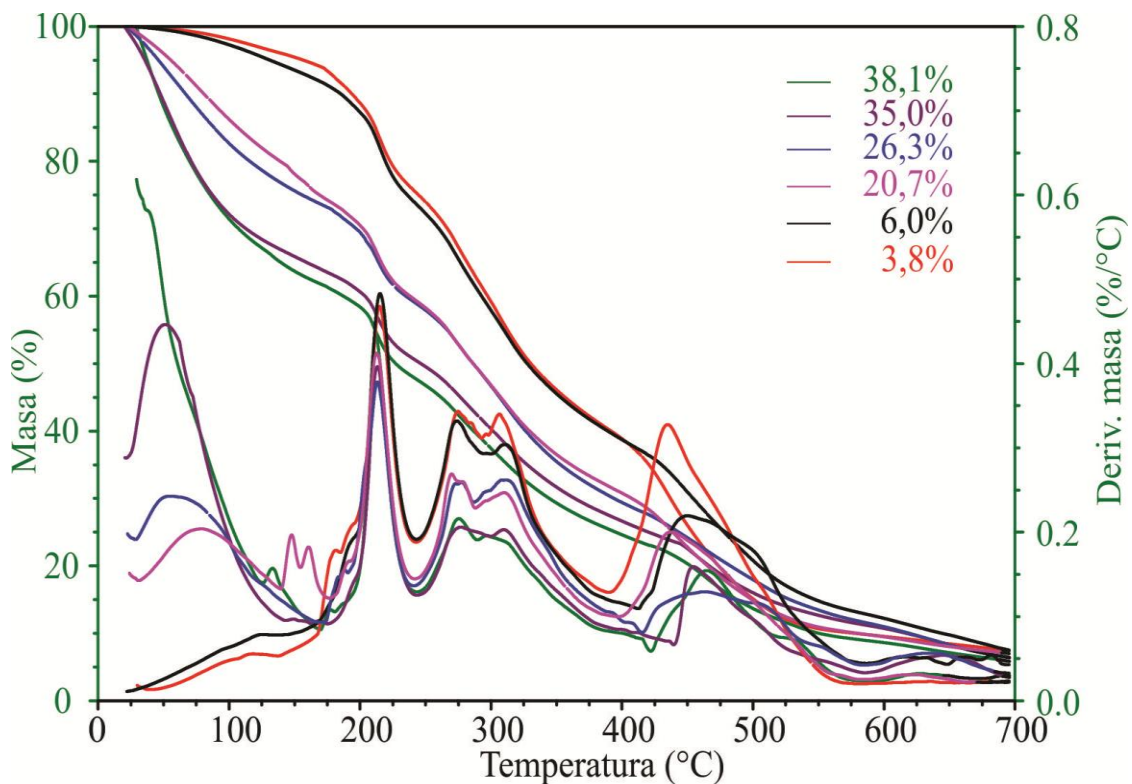
**Slika 30.** DSC krive uzoraka osmotski dehidratiranog mesa s različitim procentima vlage: 38.1%; 35.0%; 26.3%; 20.7%; 5.9%; 6.0% i 3.8%.



**Slika 31. a)** Tipična DSC kriva osmotski dehidratiranog i dosušenog svinjskog mesa sa malim procentom vlage (<20% )



**Slika 32. b)** Tipična TGA kriva osmotski dehidatisanog i dosušenog svinjskog mesa s malim procentom vlage (<20%).



**Slika 33.** TGA i dTG krive uzoraka osmotski dehidatisanog mesa sa različitim postotcima vlage: 38.1%; 35.0%; 26.3%; 20.7%; 5.9% i 3.8%.

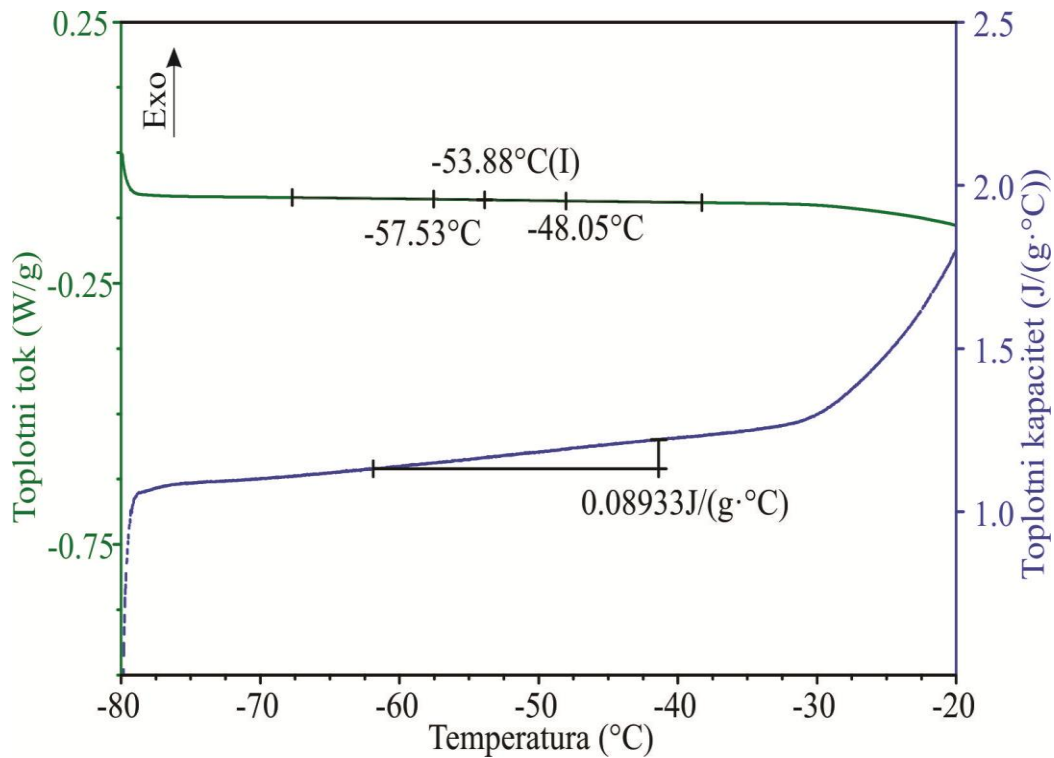
**Tabela 6.** Vlaga, temperature staklastog prelaza ( $T_o$ ,  $T_g$  i  $T_{end}$ ), topljenje leda i aktivnost vode osmotski osušenog svinjskog mesa sa smrzavajućom (*freezable*) i nesmrzavajućom (*unfreezible*) vodom.

Vlaga (%)	$T_o$ (temperatura početka staklastog prelaza) (C°)	$T_g$ (temperatura staklastog prelaza) (C°)	$T_{end}$ (temperatura kraja staklastog prelaza) (C) °	$\Delta C_p$ (Toplotni kapacitet staklastog prelaza) (J/g)	Topljenje leda (C) °	$a_w$ (aktivnost vode)
<b>38.10</b>	-	-	-	-	<b>-37.0±0.9</b>	<b>0.745</b>
<b>35.02</b>	-	-	-	-	<b>-32.8±1.0</b>	<b>0.732</b>
<b>26.28</b>	-	-	-	-	<b>-33.3±0.8</b>	<b>0.724</b>
<b>20.70</b>	-	-	-	-	<b>-31.4±1.0</b>	<b>0.720</b>
<b>5.90</b>	<b>-20.2±3.0</b>	<b>-10.3±1,1</b>	<b>-2.62±2.5</b>	<b>0,728±0.020</b>	-	<b>&lt;0.7*</b>
<b>3.77</b>	<b>-17.2±3.1</b>	<b>-6.8±1.0</b>	<b>-1.81±2.7</b>	<b>0.721±0.015</b>	-	<b>&lt;0.7*</b>

\* nije moguće odrediti pomoću tehnika termalne analize.

Vidljiva odlika uzoraka osmotski dehidratiranog mesa sa smanjenom količinom vlage, ispod 20% je pojavljivanje staklastog prelaza ( $T_g$ ) (Slike 30 i 31). U uzorcima s vlagom iznad 20% vidi se pomeranje temperature topljenja leda karakteristično za uzorke koji imaju smrzavajuću vodu. Očigledno je pomeranje temperature staklastog prelaza s različitim sadržajem vlage u uzorku. Tako pri smanjenju procenta vlage dolazi do pomeranja staklastog prelaza ka većim temperaturama (Slika 30 i Tabela 6).

Dalje smanjenje vlage u osmotski dehidratiranom mesu od 20% do 3.7% dovelo je do promena u materijalu i termalnog ponašanja uzoraka karakterističnog za materijale koji sadrže nesmrzavajuću vodu (*Shia et al., 2009, Sablani et al, 2007, Delgado and Sun, 2002, Rahman et al., 2003, Fan i Roos, 2016*). Pošto je najveći deo vode vezan za čvrstu proteisku osnovu uzorka mesa uzorci osmotski dehidratiranog svinjskog mesa, s vlagom ispod 20%, pokazali su postojanje staklastog prelaza.



**Slika 34.** DSC kriva sa određenim staklastim prelazom ( $T_g$ ) svežeg svinjskog mesa.

Staklasti prelaz u svežem svinjskom mesu (Slika 33.) nađen je kod svežeg svinjskog mesa koje je smrznuto na  $-90^{\circ}\text{C}$ , uravnoteženo na toj temperaturi i zatim snimano brzinom  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Određene karakteristične temperature staklastog prelaza iznose  $T_0 = -57.53^{\circ}\text{C}$ ,  $T_g = -53.88^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{end}} = -48.05^{\circ}\text{C}$  i  $\Delta C_p = 0.089 \text{ J/g}$ .

Stkalasti prelaz ( $T_g$ ) je termodinamički prelaz drugog reda. Njegov značaj je u praćenju promene svojstava materijala s promenom temperature u vremenu, kao i značaj u prepoznavanju stanja vode koja je prisutna u uzorku. Pokretljivost molekula kod materijala je značajno smanjena ispod temperature staklastog prelaza, zbog čega se postiže i produžena trajnost (zbog usporavanja negativnih procesa, kao što su gubitak teksture, enzimsko kvarenje, gubitak ukusa) pri čuvanju na temperaturama ispod staklastog prelaza  $T_g$ . (Mitchell, 1998, Guizani et al., 2010). Autori Levin i Slade su prvi pokazali da temperature staklastog prelaza ( $T_g$ ) utiču na na stabilnost matriksa hrane (Levine i Slade 1986, Slade i Levine 1988), pošto na temperaturama ispod  $T_g$  voda koja se nalazi u koncentrovanoj fazi postaje kinetički nepokretna i ne učestvuje u reakcijama (Rahman, 2006 Akkose et al 2008).

Kasnije je to dovelo do tzv. koncepta staklastog prelaza koji je, uz već postojeći koncept aktivnosti vode davao sveobuhvatniju sliku o stabilnosti hrane (*Sunoj et al 2009, Rahman et al., 2003; Sablani et al., 2007 Rahman 2006, Tolstorebrov et al 2014, Lee A. L. i Wand 2001*).

Temperatura staklastog prelaza svežeg svinjskog mesa određena u ovom radu iznosi  $-53.9 \pm 1.0^\circ\text{C}$ . Literaturnih podataka za staklasti prelaz svežeg mesa je relativno malo. Većina autora je za staklasti prelaz svežeg mesa odredila niske temperature. Na primer za teletinu, između od  $-40^\circ\text{C}$  i  $-60^\circ\text{C}$  (*Akkose 2009*), osim Levina i Brake (*Levine & Slade 1989, i Brake & Fennema 1999*). Tako su nađene vrednosti za temperaturu staklastog prelaza sveže teletine,  $T_g = -60^\circ\text{C}$  koju su odredili Rasmussen i saradnici (*Rasmussen, 1969*),  $T_g = -40^\circ\text{C}$  Simatos i saradnici (*Simatos 1975*), Levin i Slade su našli  $T_g > -5^\circ\text{C}$ , (*Levine i Slade, 1989*), a Brake i Fennema su odredili da je  $T_g = -12^\circ\text{C}$  (*Brake & Fennema, 1999*). Za sveže meso ribe nađeno je da se temperatura staklastog prelaza kreće na veoma niskim temperaturama između  $-83^\circ\text{C}$  i  $-53^\circ\text{C}$  (*Tolstorebrov 2014, Orlien et al., 2003; Rahman et al., 2003; Shi et al., 2009*). Staklasti prelaz za meso tune iznosio je između  $-71^\circ\text{C}$  i  $-68^\circ\text{C}$  kako su našli Inue i Ishikawa (*Inue 1997*). Podataka o temperaturi staklastog prelaza za svinjsko meso je veoma malo. Hansen i saradnici (*Hansen et al 2003*) su proučavali mobilnu fazu rastvorka u smrznutom svinjskom mesu (*Longissimus dorsi*) pomoću elektron-spin rezonantne spektroskopije (EPR) i dali dokaze za postojanje staklastog prelaza na temperaturi od  $-55^\circ\text{C}$  što je veoma blisko temperaturi staklastog prelaza određenoj za sveže svinjsko meso (*Longissimus dorsi*) u ovom radu DSC tehnikom, koja iznosi  $T_g = -53.9 \pm 1.0^\circ\text{C}$ .

Poznato je da je u vodenom sistemu (sveže meso sadrži oko 75% vode) pojava staklastog prelaza moguća na temperaturama nižim od temperature kristalizacije (*Ruiz-Cabrera i Schmidt 2015, Ogawa i Osanai 2012, Suzuki i Franks 1993*), te da staklasti prelaz  $T_g$  zavisi od koncentracije rastvorka prisutnog u smrzavanjem koncentrovanoj fazi (*Inue 1997*). Gledano sa fizičko-hemijskog stanovišta može da se zaključi da pojava staklastog prelaza kod svežeg mesa isključivo zavisi od uslova termalnog tretmana mesa koji omogućavaju maksimalno koncentrovanje smrzavanjem na nekoj temperaturi. Tako izazvane strukturne pojave dovode do reorganizacije materijala i pojave staklastog prelaza (*Orlien 2003, Rahman 2003, Simatos 1995 Roos and Karel 1991, Sahagian and Goff, 1994*). Određivanje staklastog prelaza u materijalima sa velikim sadržajem vode je složen process, koji zahteva određene eksperimentalne uslove karakteristične za pojedine vrste materijala (*Jin-Hong Zhao, 2015*). Pokazano je da pri odgovarajućoj proceduri odgrevanja (*anealing*) u uskom

temperaturskom opsegu između temperature staklastog prelaza i temperature početka topljenja dovodi do zakasnele, odgođene kristalizacije (*Sahagian and Goff 1994, Zhao, 2015*).

Pri osmotskoj dehidraciji dolazi do gubitka vode u mesu, te do već opisaneog termalnog ponašanja osmotski dehidratiranog mesa. Daljim smanjenjem količine vlage u uzorku dolazi do karakteristične pojave staklastog prelaza u uzorcima s nesmrzavajućom vodom, tako što dolazi do pomeranja  $T_g$  temperature ka višim temperaturama sa smanjenjem procenta vlage u uzorku. Dalje smanjenje vlage u osmotski dehidratiranom mesu, od 20% do 3.7% izazvalo je promene u materijalu i termalno ponašanje uzoraka karakteristično za materijale koji sadrže, nesmrzavajuću vodu (*H. D. Goff 1994, Delgado and Sun, 2002, Rahman et al., 2003, Sablani et al, 2007, da Silva 2008., Shia et al. 2009*). **Pošto je najveća količina vode vezana za čvrstu proteinsku osnovu mesa, uzorci osmotski dehidratiranog svinjskog mesa s vlagom ispod 20%, pokazali su postojanje staklastog prelaza.** Slične su rezultate dobili Venturi i saradnici (*Venturi et al 2007.*) za osušeno pileće meso. Tako, pileće meso sa procentom vlage od 26% i  $a_w$  0.86 nije imalo endotermni pik koji odgovara topljenju leda na DSC krivoj, što znači da uzorak sadrži nesmrzavajuću vodu. U ovom radu, odsustvo endoternnog pika topljenja vode nađeno je u uzorcima koji imaju manje od 20% vlage, a određena aktivnost vode ( $a_w$ ) je manja od 0.720, što su uporedljive vrednosti s rezultatima Venture i saradnika (*Venturi et al 2007.*) pošto je reč o različitim vrstama mesa. **U ovom radu su prvi put nađene i određene temperature staklastog prelaza za sušeno svinjsko meso s vlagom nižom od 20%.**

Temperature staklastog prelaza osmotski dehidratiranog svinjskog mesa koje su nađene u ovom radu pri malom sadržaju vlage, ne mogu da se nađu u literaturi za svinjsko meso pri tako malim procentima vlage, pa može da se kaže da su vrednosti za  $T_g$  osmotski sušenog i dosušenog **svinjskog mesa prvi put određene i date u ovom radu.** Venturi i saradnici (*Venturi et al 2007*) nisu zabeležili pojavljivanje staklastog prelaza kod pilećeg mesa osušenog smrzanjem, pri procentima vlage od 26 do 1% . **Iz toga bi moglo da se zaključi da postojanje staklastog prelaza kod uzoraka s vlagom manjom od 20% kod osmotski osušenog svinjskog mesa u melasi šećerne repe, izaziva posebni sastav osmotskog rastvora - melase šećerne repe čije komponente međusobno reaguju s matriksom mesa i izazivaju tzv. plastifikovanje uzorka** (*Inoue i Ishikawa 1997, Haque 2005*).

S druge strane temperature određenih staklastih prelaza dobijene u uzorcima koji sadrže nesmrzavajuću vodu osmotski dehidratiranog svinjskog mesa (Tabela 6.) su upoređene s temperaturama staklastog prelaza dobijenih za kristale proteina lizozima iz belanceta i konjskog mioglobina (*Inoue i Ishikawa 1997*) pri različitom sadržaju vlage pomoću metode DSC u temperaturskom rasponu od  $-265^{\circ}\text{C}$  do  $28^{\circ}\text{C}$ . Tako je nađeno da  $T_g$  lizozima zavisi od količine vode. Pri procentima vlage većim od 24% temperatura staklastog prelaza lizozima  $T_g$  ostaje nepromenjena i iznosi oko  $-123^{\circ}\text{C}$ . Pri procentima vlage ispod 24%  $T_g$  se povećava sa smanjenjem vlage, te pri procentu vlage od 7.45% iznosi  $-73^{\circ}\text{C}$ . Panagopoulou i saradnici (*Panagopoulou et al 2011*) proučavali su, DSC metodom, ponašanje albumina goveđeg seruma (BSA) u rastvorima i u obliku hidratiranih čvrstih peleta. Staklasti prelaz ovih sistema je nađen pri uslovima kritičnog sadržaja vode koji odgovara prvom sorpcionom sloju, gde su molekule vode direktno vezane na primarna hidrataciona mesta (0.073g vode po gramu suvog proteina).  $T_g$  ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) je nađen kod uzoraka čija je hidratacija niža od one neophodne za kristalizaciju vode za vreme hlađenja -manje od 0.3 grama vode po gramu hidratiranog proteina (*Panagopoulou et al 2011*), što je vrlo blisko vrednosti sadržaja vode dobijenoj u ovom radu, pri kojoj se pojavljuje staklasti prelaz (Tabela 6, Slika 30).

Očigledno su vrednosti dobijene u ovom radu za  $T_g$  svinjskog mesa s niskim procentom vlage, oko 7%,  $T_g = -6.8^{\circ}\text{C}$ , dosta različite u poređenju sa  $T_g$  nađenim za lizozim. **Zbog toga može da se kaže da pri procentima vlage od oko 20% određena u ovom radu, čemu je bliska vrednost 24% vlage koju su dobili Miyazaki i saradnici (*Inoue i Ishikawa 1997*), i niže, dolazi do značajnih promena u stanju i ponašanju vode prisutne u uzorku, tj. do promena ponašanja proteinske osnove kao materijala koji sadrži nesmrzavajuću vodu.** Venturi i saradnici (*Venturi et al 2007*) u svom radu su zaključili da “hidrataciona voda makromolekula i/ili biomembrana je ona čija fizička svojstva postaju različita od od svojstava čiste vode”. Zbog toga dobijeni DSC rezultati za osušeno pileće meso (*Venturi et al 2007*) s vlagom od 30-40% imaju vodu za koju može da se kaže da je “različita od čiste vode”, i zbog male vrednosti  $a_w$  i zbog nemogućnosti smrzavanja na  $0^{\circ}\text{C}$ . Dobijena vrednost 35.9% nesmrzavajuće vode je u opsegu određene vrednosti za pojavu “bulk” vode. Time zaključuju da su i tehnikama DSC i NMR otkrili isti proces hidratacije. Međutim NMR rezultati koje su dobili isti autori (*Venturi et al 2007*) su bili u suprotnosti s DSC rezultatima jer se pokretnija, mobilna voda pojavljuje u opsegu vlage 17-35.9%, za koje DSC rezultati pokazuju nesmrzavajuću vodu. Slična pojava je nađena u skrobnim i celuloznim sistemima i takva voda je nazvana “metastabilnom” (*Li et al 1998*). Venturi i saradnici (*Venturi et al*

2007) daju sledeće objašnjenje: da se voda u pilećem mesu ne smrzava do sadržaja od 35.9% zbog prisustva: I) “malih rastvoraka” (npr. jona), II) prisustva membrana i makromolekula i III) viskoznosti rastvora (Wolfe 2002). Ove pojave onemogućavaju smrzavanje, te da DSC pik topljenja leda nije vidljiv pri količini vlage između 17.2 i 35.9% iako voda zapravo nije vezana (Venturi et al 2007, Panagopoulou et al 2011, Roos i Potes 2015).

Ovakvo objašnjenje može da se primeni i na rezultate dobijene u ovom radu s tim da je **granica procenta vlage pri kojoj dolazi do izostanaka pika topljenja leda na DSC krivoj ispod 20%. To je posledica specifičnog sastava osmotskog rastvora - melase šećerne repe čije komponente međusobno reaguju s proteinskom osnovom mesa.**

S obzirom na dobijene rezultate promene toplotnog kapaciteta  $\Delta C_p$  zabeleženih staklastih prelaza, vidljivo je da nema velikih razlika s obzirom na procenat vlage u uzorku (Tabela 6). Inue je našao da povećanje toplotnog kapaciteta  $C_p$  može da se objasni kao povećanje proporcije ostakljenog materijala (Inoue i Ishikawa 1997). Znači da proporcija raste s povećanjem koncentracije soli, smanjenjem vlage i povećavanjem rastvorne organske materije. To je u saglasnosti s dobijenim rezultatima za sveže ( $\Delta C_p = 0.089 \text{ J/g}$ ) i osmotski sušeno svinjsko meso sa smanjenim procentom vlage ( $\Delta C_p = 0.721 \text{ J/g}$ ). Dobijene izračunate vrednosti za  $\Delta C_p$  (Tabela 6.) u saglasnosti su s dobijenim vrednostima Inue i saradnika (Inoue i Ishikawa 1997.) za meso tunja koje su bile između 0.60 i 0.68 J/g, pri procentu vlage od 14% do 20%.

Dobijeni rezultati za aktivnost vode osmotski sušenog svinjskog mesa dati u Tabeli 6, u poređenju s dobijenim vrednostima Venturi i saradnika (Venturi et al 2007) su manji pri istim procentima vlage. To može da se pripíše prednostima osmotske dehidracije melasom šećerne repe, jer je dobijeno meso s većim procentom vlage, pri smanjenju  $a_w$ , u poređenju s rezultatima Venturi i saradnika (Venturi et al 2007). Ovo uveliko doprinosi kvalitetu dobijenog sušenog proizvoda poboljšanjem bitnih osobina proizvoda kao što su njegova trajnost, tekstura (Ruiz-Ramirez et al 2005).

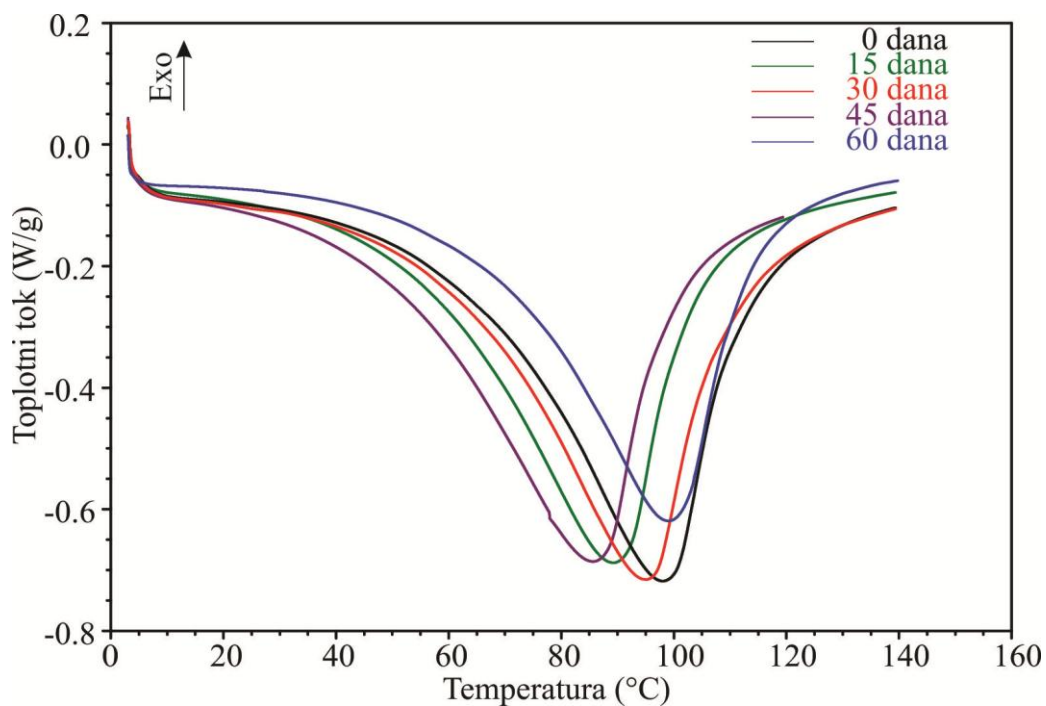
#### **4.5. Praćenje termalne stabilnosti osmotski dehidratisanog svinjskog mesa u vremenu od 60 dana**

Termalna stabilnost u osmotski dehidratisanog svinjskog mesa praćena je u periodu od 60 dana. Dobijeni DSC termogrami i TGA termogrami prikazani su na Slici 34 a) i b). U Tabeli

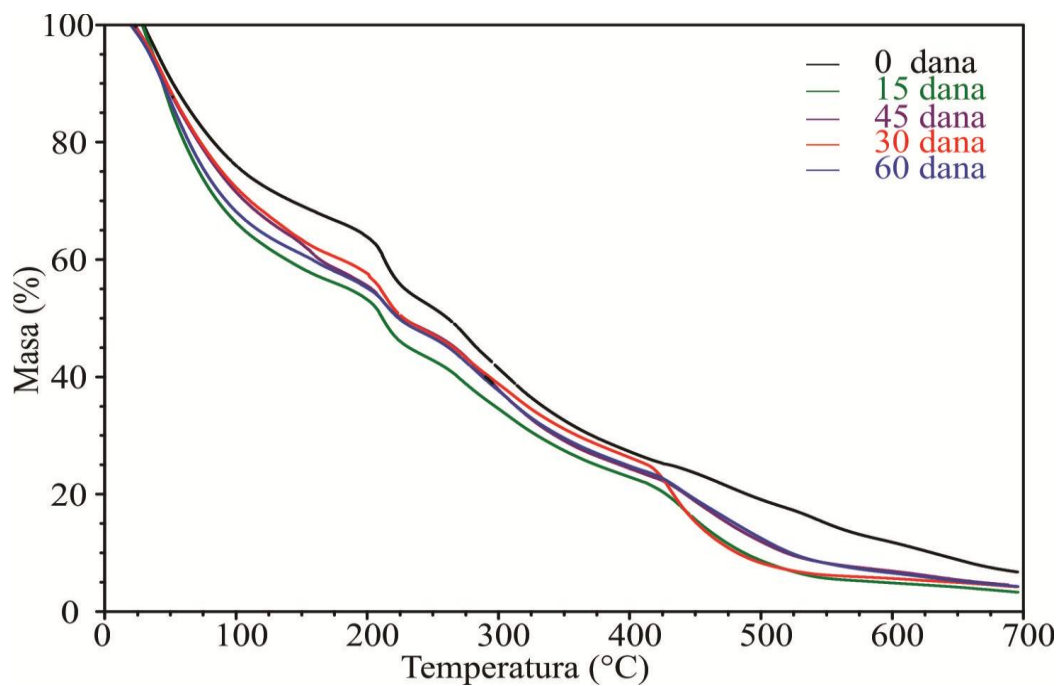


7. prikazani su dobijeni termodinamički parametri termalnih prelaza osmotski dehidratirano i sveže svinjsko meso u vremenu od 60 dana.

a)



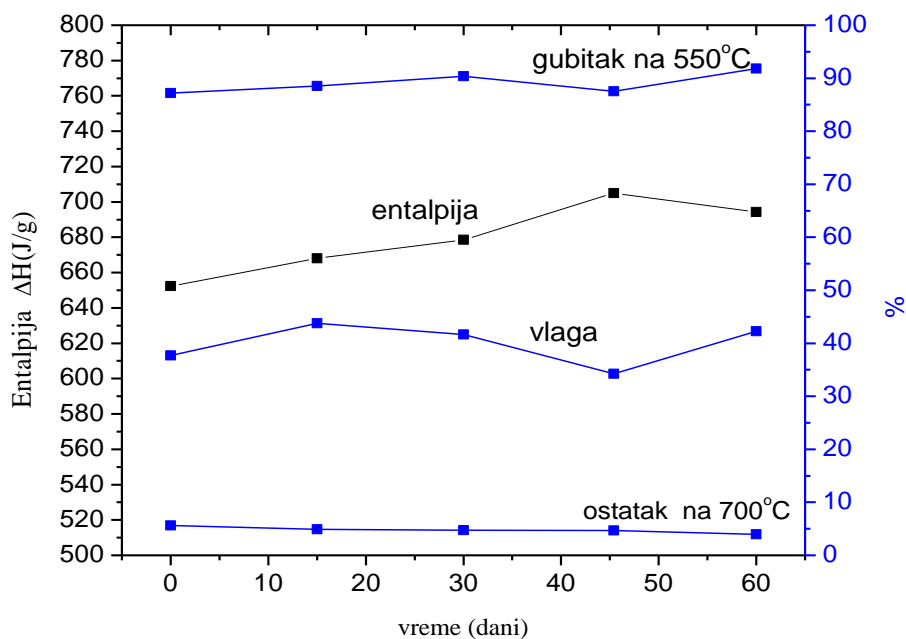
b)



**Slika 34. a)** DSC krive osmotski dehidratiranog svinjskog mesa: **1)** 0 dana, **2)** 15 dana, **3)** 30 dana, **4)** 45 dana **5)** 60 dana ; **b)** TGA krive osmotski dehidratiranog svinjskog mesa: **1)** 7 dana, **2)** 15 dana, **3)** 30 dana, **4)** 45 dana **5)** 60 dana

**Tabela 7.** Termodinamički parametri termalnih prelaza dobijenih za osmotski dehidratirano i sveže svinjsko meso u vremenu od 60 dana.

Vreme (dani)	Temp. početka prelaza $T_o$ (°C)	Temp. pika $T_m$ (°C)	Entalpija $\Delta H$ (J/g)	Vlaga (%)	Ostatak na 700 °C (%)	Aktivnost vode $a_w$
0	53.26	89.30	652.3	37.70	5.65	0.745
15	59.65	95.06	668.1	43.78	4.91	0.729
30	35.36	66.81	678.5	41.66	4.76	0.722
45	59.74	79.68	716.7	34.26	4.67	0.735
60	67.16	99.05	694.3	42.27	3.93	0.742
Sveže meso	27.56	81.92	979.1	70.90	1.45	0.938



**Slika 35.** Promene entalpije prelaza (dobijene DSC analizom), vlage, gubitka na 500°C i ostatka na 700°C dobijenih TGA analizom u toku 60 dana čuvanja uzorka osmotski dehidratiranog mesa na temperaturi od 4°C, upakovanog u modifikovnu atmosferu (30% CO<sub>2</sub> - 70% N<sub>2</sub>).

Praćene su promene termalnih osobina OD mesa u periodu od 60 dana DSC metodom u temperaturskom opsegu od 5°C do 120°C u zatvorenim aluminijskim čančićima. Dobijene entalpije termalnog prelaza koji odgovara gubitku vode i denaturaciji proteina **mesa nisu se značajno menjale u periodu od dva meseca**. To može da se kaže i za dobijene gubitke mase TG analizom koji odgovaraju gubitku vode, termalnoj razgradnji organske materije, (gubitak na 500°C) i pepelu (ostatak na 700°C) (Tabela 7).

Na Slici 35. prikazani su rezultati praćenja promena termalnih osobina osmotski dehidratiranog mesa u periodu od dva meseca.

Aktivnost vode određena u osmotski dehidratiranom mesu takođe se nije značajno menjala u periodu od 60 dana, menjala se u granicama od  $\pm 3\%$ .

Dobijeni rezultati ukazuju na stabilnost proizvoda pri čuvanju u modifikovanoj atmosferi pri temperaturi od 4°C. Šuput i saradnici (*Šuput et al 2013*) su odredili stabilnost osmotski dehidratiranog mesa u melasi šećerne repe, pri istim uslovima, u pogledu mikrobiološke stabilnosti- ukupni mikroorganizmi (TVC) i *Enterobacteriaceae*, fizičko-hemijskih osobina kao što su pH, aktivnost vode, vlaga, količina masti, ugljenih hidrata, oksidativne stabilnosti (merene kao tiobarbiturna kiselina TBA). Takođe su merili boje neposredno posle osmotske dehidratacije i posle 4 nedelje stajanja, što bi odgovaralo rezultatima dobijenim za 30 dana u ovom radu.

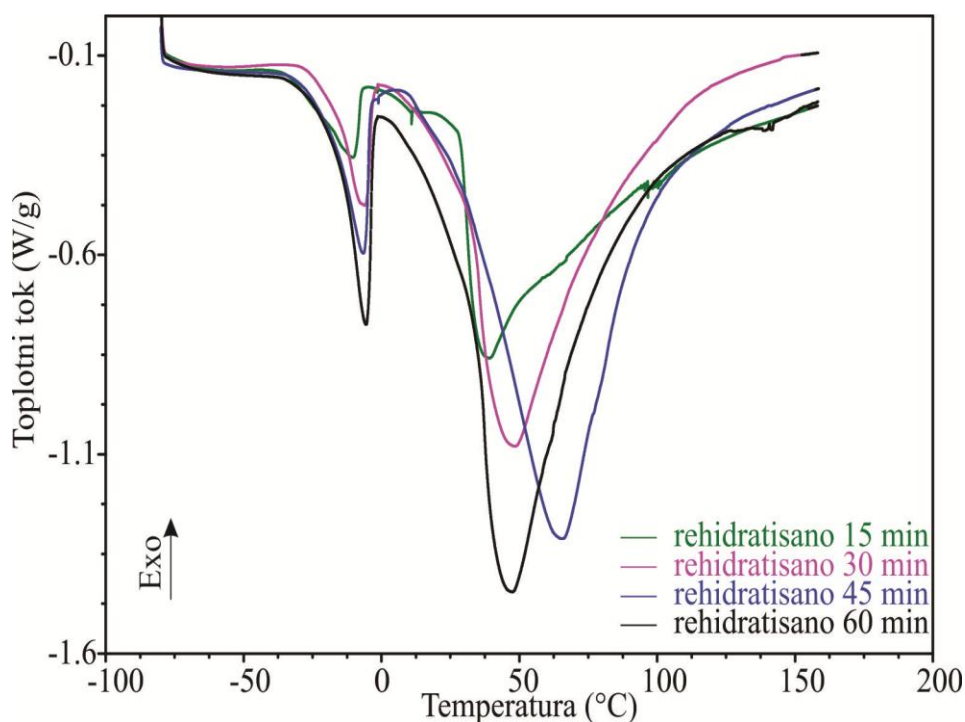
Rezultati o stabilnosti osmotski dehidratiranog mesa dobijeni u ovom radu su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Šuput i saradnici (*Šuput et al 2013*). To **ukazuje da termalna stabilnost može da bude značajan pokazatelj i ostalih činilaca stabilnosti proizvoda, kao što su mikrobiološka stabilnost, aktivnost vode, pH stabilnost i oksidativna stabilnost. Pošto promene izazvane delovanjem mikroorganizama, oksidativne promene kao i promene aktivnosti vode, neminovno izazivaju promene u strukturi osnove hrane. Te promene se ogledaju u promenama termalne stabilnosti i promenama termalnih odlika hrane, pa metode termalne analize mogu da se koriste za brzi “skrining” proizvoda poznatih termalnih osobina.**

## 4.6 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i termogravimetrijska analiza (TGA) rehidratiranog svinjskog mesa

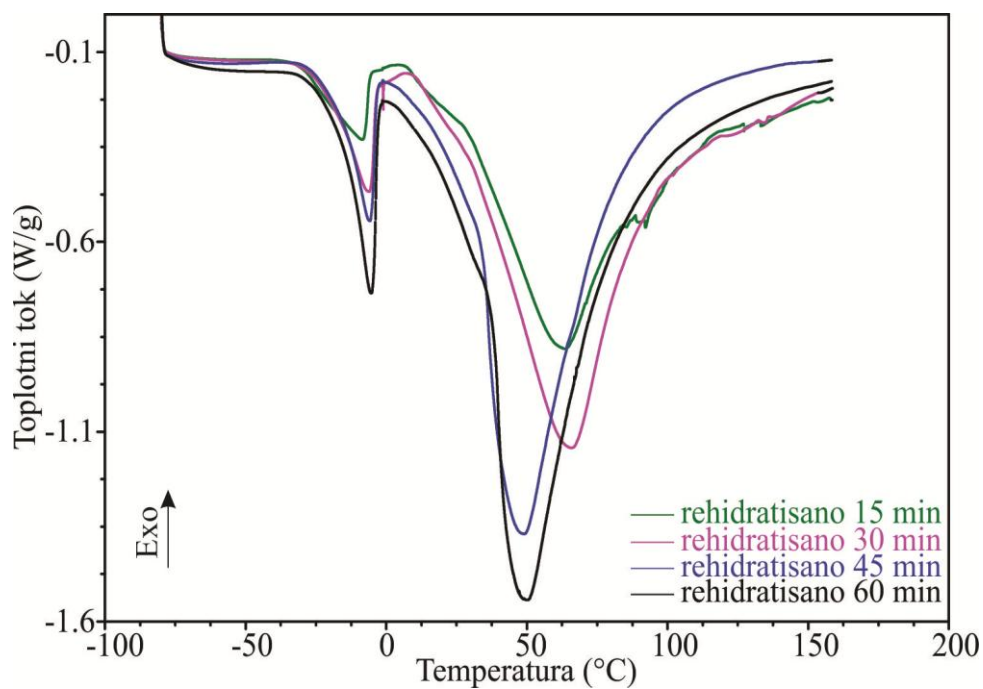
### 4.6 .1. DSC analiza rehidratiranog svinjskog mesa

Osmotski dehidratirano svinjsko meso podvrgnuto je rehidraciji potapanjem mesa u destilovanu vodu. Proces rehidracije je sproveden pri atmosferskom pritisku u laboratorijskim čašama na različitim temperaturama (20°C, 30°C i 40°C), i uz ručno mešanje svakih 5min. Čaše su termostatirane u vodenom kupatilu na zadatim temperaturama. Uzorci rehidratiranog mesa su vađeni posle 15, 30, 45 i 60 min, blago su obrisani upijajućim papirom kako bi se otklonio višak površinske vode, te su podvrgavani termalnoj analizi (DSC i TGA). DSC analiza uzoraka rehidratiranog osmotski dehidratiranog svinjskog mesa, mase 9-13mg, urađena je u otvorenim i hermetički zatvorenim aluminijumskim čančićima. Temperaturski opseg snimanja u otvorenim čančićima iznosio je od -90°C do 120°C i brzina grejanja  $H_r=5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . (od -80 °C, otvoreno čanče). Temperaturski opseg snimanja u hermetički zatvorenim aluminijumskim čančićima iznosio je od 40°C do 120°C pri brzini grejanja  $H_r=5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . DSC krive rehidracije osmotski dehidratiranog mesa u otvorenim čančićima prikazane su na Slici 36. i Tabeli 8., a na Slici 37. dobijena entalpija  $\Delta H$  (J/g) prelaza pika I i pika II u zavisnosti od temperature i vremena rehidracije.

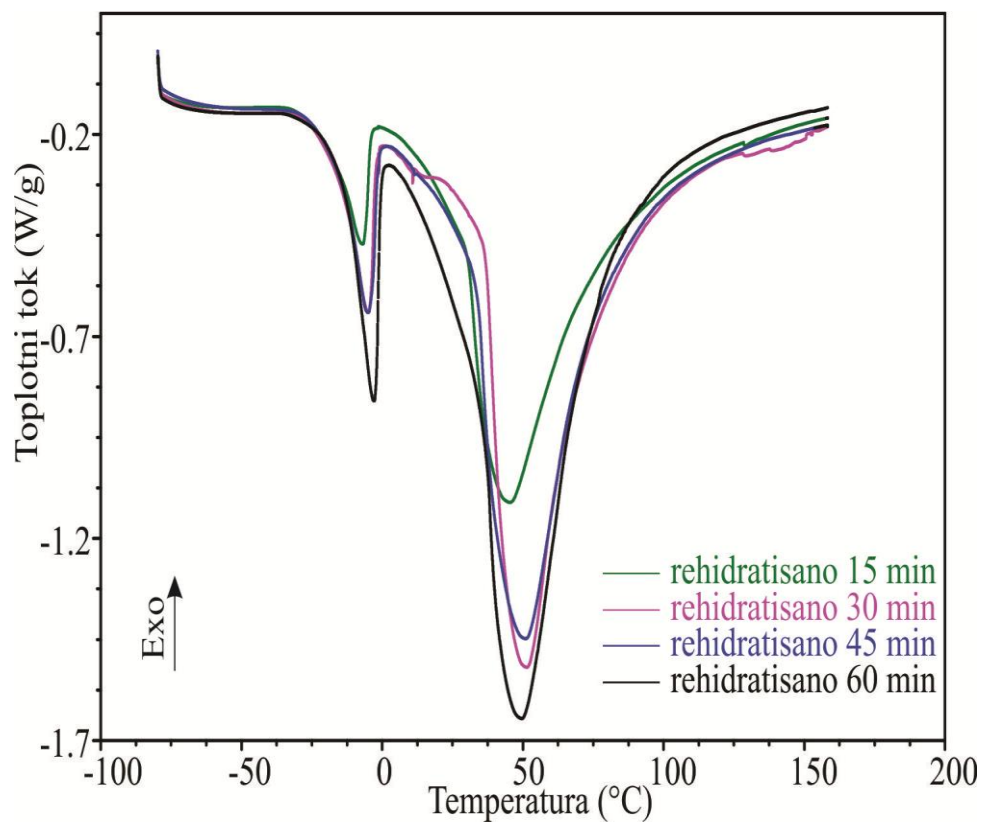
a)



b)



c)



**Slika 36.** DSC krive rehidratiranog svinjskog mesa na temperaturama a) 20 °C; b) 30 °C i c) 40 °C.

**Talela 8.** Termodinamički parametri dobijeni iz DSC krivih rehidratisanog svinjskog mesa na temperaturama a) 40 °C; b) 30 °C i c) 20 °C u otvorenim čančićima.

a) 40°C

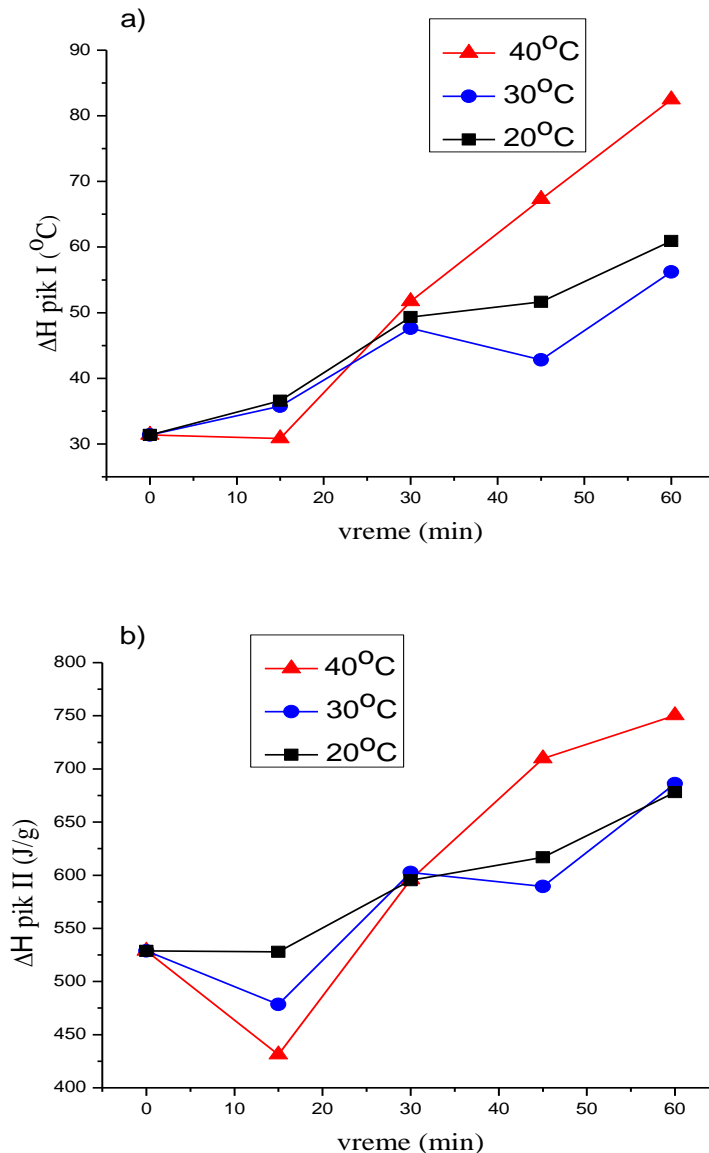
Vreme (min)	Pik I			Pik II		
	Temp. početka prelaza $T_o$ (°C)	Pik temp. $T_m$ (°C)	Entalpija $\Delta H$ (J/g)	Temp. početka prelaza $T_o$ (°C)	Pik temp. $T_m$ (°C)	Entalpija $\Delta H$ (J/g)
0	-31.38	-15.93	31.38	20.41	62.70	528.9
15	-27.19	-10.54	30.84	27.90	39.02	431.1
30	-17.94	-5.93	51.73	28.57	48.43	595.9
45	-20.55	-6.54	67.28	28.99	65.35	709.8
60	-16.72	-5.62	82.46	29.48	47.48	750.3

b) 30 °C

Vreme (min)	Pik I			Pik II		
	Temp. početka prelaza $T_o$ (°C)	Pik temp. $T_m$ (°C)	Entalpija $\Delta H$ (J/g)	Temp. početka prelaza $T_o$ (°C)	Pik temp. $T_m$ (°C)	Enth $\Delta H$ (J/g)
0	-31.38	-15.93	31.38	20.41	62.70	528.9
15	-30.87	-8.47	35.74	22.68	63.21	478.4
30	-21.30	-6.13	47.62	24.16	65.77	602.5
45	-17.16	-5.92	42.80	31.17	48.91	589.4
60	-15.48	-5.39	56.23	34.88	50.17	686.2

c) 20°C

Vreme (min)	Peak I			Peak II		
	Temp. početka prelaza $T_o$ (°C)	Pik temp. $T_m$ (°C)	Entalpija $\Delta H$ (J/g)	Temp. početka prelaza $T_o$ (°C)	Pik temp. $T_m$ (°C)	Entalpija $\Delta H$ (J/g)
0	-31.38	-15.93	31.38	20.41	62.70	528.9
15	-18.20	-6.96	36.58	27.11	45.34	527.9
30	-15.78	-5.03	49.33	35.13	51.42	595.1
45	-15.36	-5.23	51.65	31.14	51.01	616.8
60	-13.54	-3.13	60.92	31.90	49.74	678.2

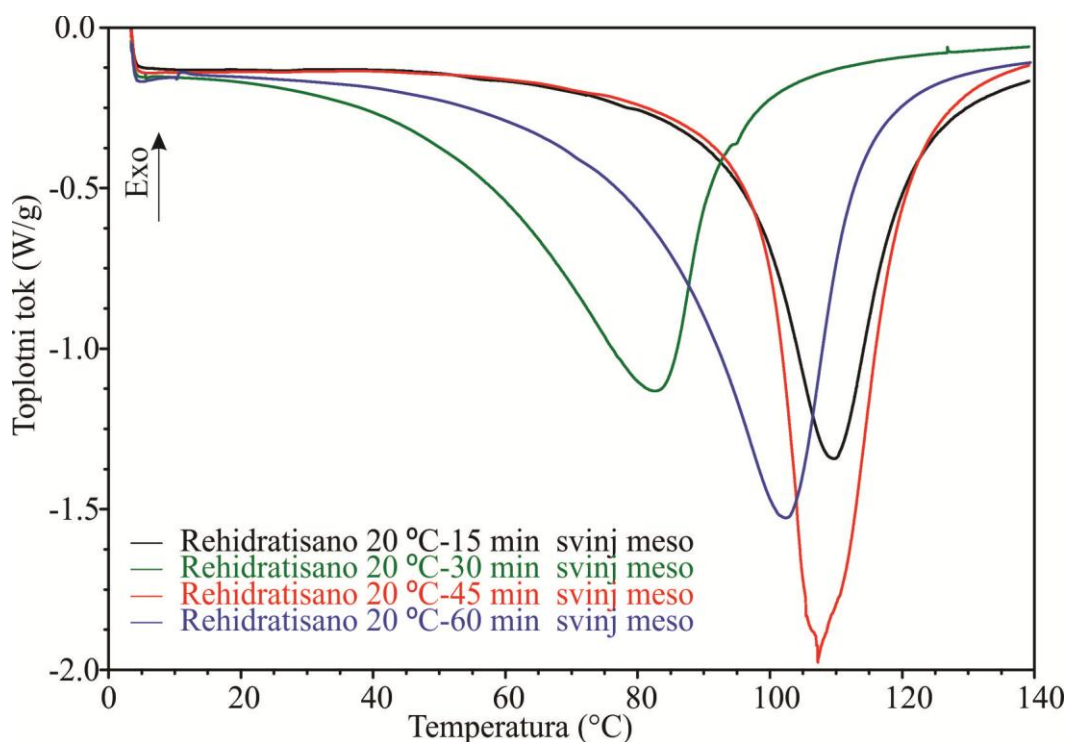


**Slika 37:** Entalpija  $\Delta H$  (J/g) a) pika I i b) pika II u zavisnosti od temperature i vremena rehidracije (DSC, otvoreni čančići).

Iz dobijenih DSC rezultata prikazanih na Slici 35. i u Tabeli 8. može da se zapazi da pri rehidraciji na svim praćenim temperaturama dolazi do porasta temperature početka prelaza ( $T_o$ ), temperaturnog minimuma  $T_m$  i entalpija prelaza  $\Delta H$  endotermnog prelaza koji odgovara topljenju leda u uzorku (Pik 1). Takođe raste temperatura početka prelaza ( $T_o$ ), temperaturni maksimum ( $T_m$ ) i entalpija ( $\Delta H$ ) endotermnog prelaza koji odgovara isparavanju vode i denaturaciji proteina (Pik 2) što je posledica procesa rehidracije. Međutim, može da se primeti da na temperaturi rehidracije od 40 $^{\circ}\text{C}$  dolazi do značajnog povećanja entalpija topljenja leda i isparavanja vode, te da one dosežu i prelaze preko

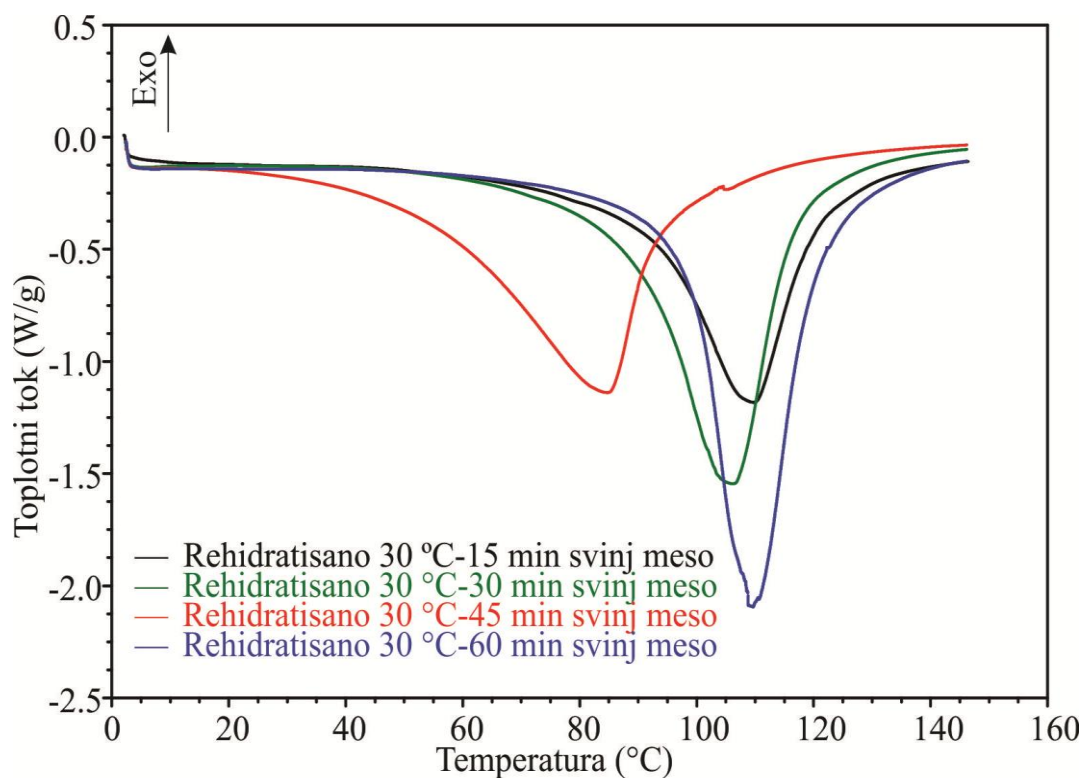
početnih vrednosti za dehidratirano svinjsko meso pri trajanju rehidracije od 45 i 60min za oko 142%. Porast entalpija topljenja leda i isparavanja vode nešto je manji u slučaju rehidracije na temperaturama od 30°C (129.7%) i 20°C (128%), ali nikada ne dostižu vrednosti dobijene za sveže meso. Iz toga može da se zaključi da je rehidracija osmotski dehidratiranog mesa najefikasnija kad je reč o porastu entalpija ( $\Delta H$ ), (izazvanim ulaskom vode u sistem) na temperaturi rehidracije od 40°C. Određeni procenat rehidracije (R) dobijen iz entalpija prvog edoternnog prelaza mesa rehidratiranog na temperaturama 20°C, 30°C i 40 °C posle 60 minuta rehidracije iznosio je 47.2% , 39.7% i 81.7%,. Određeni procenat rehidracije (R) dobiven iz entalpija drugog edoternnog prelaza mesa rehidratiranog na temperaturama 20°C, 30 °C i 40 °C nakon 60 minuta rehidracije iznosio je 67.7% 44.8% i 99%.

DSC krive rehidracije osmotski dehidratiranog mesa u zatvorenim čančićima prikazane su na Slici 38 i Tabeli 9.

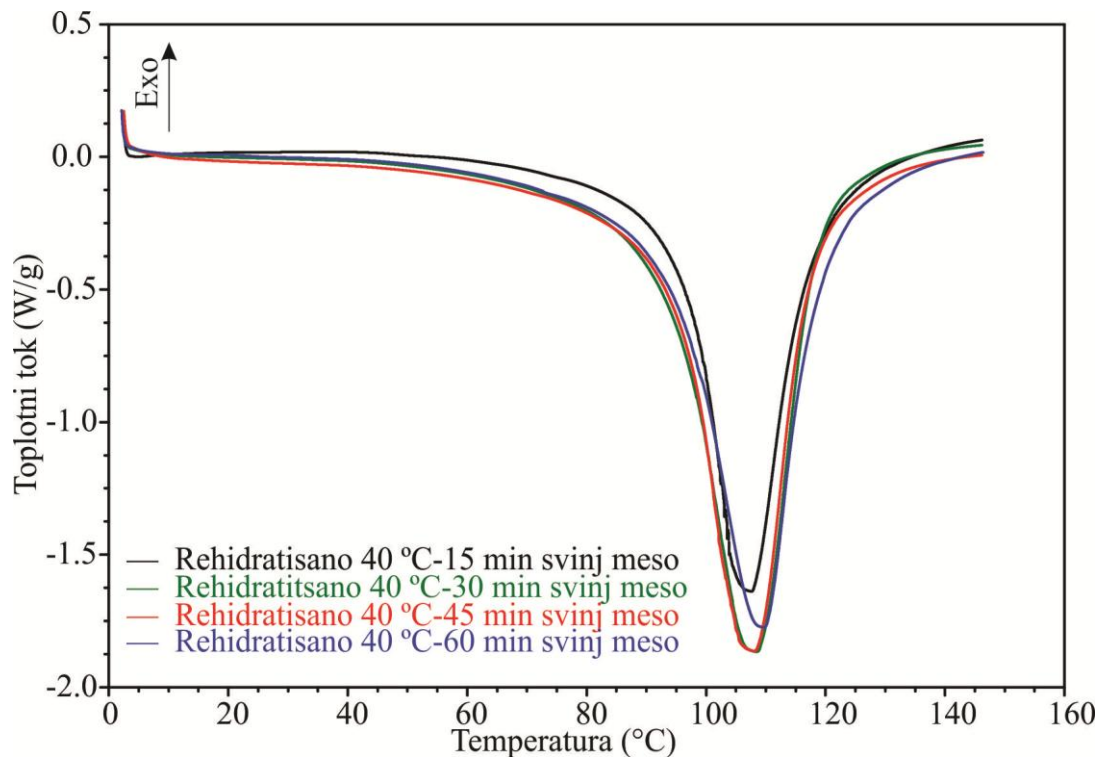


**Slika 38. a)** DSC krive rehidratiranog svinjskog mesa na temperaturama 20°C u hermetički zatvorenim čančićima.





**Slika 38. b)** DSC krive rehidratiranog svinjskog mesa na temperaturama 30 °C u hermetički zatvorenim čančićima.



**Slika 38. c)** DSC krive rehidratiranog svinjskog mesa na temperaturama 40 °C u hermetički zatvorenim čančićima.

**Talela 9.** Termodinamički parametri dobijeni iz DSC krivih rehidratisanog svinjskog mesa na temperaturama a) 40 °C; b) 30 °C i c) 20 °C u hermetički zatvorenim čančićima.

a) 40 °C

Vreme (min)	Temp. početka prelaza $T_o$ (°C)	Pik temp. $T_m$ (°C)	Entalpija $\Delta H$ (J/g)
0	94.70	112.20	522
15	97.03	107.57	987
30	92.42	108.46	1209
45	94.26	107.99	1134
60	93.07	109.68	1171

b) 30 °C

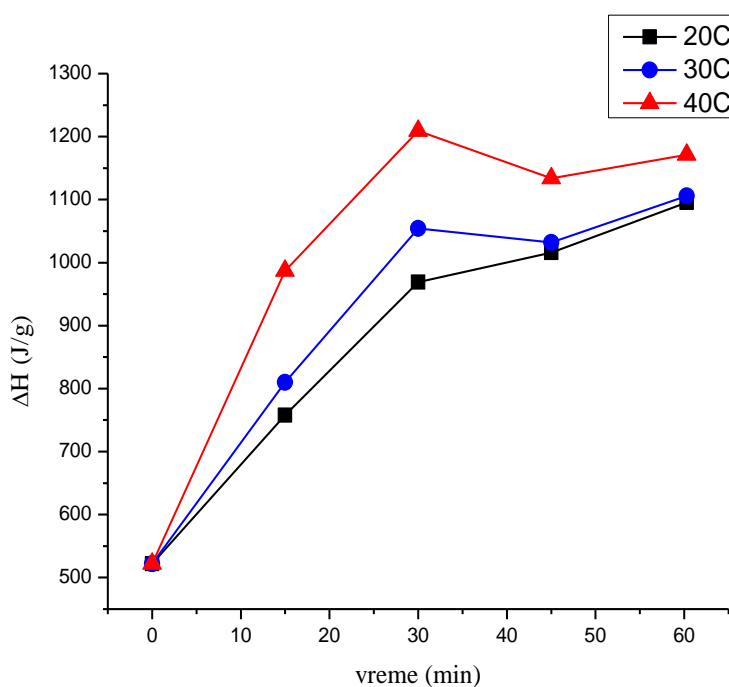
Vreme (min)	Temp. početka prelaza $T_o$ (°C)	Pik temp. $T_m$ (°C)	Entalpija $\Delta H$ (J/g)
0	94.70	112.20	522
15	90.42	109.77	810
30	88.14	106.21	1054
45	51.20	84.78	1032
60	98.08	109.64	1106

c) 20 °C

Vreme (min)	Temp. početka prelaza $T_o$ (°C)	Pik temp. $T_m$ (°C)	Entalpija $\Delta H$ (J/g)
0	94.70	112.20	522
15	94.93	109.71	758
30	49.97	82.70	969
45	99.04	107.23	1016
60	79.38	102.37	1100

Iz dobijenih rezultata DSC krivih rehidratisanog svinjskog mesa na temperaturama 20°C, 30°C i 40°C u hermetički zatvorenim čančićim (Slika 38 i Tabela 9) može da se vidi da na svim temperaturama rehidratacije dolazi do porasta entalpije isparavanja vode, vidljive kao endotermni pik u temperaturskom rasponu od 20 do 140°C. Najbrži porast dešava se na temperaturi rehidratacije od 40°C. Tu već posle 30 min rehidratacije entalpija prelaza dostiže maksimum i održava približno istu vrednost i posle 45 i 60 min. Vrednosti dobijenih entalpija iznose preko 200% u poređenju sa entalpijama isparavanja dobijenim za osmotski sušeno meso. Proces rehidratacije se odvija nešto sporije na temperaturama od 20°C i 30°C

gde dolazi do svog maksimuma za 45 min na 30°C i 60 min na 20°C. Iz dobijenih DSC rezultata može da se primeti da se procesi rehidratacije na nižim temperaturama odvijaju različitom dinamikom prodiranja vode u proteinsku osnovu, sa usporavanjem ovog procesa na 30°C za 45min i na 20°C za 30min (Tabela 9). To može da se objasni strukturnim osobinama matriksa koje su izazvane datim uslovima temperature i vremena. Tako na nižim temperaturama procesa potrebno je duže vreme za reorganizaciju strukture proteinske osnove. Na temperaturi rehidratacije od 40°C proces je brži te sistem ne može da se reorganizuje, tako da su dobijene DSC krive visokog stepena podudaranja u pogledu  $T_o$  i  $T_m$  i oblika DSC krivih. Jedina promena je u površini endoternog pika tj. u promeni entalpije ( $\Delta H$ ), što je posledica rehidratacije. **DSC krive rehidratacije na 40°C ukazuju na visoki stepen strukturne homogenosti proteinske osnove pri datim uslovima, a time i na visoki kvalitet osmotski osušenog mesa.** Iz ovih rezultata možemo da zaključimo da je najefikasnija rehidratacija na temperaturi od 40°C (Slike 36.c), 37., 38c) i 39. Određeni procenat rehidratacije (R) dobijen iz entalpija prelaza rehidratiranog mesa na temperaturama 20°C, 30°C i 40 °C nakon 60 minuta rehidratacije iznosio je 62.9%, 58.4% i 64.9%. **Može da se kaže da su najpovoljniji uslovi rehidratacije u pogledu postignutog procenta rehidratacije i čuvanja i održavanja homogenosti strukture proteinske osnove, rehidratacija na 40°C u vremenu od 60min.**

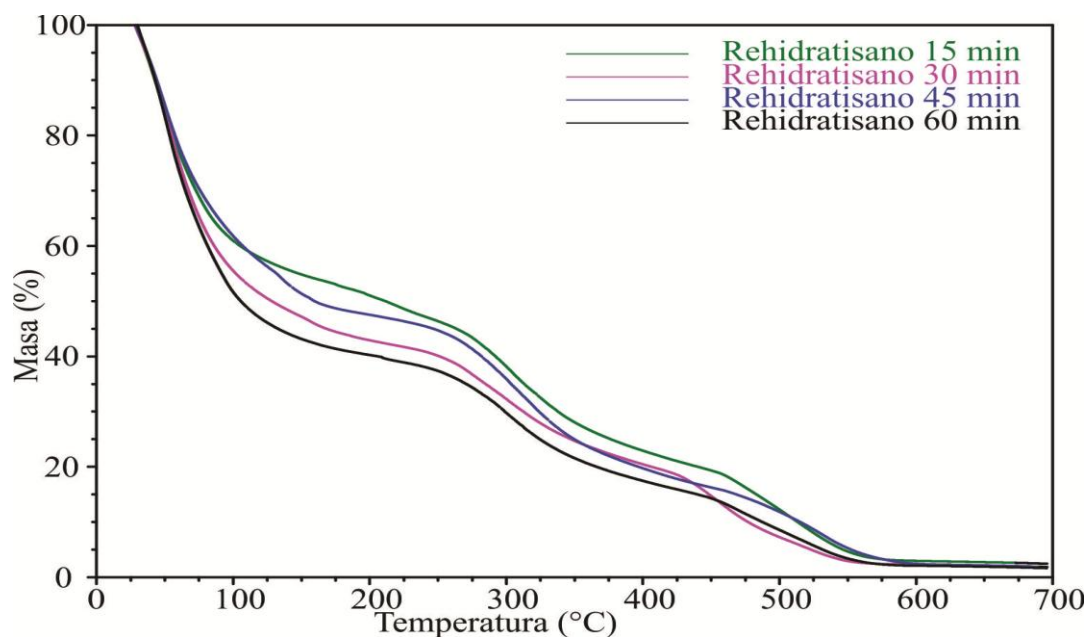


**Slika 39.** Entalpija  $\Delta H$  (J/g) u zavisnosti od temperature i vremena rehidratacije (DSC, hermetički zatvoreni čančići)

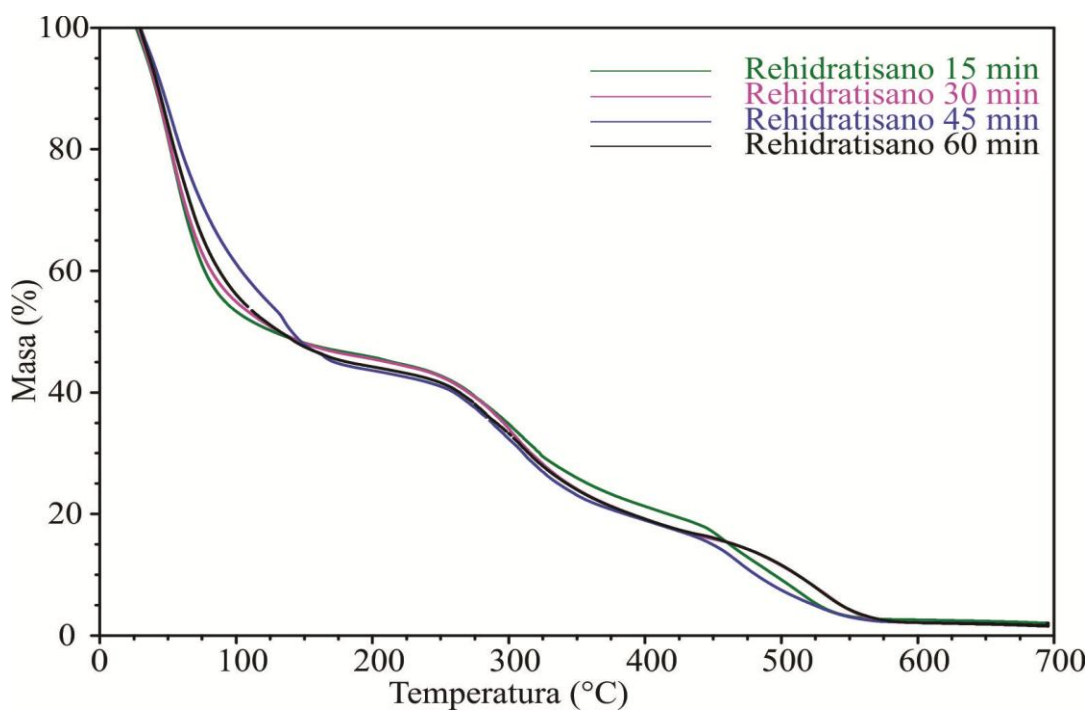
#### 4.6 . 1. TGA analiza rehidratiranog svinjskog mesa

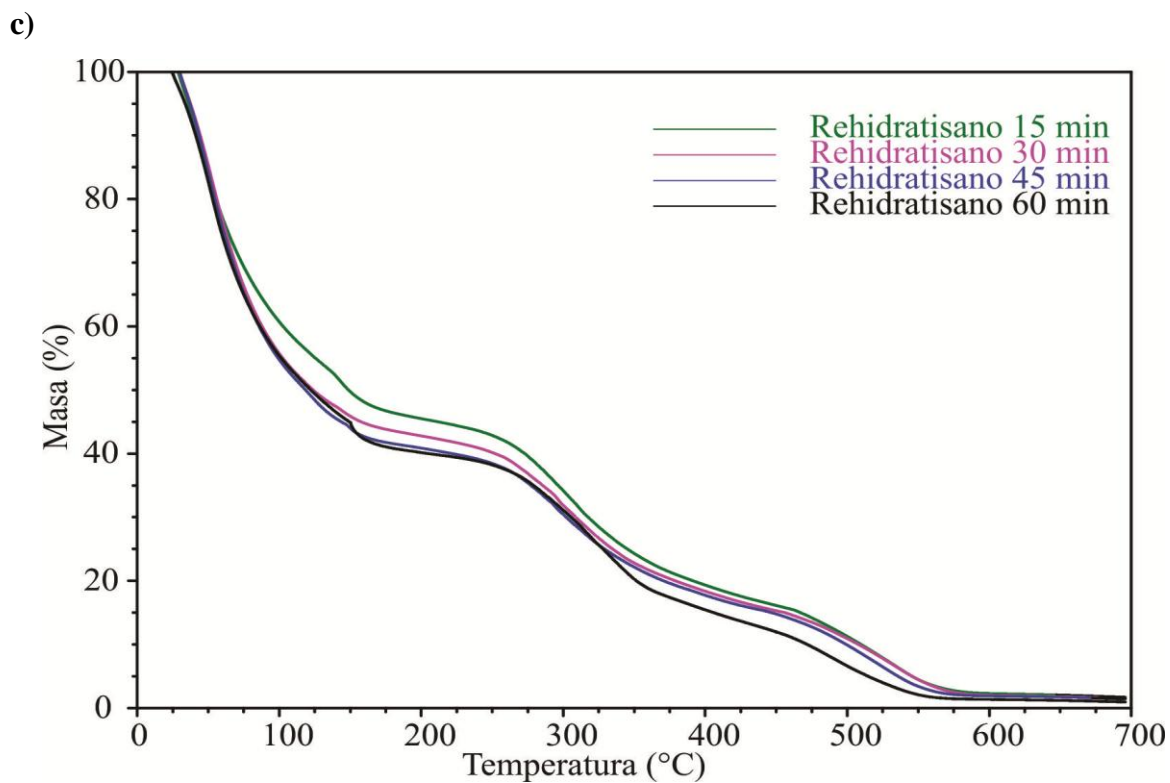
Dobijene TGA krive rehidratiranog svinjskog mesa na temperaturama 20 °C, 30 °C i 40 °C prikazane su na slici 40. a) b) i c) i na Slici 41. Rezultati gubitka vlage rehidratiranog osmotski osušenog mesa dobiven TG analizom prikazani su na Slikama 41. a) i b) i u Tabeli 9. a) b) i c).

a)

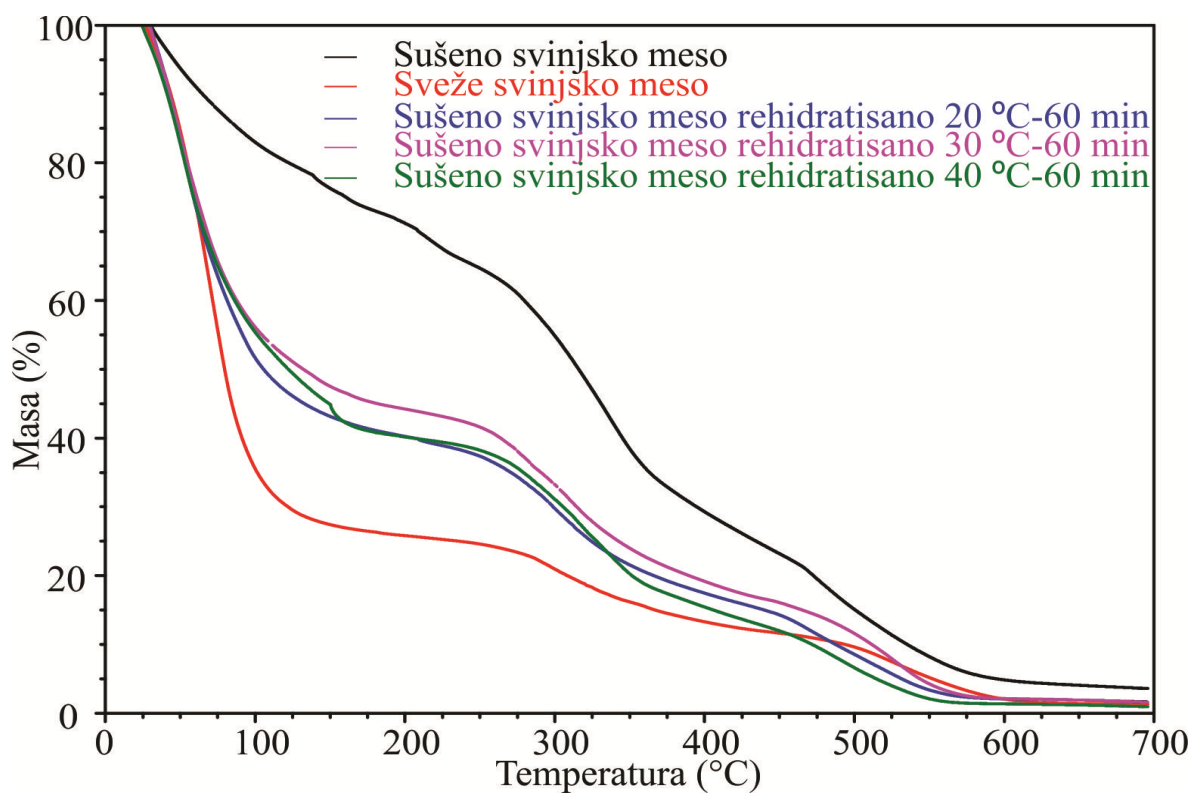


b)

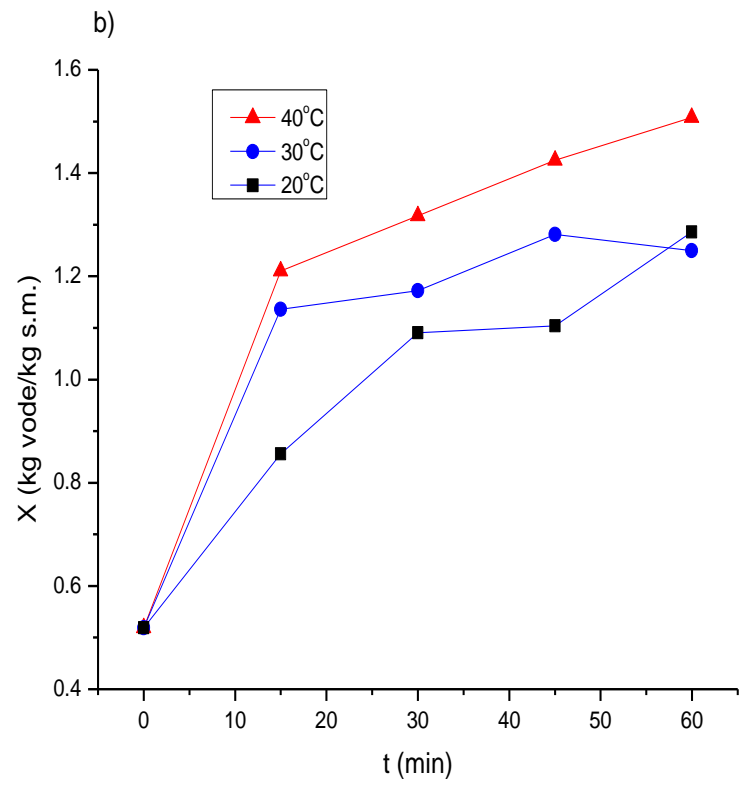
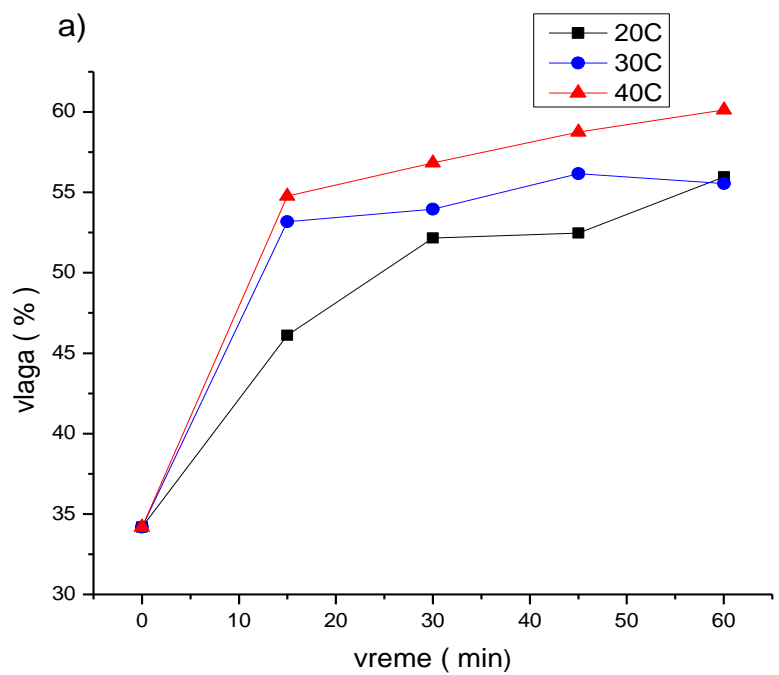




**Slika 40.** TGA krive rehidratiranog svinjskog mesa na temperaturama: a) 20 °C; b) 30 °C i c) 40 °C.



**Slika 41.** TGA krive: osmotски osušenog svinjskog mesa, rehidratiranog svinjskog mesa na temperaturama: 20 °C; 30 °C i 40 °C i svežeg svinjskog mesa.



**Slika 42.** a) Vlaga (%) u zavisnosti od temperature i vremena rehidracije (TGA) b) kg vode/kg suve mase u zavisnosti o vremenu rehidracije.

**Tabela 10.** Gubici mase dobiven iz TGA krivih za rehidratirano svinjsko meso na a) 40°C; b) 30 °C i c) 20°C

a) 40 °C

Vreme (min)	I gubitak (%) na 200 °C	II gubitak (%) na 400 °C	III gubitak (%) na 500 °C	IV gubitak (%) na 700 °C	Ukupni gubitak (%)	Ostatak (%)
0	34.18	37.09	13.57	11.53	96.37	3.62
15	54.76	28.41	-	15.06	98.16	1.77
30	56.84	27.73	-	13.82	98.40	1.55
45	58.76	25.70	-	14.07	98.53	1.44
60	60.12	25.77	-	13.07	98.97	0.99

b) 30 °C

Vreme (min)	I gubitak (%) na 200 °C	II gubitak (%) na 400 °C	III gubitak (%) na 500 °C	IV gubitak (%) na 700 °C	Ukupni gubitak (%)	Ostatak (%)
0	34.18	37.09	13.57	11.53	96.37	3.62
15	53.18	25.19	-	19.40	97.40	2.19
30	53.96	30.12	-	14.32	98.40	1.58
45	56.16	23.93	-	18.20	97.66	1.71
60	55.55	27.72	-	15.02	97.92	1.63

c) 20 °C

Vreme (min)	I gubitak (%) na 200 °C	II gubitak (%) na 400 °C	III gubitak (%) na 500 °C	IV gubitak (%) na 700 °C	Ukupni gubitak (%)	Ostatak (%)
0	34.18	37.09	13.57	11.53	96.37	3.62
15	46.12	33.44	6.32	11.68	97.02	2.52
30	52.17	21.94	12.35	6.14	98.08	1.90
45	52.47	26.78	-	18.85	97.77	1.88
60	57.34	26.46	7.54	6.94	98.32	1.66

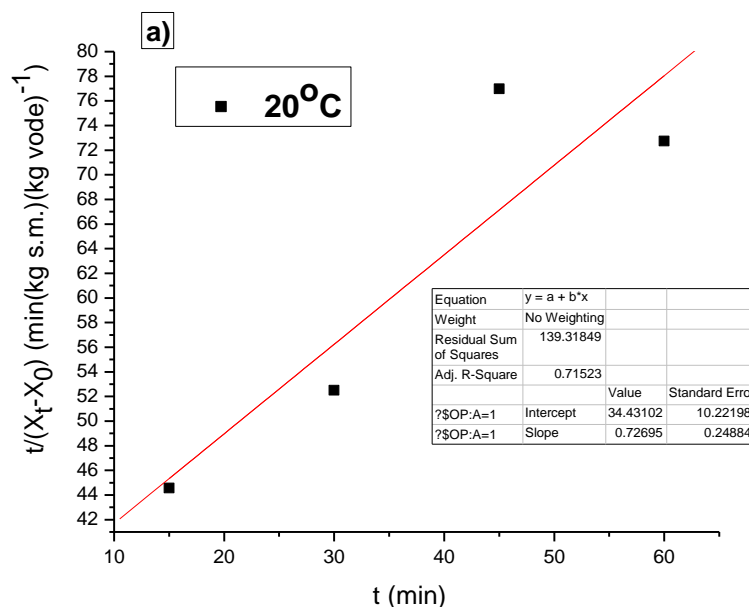
Iz dobijenih rezultata može da se zaključi da postoji porast procenta sadržaja vode za vreme rehidracije u trajanju od 60 minuta na svim temperaturama rehidracije, pri čemu je vidljivo da su rehidracije pri temperaturama od 40°C i 20°C efikasnije. Takođe je bitno da

se primeti da dolazi do istovremenog smanjenja procenta mase ostatka tj. do povećanja ukupnog gubitka mase na svim temperaturama rehidracije. Najveći procenat ukupnog gubitka mase i najveće smanjenje procenta mase ostatka ostvareni su rehidracijom na 40°C u vremenu od 60 min.

Određeni procenat rehidracije (R) dobijen iz gubitka mase rehidratiranog mesa na temperaturama 20°C, 30 °C i 40 °C posle 60 minuta rehidracije iznosio je 61.8%, 52.0% i 63.9%. Ovi rezultati se u velikoj meri podudaraju s vrednostima dobijenim za procenat rehidracije dobijenim iz entalpija topljenja leda i isparavanja vode dobijenim DSC metodom u otvorenim čančićima i gotovo se potpuno podudaraju s vrednostima procenta rehidracije (R) dobijenim iz DSC rezultata u zatvorenim čančićima (62.9%, 58.4% i 64.9%).

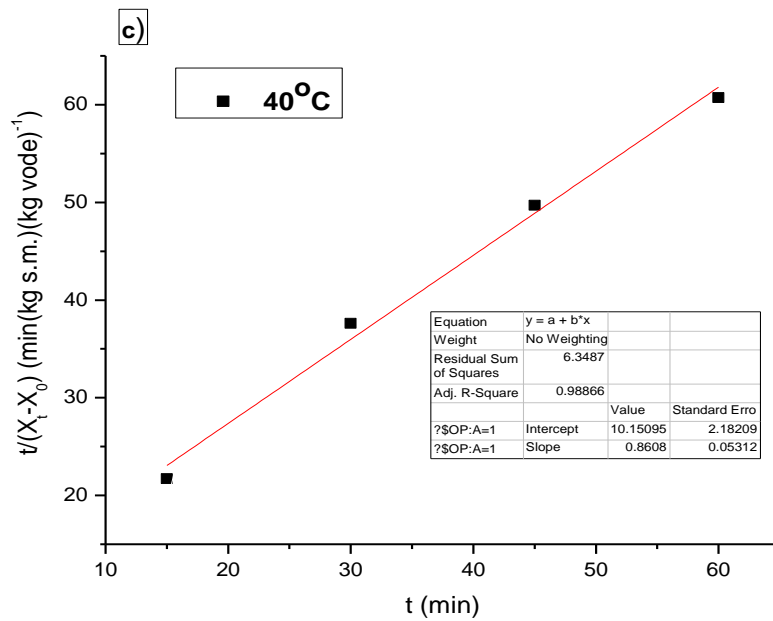
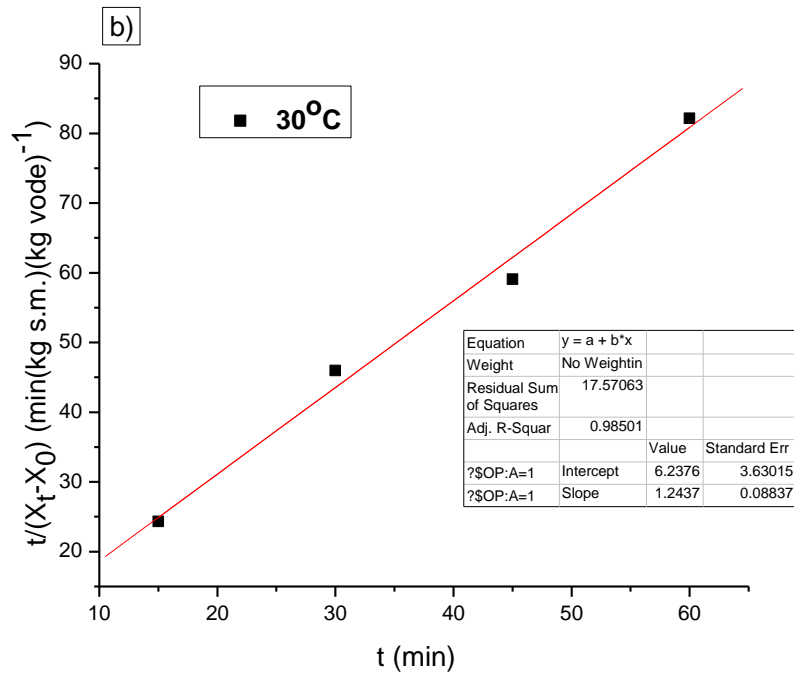
#### 4.6.3. Oderedivanje Pelegov-ovih konstanti rehidracije pomoću rezultata dobijenih TGA analizom

U ovom radu korišćen je Pelegov (*Peleg, 1988*) model opisa sorpcionih krivih za dobijanje konstanti  $k_1$  i  $k_2$  rehidracije definisanih ovim modelom. Na slici 43. a), b) i c) i Tabeli 11 prikazani su dobijeni parametrari rehidracije korišćenjem Pelegovog modela.



**Slika 43.** a) Zavisnost  $t/(X_t - X_0)$  (min(kg d.m.)(kg vode)<sup>-1</sup>) od vremena rehidracije  $t$  (min) na 20°C





**Slika 43.** Zavisnost  $t/(X_t - X_0)$  ( $\text{min}(\text{kg d.m.})(\text{kg vode})^{-1}$ ) od vremena rehidracije  $t$  (min) na temperaturama a)  $20^\circ\text{C}$ , b)  $30^\circ\text{C}$  i c)  $40^\circ\text{C}$ .

**Tabela 11.** Dobijene vrednosti Peleg-ovih parametra rehidracije  $k_1$  i  $k_2$  (min (kg d.m.) (kg vode)<sup>-1</sup>) pri temperaturama rehidracije 20°C, 30°C i 40°C.

Peleg-ove konstante (min (kg d.m.) (kg vode) <sup>-1</sup> )	20°C	30°C	40°C
$k_1$	34.43	6.23	10.15
$k_2$	0.726	1.243	0.860

Peleg-ova konstanta  $k_1$  koja se odnosi na brzinu prenosa mase i obrnuto je proporcionalna prenosu mase, ima najvišu vrednost pri rehidraciji na 20°C. To upućuje na zaključak da je rehidracija najsporija na 20°C, dok rehidracije na 30°C i 40°C imaju približno bliske brzine (Slika 42 i Tabela 11). Peleg-ova konstanta  $k_2$  koja se odnosi na maksimalni kapacitet apsorpcije vode, povećala se na temperaturi rehidracije od 30°C, a zatim neznatno smanjila vrednost na temperaturi rehidracije od 40°C.

Početak rehidracije odlikuje velika brzina procesa koja se vremenom smanjuje što je posledica ispunjavanja kapilara, pora prisutnih u materijala (Lewicki et al 1998, Bilbao-Sáinz et al., 2005, Babić et al 2009, Reyes et al 2011 Muñoz et al 2012). To se vidi iz rezultata dobijenim u ovom radu. Tako je nađeno da je na svim ispitivanim temperaturama rehidracija je najbrža u prvih 15 min (Slike 35-41 i Tabele 9-11). Proces rehidracije ima veliku brzinu na početku procesa, a zatim se ta brzina smanjuje. Poroznost materijala, udubljenja, kapilare na samoj površini materijala potpomažu proces hidratacije, dok mehurići vazduha zadržavaju dotok vode i ometaju proces (Reyes et al 2011). U svom radu koji se odnosi na proučavanje rehidracije pilećeg mesa pri različitim uslovima, Babić i saradnici (Babić et al 2009) su pokazali da sam proces rehidracije uveliko zavisi od uslova sušenja kao i od debljine uzorka. Procenat rehidracije je ujedno i pokazatelj uspešnosti sušenja s obzirom na sačuvanost same strukture osnove hrane (Pezo et al 2014). Dobijene vrednosti procenta rehidracije iz rezultata dobijenih u ovom radu su u saglasnosti s literaturnim poracima (Suden et al 1964, Hui et al 2007). Rehidracijom dolazi do povećanja mase zbog upijanja vode u osnovu, međutim u isto vreme dolazi do gubljenja dela minerala, vitamina, saharoze i drugih molekuli koje su interreagovali s osnovom u procesu dehidracije (Pezo et al 2014, Krokida, et al 2013). Ovu pojavu prtvrdjuju i rezultati dobijeni u ovom radu gde je vidljivo iz rezultata TG analize da se ostatak (Tabela 10.) stalno smanjuje kroz trajanje rehidracije, te se i procenat suve materije rehidracijom

menja, što su potvrdili i drugi autori (*Puolanne i Halonen 2010, Schmidt 2009, 2008*). Takođe je bitno da se primeti da je najveći gubitak ostvaren rehidracijom na 40°C u vremenu od 60 min.

Kao što je već ukazano iz dobijenih DSC rezultata može da se primeti da se procesi rehidracije na nižim temperaturama odvijaju različitom dinamikom prodiranja vode u matriks, sa usporavanjem procesa na 30°C 45min i 20°C 30min (Tabele 9). To može da se objasni strukturnim odlikama matriksa koje su uslovljene datim uslovima temperature i vremena. Tako na nižim temperaturama procesa ima više vremena koje omogućava reorganizaciju strukture matriksa što uslovljava promene u procesu rehidracije. Ovo zapažanje može da se pretpostavi time da su se stvorili uslovi koncentracije jona prisutnih u rehidracionom rastvoru (koncentracija soli veća od 6% ) (*Puolanne i Halonen 2010, Schmidt 2009*), otpuštanjem jona sa osnove mesa u destilovanu vodu (*Krokida, et al 2013*). Time su stvoreni uslovi koji omogućavaju depolimerizaciju debelih miozinskih filamenata pri čemu dolazi do pojave skupljanja (*shrinking*), čime se smanjuje efikasnost rehidracije (*Puolanne i Halonen 2010, Paterson 1988, Offer i Trinick 1983*). S druge strane na temperaturi rehidracije od 40°C proces je brži te uslovi za skupljanje ne mogu da se održe dovoljno dugo da bi se osnova menjala, pa se sistem ne reorganizuje i nema usporavanja procesa rehidracije. Temperatura rehidracije od 40°C je odgovarajuća i što se tiče očuvanja proteinskih struktura s obzirom na temperatursku denaturaciju proteina svežeg mesa koja počinje na temperaturi od 40°C (*Tornberg 2005, Thorarinsdottir et al 2002*).

Peleg-ova konstanta  $k_1$  koja je obrnuto proporcionalna prenosu mase, ima najvišu vrednost pri rehidraciji na 20°C, što upućuje na zaključak da je rehidracija najsporija na 20°C, dok rehidracije na 30°C i 40°C imaju približno bliske brzine (Slika 42 i Tabela 11). Munoz i autori (*Munoz et al. 2012*) su našli da se konstanta  $k_1$  kod rehidracije uzoraka koji su imali 10% početne vlage povećava, dok kod uzoraka koji su imali početnu vlagu 35% njena vrednost opada. Uzorci mesa koji su rehidratirani u ovom radu imali su početnu vlagu oko 34%. Dobijene vrednosti za  $k_1$  u ovom radu su manje nego što su dobili Munoz i autori (*Munoz et al. 2012*) za rehidraciju mesa sa početnom vlagom od 35%. To može da se tumači dužinom procesa rehidracije koji je na temperaturama na kojima je rađeno u ovom radu (20°C, 30°C i 40°C) dosta kraći nego što su dobili Munoz i autori koristeći niže temperature (5°C i 15°C). Peleg-ova konstanta  $k_2$  koja predstavlja inverznu korelaciju količini vode u ravnotežnom stanju, povećala se na temperaturi rehidracije od 30°C, a zatim neznatno smanjila vrednost na temperaturi rehidracije od 40°C. Dobijene vrednosti

za  $k_2$  u saglasnosti su s vrednostima koje su dobili Munoz i autori (Munoz *et al.* 2012) pri rehidraciji osušenog mesa.

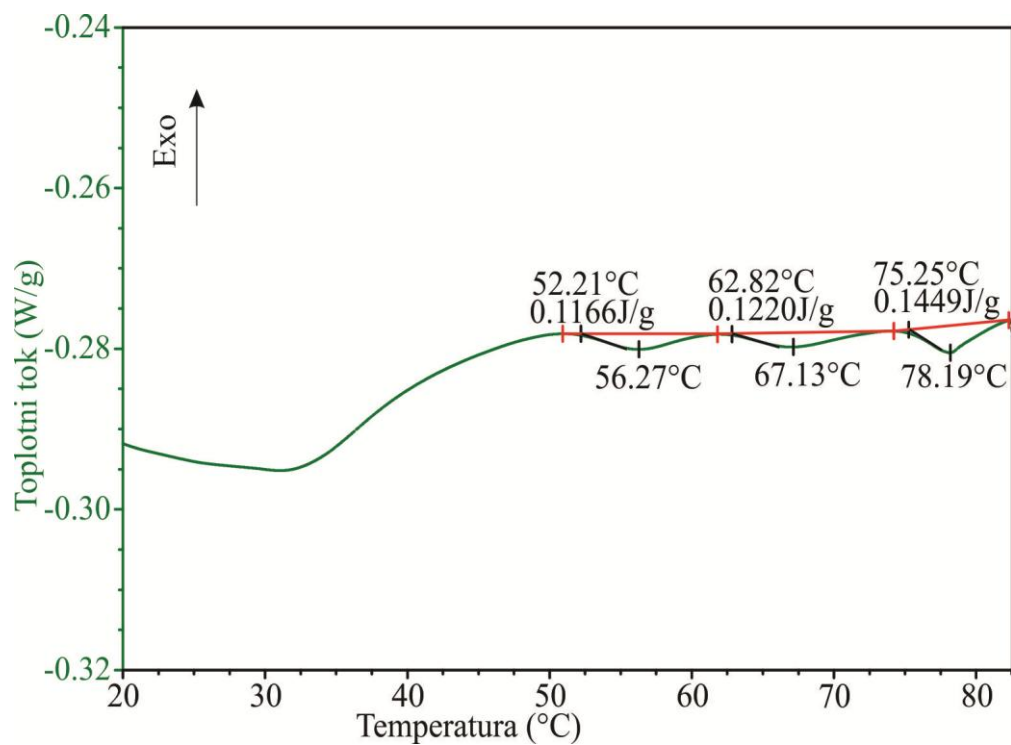
#### 4.7. Održavanje native strukture proteina mesa posle osmotske dehidracije i rehidracije

Što se tiče održavanja native proteinske strukture mesa za vreme dehidracije, rehidracije, DSC rezultati pri snimanju u hermetički zatvorenim čančićima i pri smanjenim brzinama grejanja ( $Hr\ 2\ C/min$ ) su pokazali postojanje termalnih prelaza koji odgovaraju procesima izazvanim denaturacijom proteina mesa. Na slici (Slika 44) prikazane su DSC krive termalnih prelaza koje odgovaraju denaturaciji proteina u svežem, osmotski dehidratiranom i rehidratiranom svinjskom mesu (Slika 45). Dobljene vrednosti entalpije denaturacije proteina mesa su prikazane tabelarno u Tabeli 12.

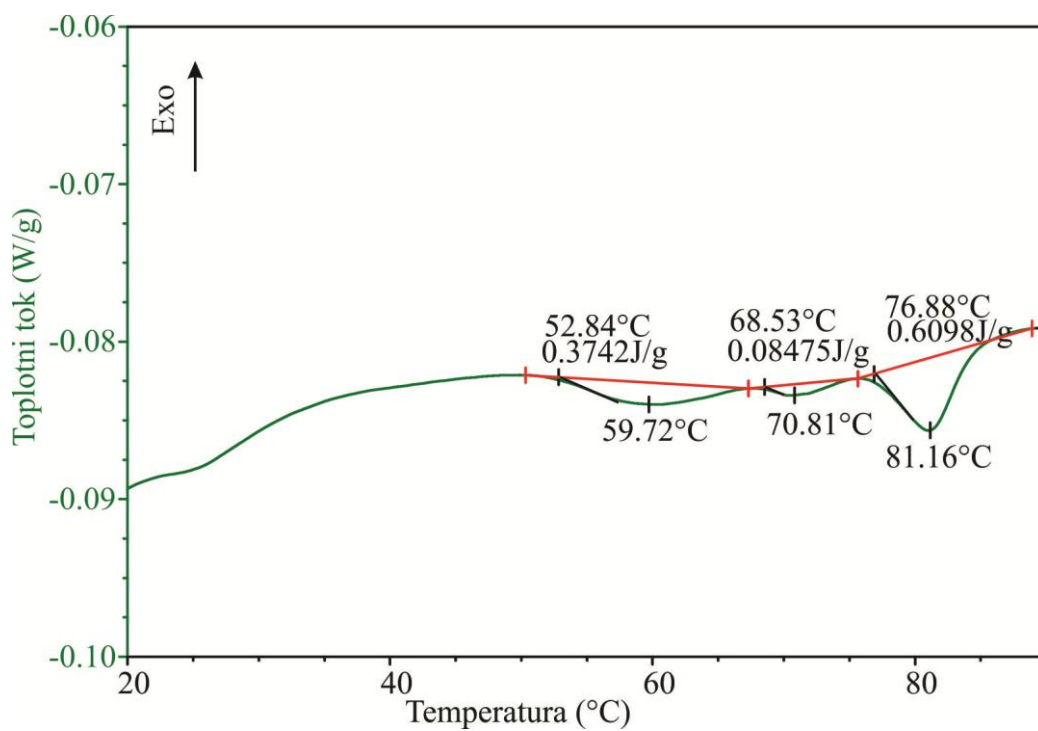
**Tabeli 12.** Entalpije i temperature denaturacije proteina mesa dobijene DSC analizom.

Uzorak mesa	Protein 1 (miozin)			Protein 2 (kolagen)			Protein 3 (aktin)		
	$T_{o1}$ (C°)	$T_{p1}$ (C°)	$\Delta H_1$ (J/g <sub>sm</sub> )	$T_{o2}$ (C°)	$T_{p2}$ (C°)	$\Delta H_2$ (J/g <sub>sm</sub> )	$T_{o3}$ (C°)	$T_{p3}$ (C°)	$\Delta H_3$ (J/g <sub>sm</sub> )
Sveže meso	52.2	56.3	23.10	62.8	67.1	2.90	75.25	78.19	5.90
OD meso	52.8	64.25	6.03	71.07	74.6	1.35	89.59	83.11	9.80
Rehidratirano meso 20°C/15 min	52.75	56.18	8.68	-	-	-	76.26	78.37	3.24
Rehidratirano meso 20°C/45 min	44.62	47.52	0.17	-	-	-	68.11	72.01	6.10
Rehidratirano meso 30°C/15 min	47.44	49.70	1.91	-	-	-	77.13	79.03	1.06
Rehidratirano meso 40°C/15 min	48.2	50.60	1.35	-	-	-	72.59	74.28	1.20

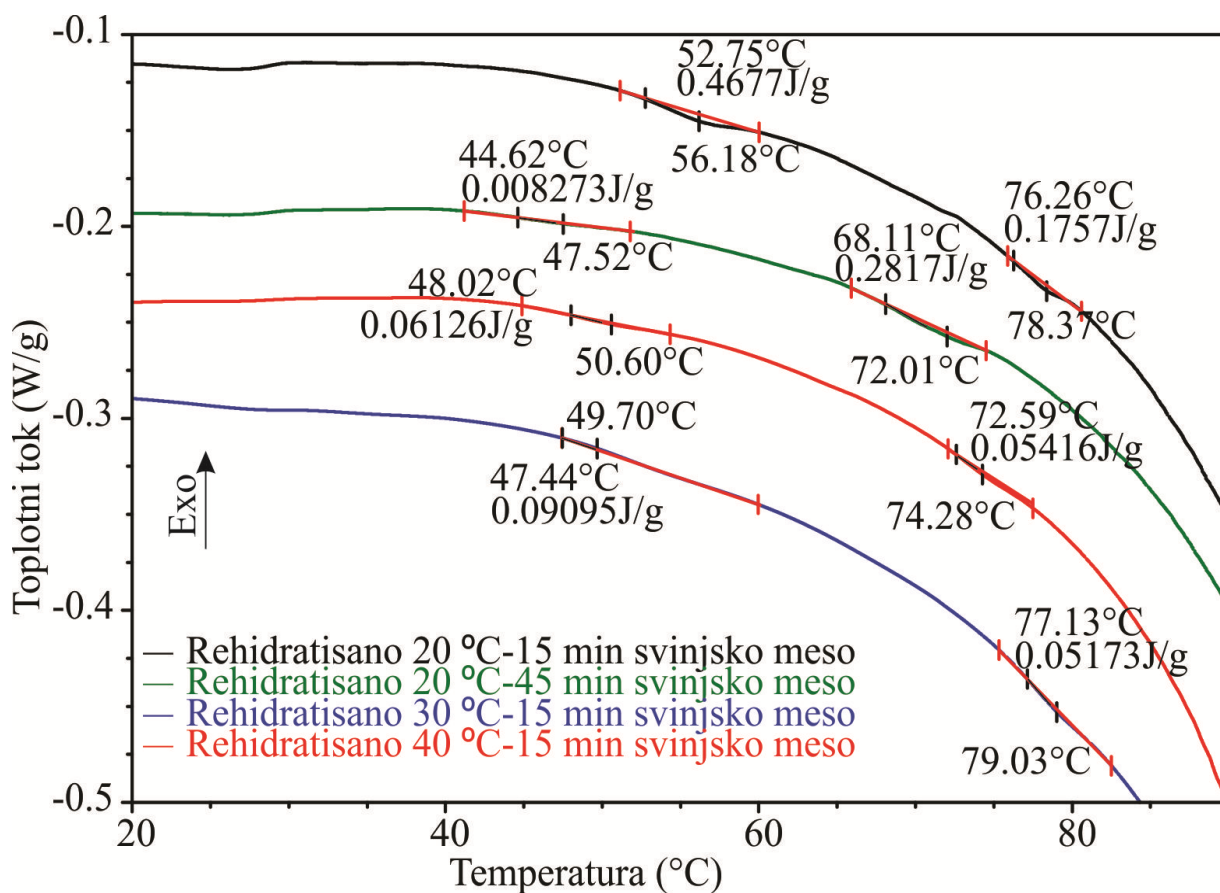
a)



b)



**Slika 44.** DSC krive denaturacije proteina a) svežeg svinjskog mesa i b) proteina osmotski osušenog svinjskog mesa.



**Slika 45:** DSC krive denaturacije proteina mesa pri rehidraciji.

Iz prikazanih rezultata može da se zaključi da se nativna struktura proteina mesa (sveže meso) menja tokom procesa osmotske dehidracije. Tako, osmotskom dehidracijom dolazi do konformacionih promena, delimične denaturacije proteina mesa, što je vidljivo iz dobijenih entalpija ( $\Delta H$ ) denaturacije pojedinih proteina mesa koja se smanjuje u procesu dehidracije (Tabela 12). Međutim vidljivo je da su temperature denaturacije, koje odgovaraju vrhovima pika prelaza, za pojedini proteinski prelaz nešto veće kod osmotski dehidratiranog mesa u poređenju sa svežim mesom i uglavnom imaju bliske vrednosti tokom rehidracije. U procesu rehidracije dolazi do daljeg smanjenja entalpija denaturacije ( $\Delta H$ ) pojedinih proteina i do zadržavanja malog procenta nendenaturisanih ili minimalno konformaciono promenjenih proteina. Te strukture su zadržane pri rehidraciji na temperaturi od 20°C i u vremenu od 15 min i 45 min, pri rehidraciji na 30°C i u vremenu od 15 min i pri rehidraciji na 40°C i u vremenu od 15 min, a pri daljoj rehidraciji prisustvo ovakvih struktura nije nađeno. Vidljiv je nestanak, pri rehidraciji, proteinskih prelaza u temperaturskom opsegu od 60°C do 70°C (Slika 45 Tabela 12).

Iz prikazanih DSC rezultata dobijenih za a) sveže i b) osmotski dehidratirano svinjsko meso u zatvorenim aluminijskim čančićima (Slika 44) mogu da se vide tri endotermna prelaza sa minimumima na 56 °C, 67°C i 78°C kod svežeg mesa. Oni odgovaraju sledećim procesima: prvi denaturaciji miozina, drugi odgovara denaturaciji sarkoplazmatskih proteina i kolagena, a treći denaturaciji aktina sa  $T_m=78^\circ\text{C}$ . Dobijene vrednosti i temperaturnog minimuma prelaza koji odgovara denaturaciji i entalpije denaturacije su u saglasnosti s literarnim podacima (Yang 2015, Frenandez 2009., Tornberg 2005, Bertram 2006, Bertola, Bevilacqua, & Zaritzky, 1994; Stabursvik i Martens, 1980; Stabursvik et al 1984; Wright, 1984). Kod osmotski dehidratiranog mesa takođe su vidljiva tri endotermna prelaza koja odgovaraju navedenim procesima termalne denaturacije pojedinih proteina mesa, s tim da su temperature minimuma denaturacije nešto veće u poređenju sa svežim mesom, dok su entalpije denaturacije značajno smanjene (Tabela 12). Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da proces osmotske dehidratacije uzrokuje strukturne, konformacione promene proteina mesa koje dovode do stvaranja struktura veće termalne stabilnosti (pomak temperatura minimuma prelaza denaturacije proteina ka višim vrednostima). Sa energetskog gledišta dolazi do destabilizacije struktura, te se dobijaju niže vrednosti entalpije denaturacije ( $\Delta H$ ) za pojedine proteinske prelaze.

Slični rezultati su poznati u literaturi, te su različite soli dovodile do različitih uticaja na stabilnost proteina (stabilizacija i destabilizacija) mesa u zavisnosti od vrste soli koja je dodata, koncentracije i procenta hidratacije proteina (Kajitani et al, 2011, Puolanne 2010, Thorarinsdottir 2002, Bertram 2006). Poznato je takođe, da šećeri deluju na proteine mesa i interaguju s njima kao što je pokazano pri geliranju alginata, ksantana i miofibrilnih proteina (Ensor et al., 1991; Xiong i Blanchard, 1993). Chen i saradnici (Chen et al, 2007) su proučavali DSC metodom interakciju gume lanenog semena (*Flaxseed gum*) koja se sastoji uglavnom od ksiloze, ramnoze, galaktoze, glukoze, arabinoze, fukoze i galatoronske kiseline, i poznata je po visokom kapacitetu vezivanja vode (Mazza 1989). Pokazali su da interakcijom gume lanenog semena (*Flaxseed gum*) sa proteinima mesa dolazi do povećanja temperatura prelaza proteina mesa što je nađeno i u našem radu. Isti autori su pokazali da do ovih interakcija s proteinom dolazi preko disulfidnih mostova i vodoničnih mostova (Chen et al 2007). **Može da se pretpostavi da je ovakva interakcija s komponentama melase (ugljeni hidrati i soli) i proteina očigledna (Roos i Potes 2015). Smanjenje entalpije dobijene za osmotski dehidratirano meso objašnjava se navedenim interakcijama soli s**

proteinima, ugljenih hidrata sa proteinima koje dovode do konformacionih promena, a do u ovom radu nadenih termalnih osobina nastale proteinske osnove.

Pri rehidraciji pik koji odgovara denaturaciji prvenstveno kolagena i sarkoplazmatskih proteina u potpunosti nestaje, znači denaturaciju ovih proteina procesom rehidracije. Iako je poznato (*Rochdi et al 2000*) da grejanjem na 90°C u toku 30 min dolazi do potpune termalne denaturacije kolagena, te da snižavanje temperature termalnog tretmana samo za 10°C dovodi do pojave reverzibilnosti strukture proteina i njegovog refoldinga. Grejanjem na 90°C u vremenu od 30 min dolazi do hidrolize peptidnih lanaca, te tako ne dolazi do renaturacije strukture.

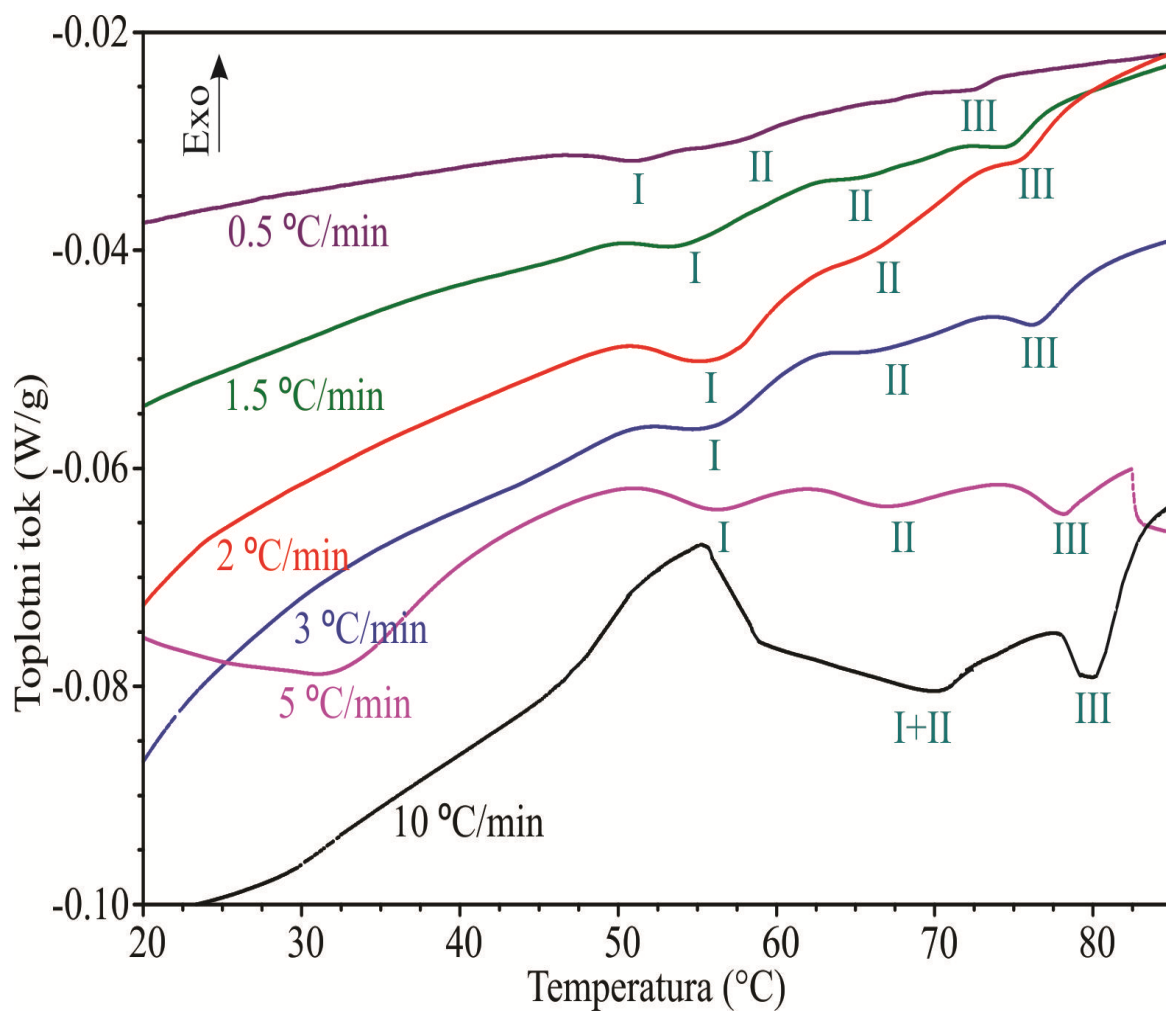
#### **4.8. Kinetika denaturacije proteina svežeg i osmotski dehidratiranog svinjskog mesa praćena DSC metodom**

Ishiwatari i autori su u svom radu (*Ishiwatari et al 2013*) pokazali značaj kinetičke analize denaturacije proteina mesa miozina i aktina. Pokazali su da pomoću dobijenih kinetičkih podataka denaturacije proteina je moguće predvideti stepen denaturacije proteina mesa. Pokazali su postojanje značajnog uticaja denaturacije aktina na modul elastičnosti mesa, dok je uticaj denaturacije miozina neznatan. Međutim u ranoj fazi denaturacije miozina pokazano je da dolazi do promena u stanju vode. Tako je pokazano postojanje direktnog uticaja stanja denaturisanosti proteina na teksturu i stanje vode u sistemu mesa.

DSC krive dobijene za sveže meso pri različitim brzinama grejanja prikazane su na Slici 46., a u Tabeli 13. dati su termodinamički parametri denaturacije proteina mesa pri različitim brzinama grejanja.

Iz dobijenih rezultata primećuje se pomak temperatura kao i promene entalpija denaturacije proteina pri različitim brzinama grejanja. Kinetički parametri denaturacije proteina mesa dobijeni su primenom neizoternog kinetičkog modela koji su Istrate i autori (*Istrate et al 2009*) primenili na parćenje kinetike denaturacije  $\alpha$ -keratina ljudske kose.





**Slika 46.** DSC krive denaturacije proteina svežeg mesa dobijene pri različitim brzinama grejanja.

**Tabela 13.** Termodinamički parametri denturacije proteina svežeg mesa dobijeni pri različitim brzinama grejanja.

Hr (C°/min)	Protein 1			Protein 2			Protein 3		
	T <sub>o1</sub> (C°)	T <sub>p1</sub> (C°)	ΔH <sub>1</sub> (J/g)	T <sub>o2</sub> (C°)	T <sub>p2</sub> (C°)	ΔH <sub>2</sub> (J/g)	T <sub>o3</sub> (C°)	T <sub>p3</sub> (C°)	ΔH <sub>3</sub> (J/g)
0.5	47.97	51.29	0.369	54.41	57.50	0.245	69.62	72.46	0.188
0.5	47.97	51.12	0.385	54.26	58.11	0.186	69.21	72.28	0.236
0.5	47.95	51.15	0.372	54.36	57.90	0.215	69.50	72.30	0.220
sr. vred.	47.9633	51.1866	0.37533	54.34333	57.83667	0.215333	69.44333	72.3466	0.02444
st. dev.	0.01154	0.09073	0.00850	0.07637	0.30989	0.02950	0.21079	0.09865	0.10450
1	48.18	51.35	0.356	56.07	58.11	0.079	71.25	74.25	0.231
1	46.00	50.21	0.511	57.75	58.93	0.0204	71.35	73.77	0.112
1	49.76	54.32	1.098	63.52	65.63	0.045	71.47	73.93	0.144
sr. vred.	47.98	51.96	0.655	59.1133	60.89	0.04813	71.3566	73.9833	0.16233
st. dev.	1.88796	2.12181	0.39139	3.90763	4.12538	0.02942	0.11015	0.24440	0.06158
1.5	50.24	54.07	0.896	61.65	65.41	0.160	72.61	75.05	0.179
1.5	50.28	54.36	0.506	63.16	65.48	0.081	72.19	75.85	0.163
1.5	49.63	54.21	0.668	63.35	65.71	0.033	71.49	74.70	0.241
sr. vred.	50.05	54.2133	0.69	62.72	65.5333	0.09133	72.0966	0.43333	50.05
st. dev.	0.36428	0.14502	0.19592	0.93150	0.15695	0.06412	0.56580	0.58949	0.36428
2	51.16	55.84	0.579	63.69	65.33	0.008	-	-	-
2	50.92	56.36	0.855	63.00	66.55	0.173	73.32	75.60	0.135
2	51.17	55.90	0.651	63.48	66.53	0.084	72.85	75.56	0.172
sr. vred.	51.0833	56.0333	0.695	63.39	66.1366	0.08833	73.085	75.58	0.1535
st. dev.	0.14153	0.28448	0.14316	0.35369	0.69866	0.08258	0.33234	0.02828	0.02616
3	57.60	57.95	0.506	-	-	-	74.09	74.68	3.56
3	50.00	54.10	0.122	63.44	65.61	0.020	74.64	76.84	0.072
3	51.70	55.63	0.144	-	-	-	-	-	-
3	51.75	56.33	0.291	63.37	66.85	0.087	73.80	76.44	0.185
3	51.77	56.44	0.365	63.28	67.07	0.102	73.99	76.39	0.145
sr. vred.	51.364	55.89	0.2256	63.3633	66.51	0.06966	74.13	76.0875	0.9905
st. dev.	0.76533	1.10582	0.10184	0.08020	0.78714	0.04366	0.36064	0.9597	1.71363
5	52.21	56.27	0.116	62.82	67.13	0.122	75.25	78.19	0.144
5	52.29	55.69	0.095	62.96	65.70	0.028	76.10	78.29	0.068
5	52.47	55.97	0.049	63.11	67.13	0.109	75.01	77.88	0.183
sr. vred.	52.3233	55.9766	0.08666	62.9633	66.6533	0.08633	75.4533	78.12	0.13166

st. dev.	0.13316	0.29005	0.03426	0.14502	0.82561	0.05093	0.57274	0.21377	0.05848
10	58.14	60.25	0.005	63.58	69.12	0.126	79.26	80.46	8.144
10	54.17	57.00	0.020	61.99	67.42	0.173	79.98	83.11	139.1?
10	58.13	61.25	0.015	66.07	70.27	0.058	76.61	79.59	0.141
10	56.51	59.76	0.031	65.86	70.18	0.05	76.60	79.06	0.113
10	56.39	58.40	0.139	62.01	69.89	0.139	77.97	80.33	0.139
10	56.04	58.74	0.214	65.39	70.41	0.089	77.93	79.80	0.093
10	55.61	57.94	0.061	66.70	70.75	0.03	77.85	80.01	0.010
10	56.51	58.98	0.045	65.29	69.52	0.02	-	-	-
sr. vred.	56.5316	59.04	0.11475	64.6112	69.695	0.08562	78.0285	80.3371	0.1215
st. dev.	1.29615	1.34914	0.07787	1.84461	1.05322	0.05549	1.25317	1.3095	0.02288

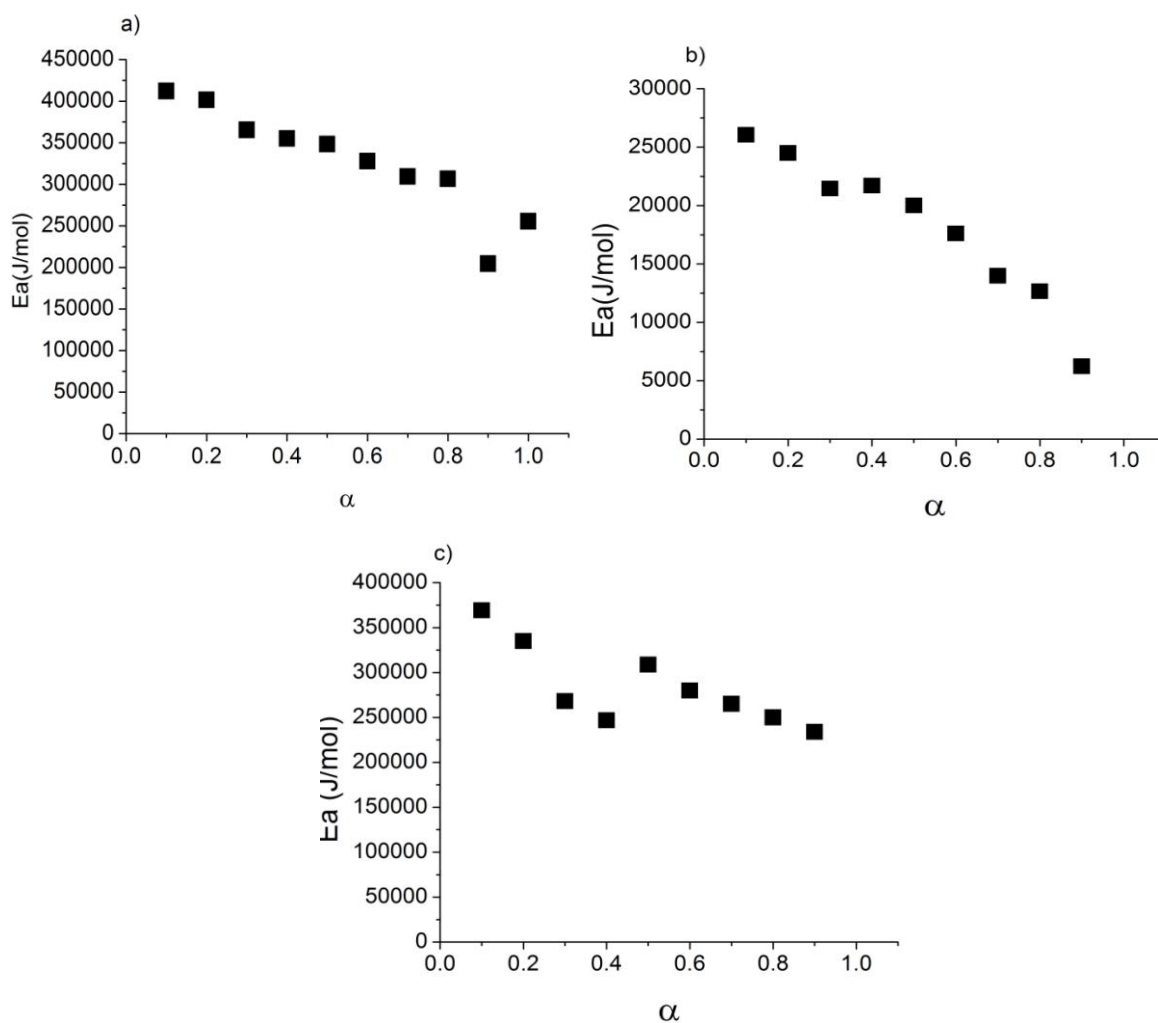
**Tabela 14.** Termodinamički parametri denturacije proteina osmotski sušenog svinjskog mesa dobijeni pri različitim brzinama grejanja.

Hr (C°/min)	Protein 1			Protein 2			Protein 3		
	T <sub>o1</sub> (C°)	T <sub>p1</sub> (C°)	ΔH <sub>1</sub> (J/g)	T <sub>o2</sub> (C°)	T <sub>p2</sub> (C°)	ΔH <sub>2</sub> (J/g)	T <sub>o3</sub> (C°)	T <sub>p3</sub> (C°)	ΔH <sub>3</sub> (J/g)
0.5	42.97	49.30	0.205	-	-	-	74.37	77.83	0.361
0.5	43.00	48.97	0.180	-	-	-	74.50	78.30	0.325
0.5	43.80	49.26	0.220	-	-	-	73.98	77.91	0.355
sr. vred.	43.2566	49.176	0.2016				74.2833	78.0133	0.347
st. dev.	0.47077	0.1800	0.0202				0.27061	0.25146	0.01928
1.5	58.81	60.54	0.004	68.44	70.60	0.030	77.60	80.73	0.346
1.5	58.90	61.03	0.007	68.59	70.90	0.027	78.10	81.20	0.339
1.5	58.77	60.40	0.009	68.9	70.65	0.035	77.80	80.80	0.350
1.5	58.83	60.62	0.004	68.42	70.53	0.040	77.45	89.67	0.341
sr. vred.	58.827	60.647	0.006	68.5875	70.67	0.033	77.7375	83.1	0.344
st. dev.	0.0543	0.2707	0.0025	0.22171	0.16103	0.00571	0.28099	4.38489	0.00496
2	52.84	59.72	0.374	68.53	70.81	0.084	76.88	81.16	0.609
2	55.67	60.24	0.119	68.84	70.85	0.018	75.02	80.53	2.78
2	53.40	59.99	0.360	68.47	70.90	0.090	76.80	82.34	0.980
sr. vred.	53.97	59.983	0.2843	68.6133	70.8533	0.064	76.2333	81.3433	1.45633
st. dev.	1.49863	0.2600	0.1433	0.19857	0.04509	0.03995	1.05154	0.91882	1.16124
3	53.79	60.53	0.455	68.76	71.95	0.087	77.46	81.83	0.484

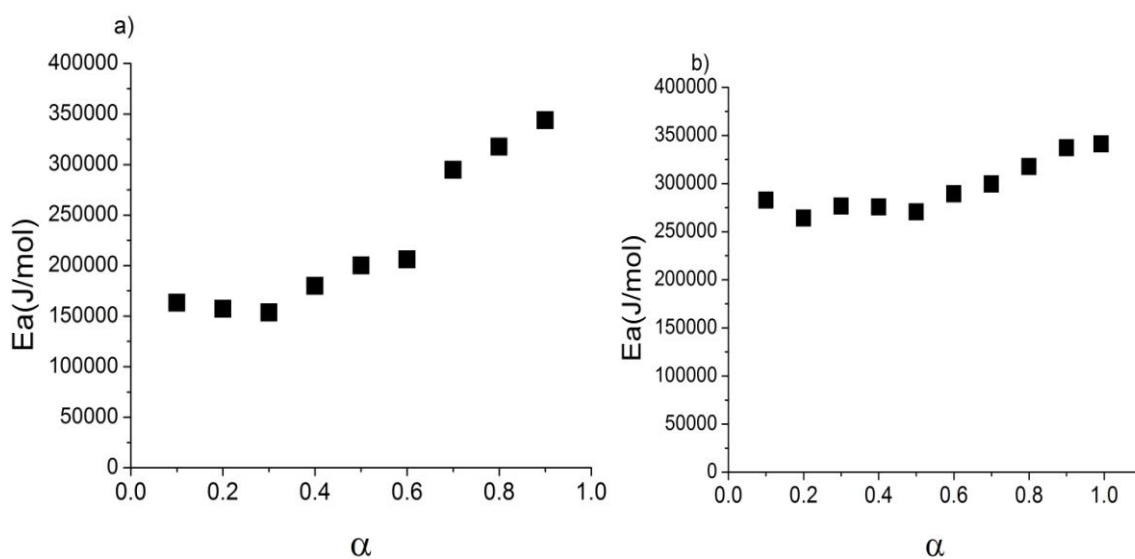
3	56.61	60.85	0.034	68.06	69.67	0.0029	79.58	82.42	0.270
3	54.53	61.42	0.319	69.60	72.78	0.048	78.04	81.67	0.432
sr. vred.	54.9766	60.933	0.2693	68.8066	71.4666	0.04596	78.36	81.9733	0.39533
st. dev.	1.46209	0.4508	0.2148	0.77106	1.61035	0.04208	1.09562	0.39501	0.11161
5	58.98	63.94	0.024	69.78	73.55	0.106	79.48	83.21	0.366
5	60.18	64.25	0.038	71.07	74.60	0.059	80.59	83.11	0.565
5	60.15	64.15	0.024	70.88	73.80	0.027	77.47	82.23	0.253
sr. vred.	59.77	64.113	0.0286	70.5766	73.9833	0.064	79.18	82.85	0.39466
st. dev.	0.68432	0.1582	0.0081	0.69644	0.54848	0.03974	1.58148	0.53926	0.15796
7	57.32	60.79	0.0298	71.21	73.84	0.094	80.76	83.21	0.510
7	58.17	63.77	0.097	71.62	75.23	0.044	80.83	83.88	0.185
7	59.11	61.92	0.005	71.61	75.50	0.153	82.33	84.71	0.591
sr. vred.	58.2	62.16	0.04393	71.48	74.8566	0.097	81.3066	83.9333	0.42866
st. dev.	0.89537	1.5044	0.04760	0.23388	0.89074	0.05456	0.88692	0.75142	0.21487
8.5	65.10	66.29	0.014	73.41	76.50	0.230	83.34	87.08	0.658
8.5	59.15	67.94	0.040	72.88	74.46	0.042	81.75	84.91	0.668
8.5	62.98	65.19	0.004	71.53	74.33	0.147	80.98	84.27	0.754
sr. vred.	58.2	62.16	0.0439	71.48	74.8566	0.097	81.3066	83.9333	0.42866
st. dev.	0.89537	1.5044	0.0476	0.23388	0.89074	0.05456	0.88692	0.75142	0.21487
10	58.76	62.83	0.015	70.50	73.42	0.292	80.96	83.89	0.561
10	57.63	63.11	0.309	72.49	75.60	0.275	81.91	85.49	0.914
10	62.64	61.13	0.004	73.43	76.39	0.057	81.72	86.44	0.635
10	60.78	62.80	0.007	72.39	75.62	0.196	82.70	85.78	0.671
sr. vred.	59.9525	62.467	0.0837	72.2025	75.2575	0.205	81.8225	85.4	0.69525
st. dev.	2.21536	0.9025	0.1502	1.22788	1.27902	0.10716	0.71462	1.08231	0.15285

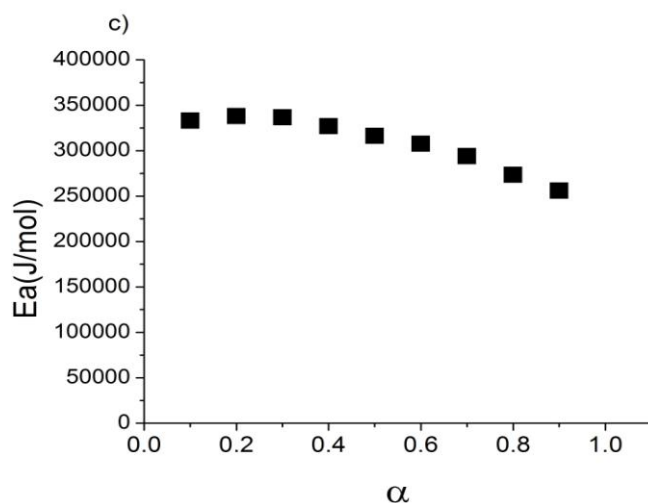
Dobijena je zavisnost energije aktivacije ( $E_a$ ) od stepena konverzije ( $\alpha$ ) pomoću Friedman-ove izokonverzije metode (*Friedman 1966*). Podaci za izračunavanje kinetičkih parametara su dobijeni iz serije eksperimenata sprovedenih pri različitim brzinama grejanja, ali sa istim stepenom konverzije ( $\alpha$ ).

Zavisnost energije aktivacije ( $E_a$ ) od stepena konverzije za termalne prelaze koji odgovaraju denaturaciji proteina svežeg mesa: miozina, kolagena i aktina prikazane su na Slici 47.



**Slika 47.** Zavisnost energije aktivacije ( $E_a$ ) od stepena konverzije ( $\alpha$ ) za termalne prelaze koji odgovaraju denaturaciji proteina svežeg svinjskog mesa: a) miozina, b) kolagena i c) aktina.





**Slika 48.** Zavisnost energije aktivacije ( $E_a$ ) od stepena konverzije ( $\alpha$ ) za termalne prelaze koji odgovaraju denaturaciji proteina osmotski osušenog svinjskog mesa: a) miozina, b) kolagena i c) aktina.

Pokazano je da energije aktivacije ( $E_a$ ) za sva tri proteina svežeg mesa s porastom stepena konverzije ( $\alpha$ ) opadaju (Slika 47) što odgovara kinetičkoj šemi endotermne reverzibilne reakcije (Istrate et al 2009). Dobijene  $E_a$  se kreću između 200-410 kJ/mol za miozin, 120-230 kJ/mol za kolagen i sarkoplazmatske proteine i između 290-370 kJ/mol za aktin pri stepenu konverzije ( $\alpha$ ) od 0.1 do 0.9 i u saglasnosti su s literaturnim podacima (Istrate et al 2009) te po vrednostima ulaze u široki opseg koji je dobijen za termalnu denaturaciju tkiva sisara (J. C. Bischof i X.-M. He, 2005).

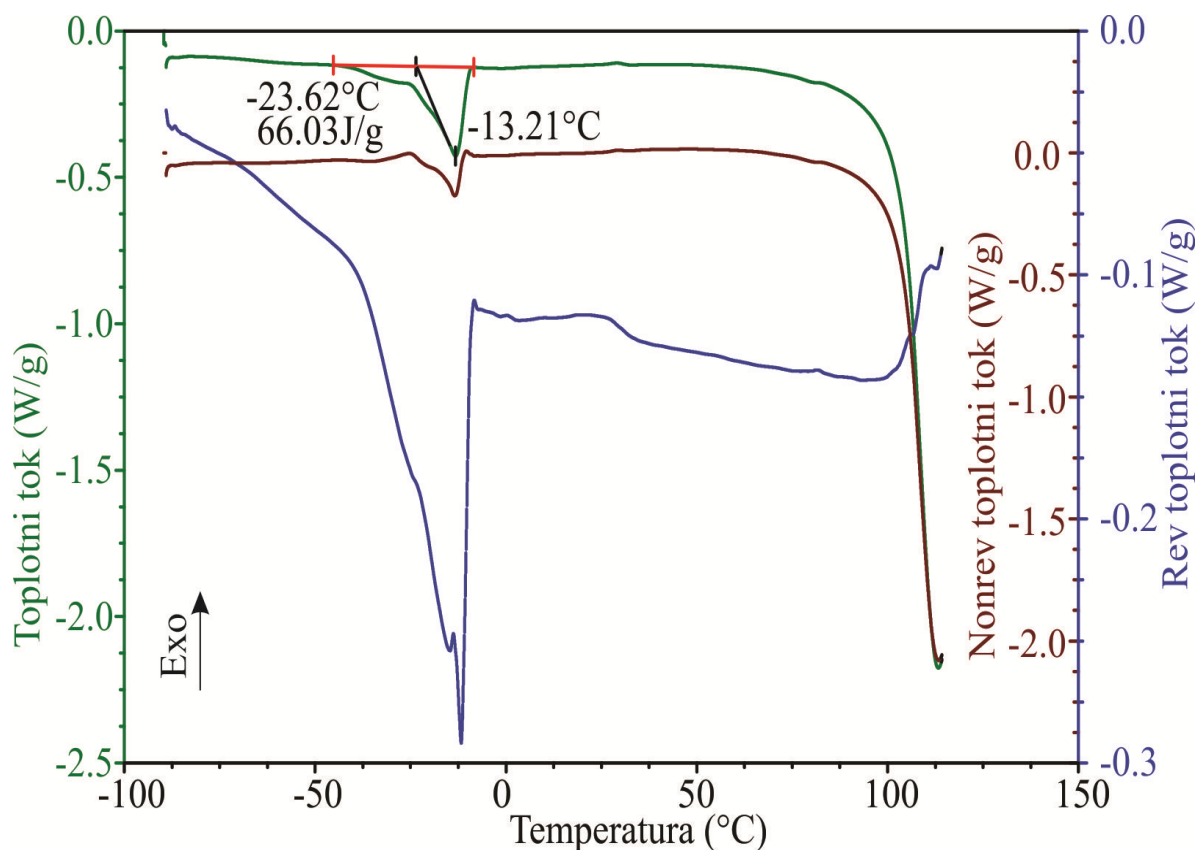
Vyazovkin i autori (Vyazovkin et al 2009) su pokazali da ovakvi rezultati dobijeni za zavisnost  $E_a$  i ( $\alpha$ ) su očigledno posledica više stepenskog procesa denaturacije.

Određene  $E_a$  za proteine osmotski osušenog svinjskog mesa se kreću između 156.07 - 350.05 kJ/mol za miozin, 250-350 kJ/mol za kolagen i sarkoplazmatske proteine i između 250.69-350.41 kJ/mol za aktin pri stepenu konverzije ( $\alpha$ ) od 0.1 do 0.9. (Slika 48)

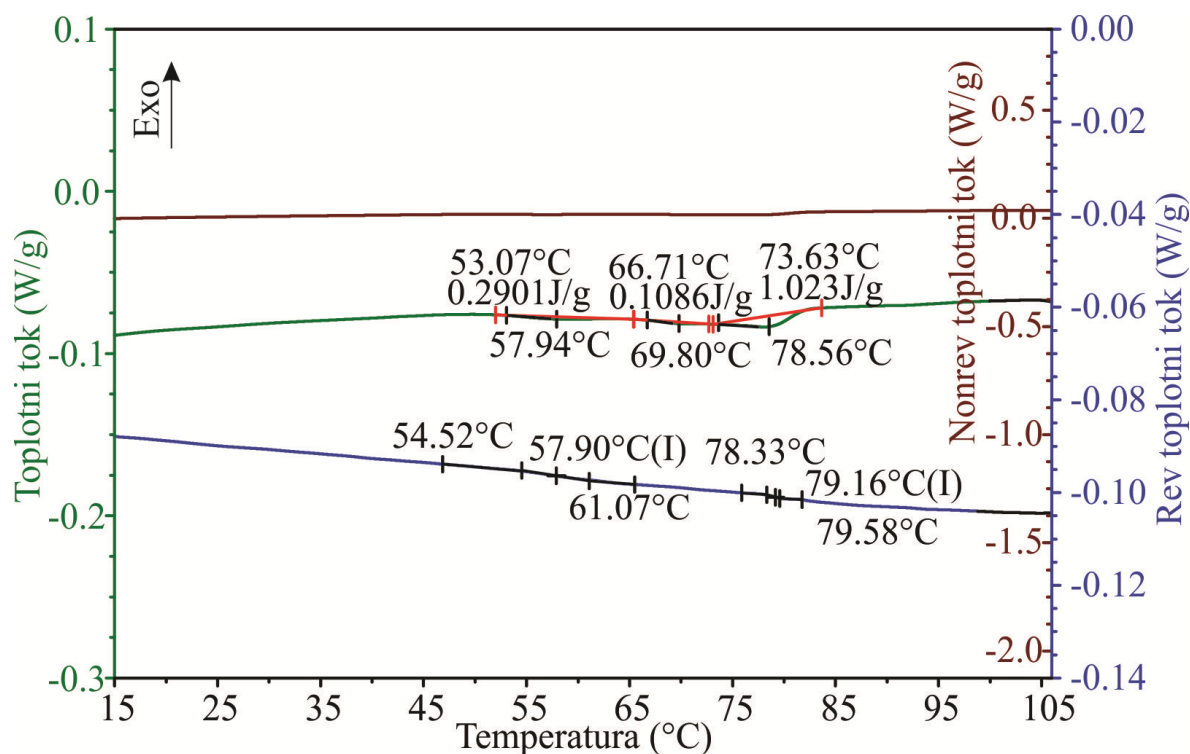
**Vrednosti energije aktivacije ( $E_a$ ) dobijene za proteine osmotski osušenog mesa su nešto veće od vrednosti  $E_a$  dobijenih za sveže meso, što je u saglasnosti s rezultatima koji se odnose na povišene temperaturske maksimume denaturacije proteina osmotski osušenog mesa, nađene u ovom radu. Zbog toga može da se pretpostavi da je izgrađena proteinska osnova termalno i kinetički stabilnija.**

#### 4.9. Modulovana diferencijalna kalorimetrija (MDSC) osmotski dehidratiranog svinjskog mesa

Na Slici 49. i Slici 50. prikazane su MDSC krive dobijene za osmotski osušeno svinjsko meso *Longissimus dorsi* u temperaturskom opsegu od  $-90^{\circ}\text{C}$  do  $100^{\circ}\text{C}$  i u temperaturskom opsegu od  $5^{\circ}\text{C}$  do  $100^{\circ}\text{C}$  u hermetičkim čančićima.



**Slika 49.** MDSC krive dobijene za osmotski osušeno svinjsko meso *Longissiomus dorsi* u temperaturskom opsegu od  $-90^{\circ}\text{C}$  do  $100^{\circ}\text{C}$



**Slika 50.** MDSC krive dobijene za osmotski osušeno svinjsko meso *Longissimus dorsi* u temperaturskom rasponu od 20°C do 100°C

MDSC krive dobijene za osmotski osušeno svinjsko meso *Longissimus dorsi* u temperaturskom rasponu od -90°C do 100°C (Slika 48), na krivoj koja odgovara ukupnom toplotnom toku vidljiv je izražen složeni endotermni prelaz, s „ramenom“, koji odgovara topljenju leda, s minimumom prelaza na temperaturi  $T_m = -13.2^\circ\text{C}$ , temperaturom početka prelaza  $T_{\text{onset}} = -23.1^\circ\text{C}$  i entalpijom prelaza  $\Delta H = 66.03\text{J/g}$ . Sličan profil krive je zabeležen i na krivama koje daju reverzibilni i ireverzibilni toplotni tok.

MDSC krive dobijene za osmotski sušeno meso u temperaturskom rasponu od 5 °C do 100 °C prate dešavanja u uzorku koja se odnose na stanje proteina i njihovu denaturaciju, bez prethodnog pothlađivanja (Slika 49) kako bi se izbegla denaturacija hlađenjem (kao što je to slučaj na prethodnom MDSC snimku (Slika 49)). Na krivoj koja odgovara ukupnom toplotnom toku, nađena su tri endotermna prelaza koja odgovaraju denaturaciji proteina miozina, kolagena i sarkoplazmatskih proteina i aktina (Bertram et al 2006) sa temperaturama prelaza  $T_{\text{onset}} = 53.0^\circ\text{C}$ ,  $T_m = 57.9^\circ\text{C}$  i entalpijom prelaza  $\Delta H = 0.290\text{J/g}$  za miozin,  $T_{\text{onset}} = 66.7^\circ\text{C}$ ,  $T_m = 69.8^\circ\text{C}$  i entalpijom prelaza  $\Delta H = 0.108\text{J/g}$  za kolagen i sarkoplazmatske proteine i  $T_{\text{onset}} = 73.6^\circ\text{C}$ ,  $T_m = 78.6^\circ\text{C}$  i entalpijom prelaza  $\Delta H = 1.023\text{J/g}$  za aktin. Na krivoj koja odgovara reverzibilnom toplotnom toku nađeni su staklasti prelazi koji se nalaze u temperaturskom opsegu denaturacije miozina i aktina određenim na DSC



krivoj koja odgovara ukupnom toplotnom toku. Određene temperature staklastih prelaza iznose:  $T_{\text{onset}} = 55.6^{\circ}\text{C}$ ,  $T_g = 57.9^{\circ}\text{C}$   $T_{\text{final}} = 61.3^{\circ}$ , za prvi staklasti prelaz i  $T_{\text{onset}} = 78.2^{\circ}\text{C}$ ,  $T_g = 79.2^{\circ}\text{C}$   $T_{\text{final}} = 79.7^{\circ}\text{C}$ . Na krivoj koja odgovara nereverzibilnom toplotnom toku nema termalnih dešavanja koja se bitno razlikuju od krive ukupnog toplotnog toka.

Pomoću tehnike MDSC moguće je odvojiti zabeleženi toplotni tok u dve komponente koje odgovaraju karakteristikama toplotnog kapaciteta (reverzibilni toplotni tok) i toplotni tok koji odgovara kinetičkim promenama (*Gill, et al 1993. , Reading, et al 1994.*) Nereverzibilni toplotni tok je izazvan procesima koji nisu reverzibilni u vremenskom opsegu od jednog perioda sinusoidne modulacije, tj. pravim ireverzibilnim procesima kao što su oksidativno razlaganje, kristalizacija amornog materijala itd. Proces koji su termodinamički reverzibilni u vremenu trajanja jednog perioda modulacije izazivaju pojave kao što su staklasti prelazi (*Orlien et al 2003*).

Rezultati dobijeni za nereverzibilni toplotni tok osušenog mesa u temperaturskom opsegu od  $-90^{\circ}\text{C}$  do  $120^{\circ}\text{C}$  (Slika 49) ukazuju na postojanje nekoliko energetskih procesa pri topljenju leda u uzorku. Javlja se trostepeni ireverzibilni proces zabeležen na krivoj nereverzibilnog toplotnog toka. Na DSC krivoj koja odgovara ukupnom toplotnom toku vidljiv je samo dvostepenski proces. Ovi rezultati su u sglasnosti s rezultatima ranije prikazanim u ovom radu, a koji se odnose na stanje vode u novonastaloj proteinskoj osnovi osmotski dehidratiranog mesa.

Kod nereverzibilnog toplotnog toka dobijenog za osmotski osušeno meso na DSC snimcima od  $5^{\circ}\text{C}$  do  $120^{\circ}\text{C}$  nije bilo značajnijih promena. To ukazuje da je reverzibilni toplotni tok pokazatelj slabih endotermnih protein-protein agregacija uzrokovanih elektrostatskim i vodoničnim vezama (*Fernandez et al 2009, Micard et al 2000*).

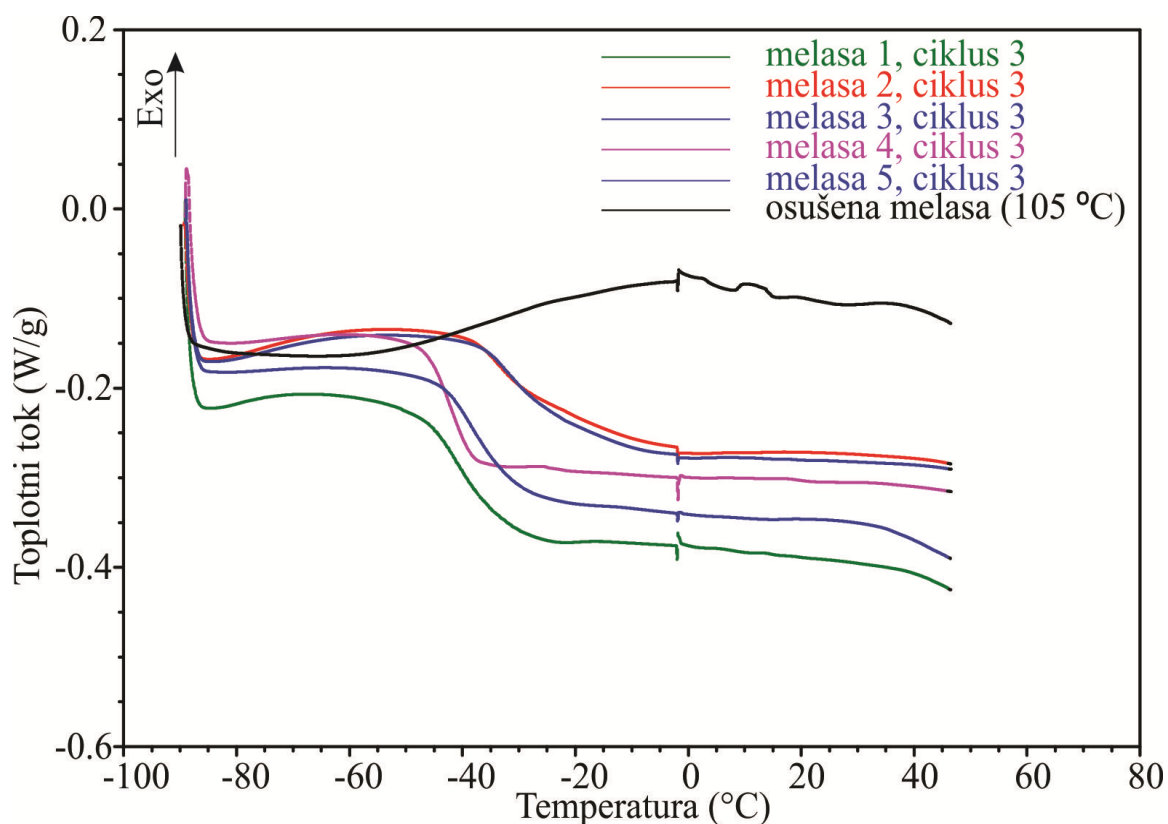
Međutim, dobijeni rezultati reverzibilnog toplotnog toka ukazuju na postojanje staklastih prelaza i to u isto vreme s denaturacijom proteina (opisani endotermni prelazi ukupnog toplotnog toka). Ovi procesi su ireverzibilni. Sličo su zapazili Fernandez i autori (*Fernandez et al 2009*) proučavajući želiranje svinjskog mesa. Pojava staklastih prelaza u reverzibilnom toplotnom toku odigrala se pri ponovljenom snimku (ponovljeni isti termalni ciklus). **Iz ovih podataka može da se pretpostavi da u uzorku dehidratiranog svinjskog mesa postoji deo proteina koji daju prelaze proteinske denaturacije, dok je deo proteina nagradio novu proteinsku osnovu osmotskom dehidratacijom i daje prelaze karakteristične za umrežene makromolekule i gelove** (*Fernandez et al 2009*).

Evidentno je očuvanje nativne strukture jednog dela proteina, što je postignuto interakcijom proteinske baze s koncentrovanim ugljikohidratima (Roos i Potes 2015).

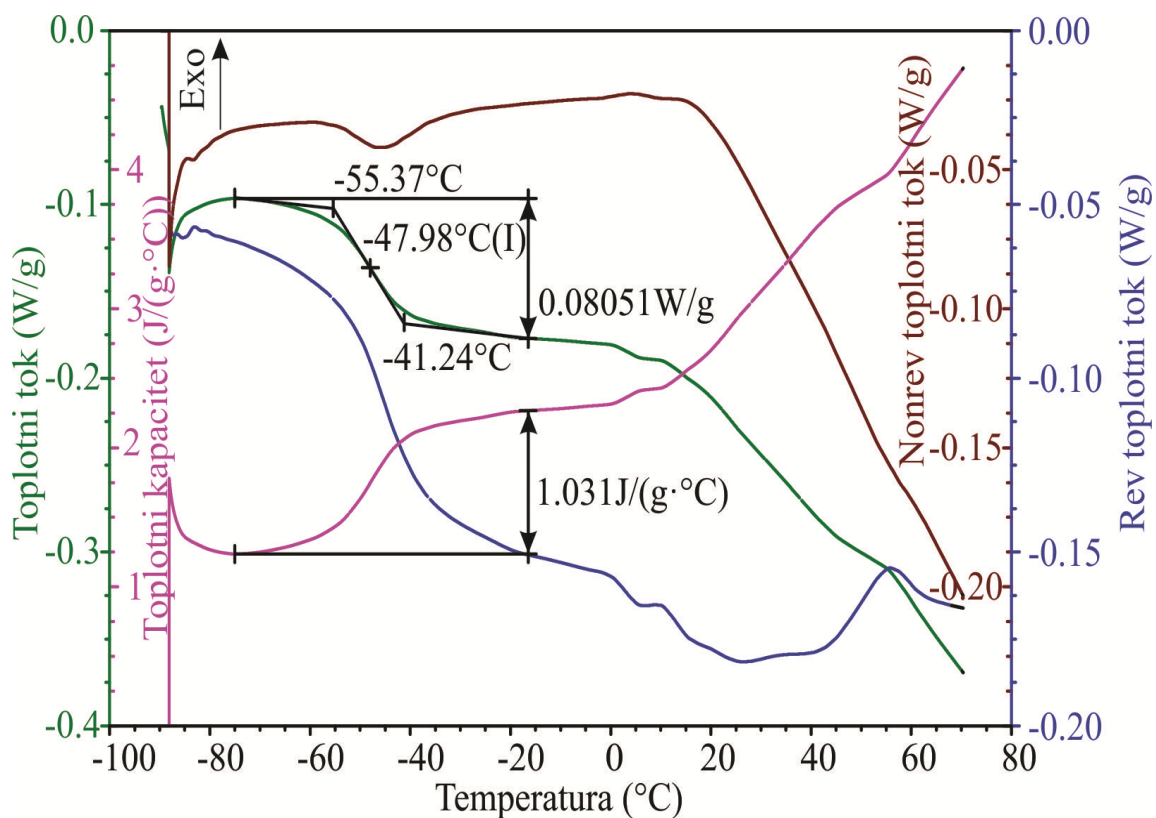
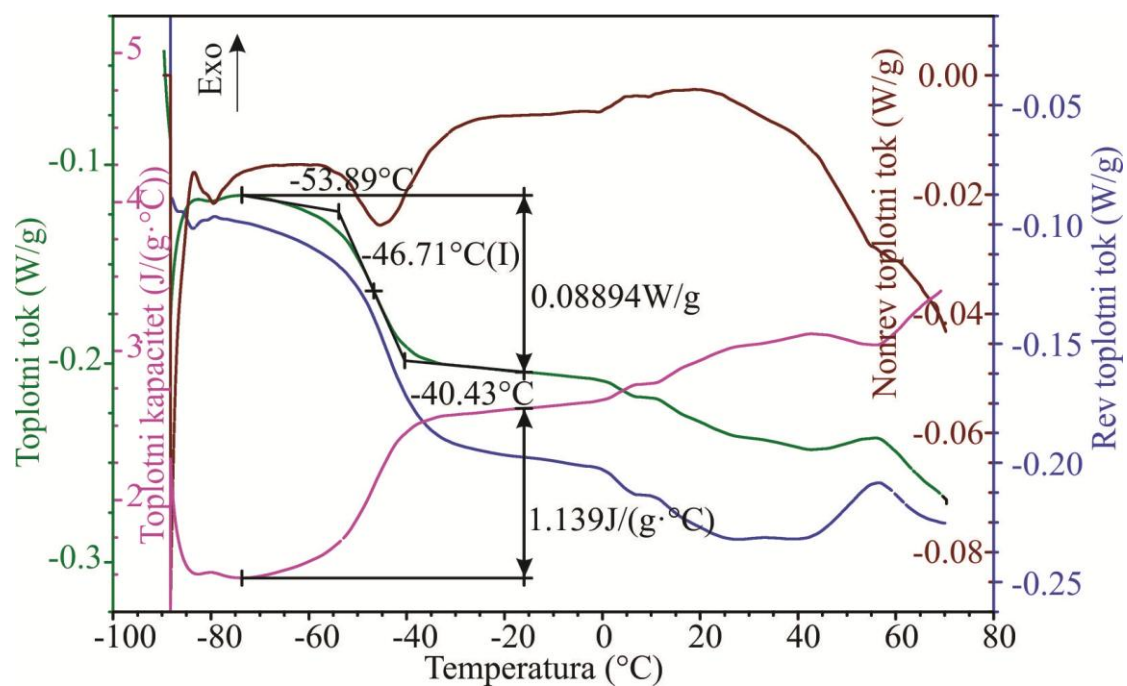
#### 4.10. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) i modulovana diferencijalna kalorimetrija (MDSC) melase

Pet uzoraka melase, mase od 5-7 mg dobijeni iz tri srpske šećerane, s različitim sadržajem prisutne vode, pre i posle osmotske dehidratacije mesa i jedan uzorak dehidratirane melase ciklično su snimani: grejanje-hlađenje-grejanje u temperaturskom opsegu od  $-90^{\circ}\text{C}$  do  $90^{\circ}\text{C}$ , brzinom grejanja  $H_r=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  i brzinom hlađenja  $C_r=5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , pri protoku  $\text{N}_2$  50 ml/min. MDSC snimci su dobijeni u temperaturskom opsegu od  $-90^{\circ}\text{C}$  to  $90^{\circ}\text{C}$  pri brzini grejanja  $H_r=5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  sa modulacijom temperature amplitude  $\pm 0.80^{\circ}\text{C}$  i periodom modulacije 60s, pri protoku  $\text{N}_2$  50 ml/min.

Dobijeni rezultati DSC (Slika 51) i MDSC (Slika 52) analize melase pokazali su postojanje jedinstvenog staklastog prelaza u svim uzorcima ispitivane melase, u temperaturskom opsegu od  $-90^{\circ}\text{C}$  do  $90^{\circ}\text{C}$  (Tabela 15).



Slika 51. DSC krive melase i osušene melase



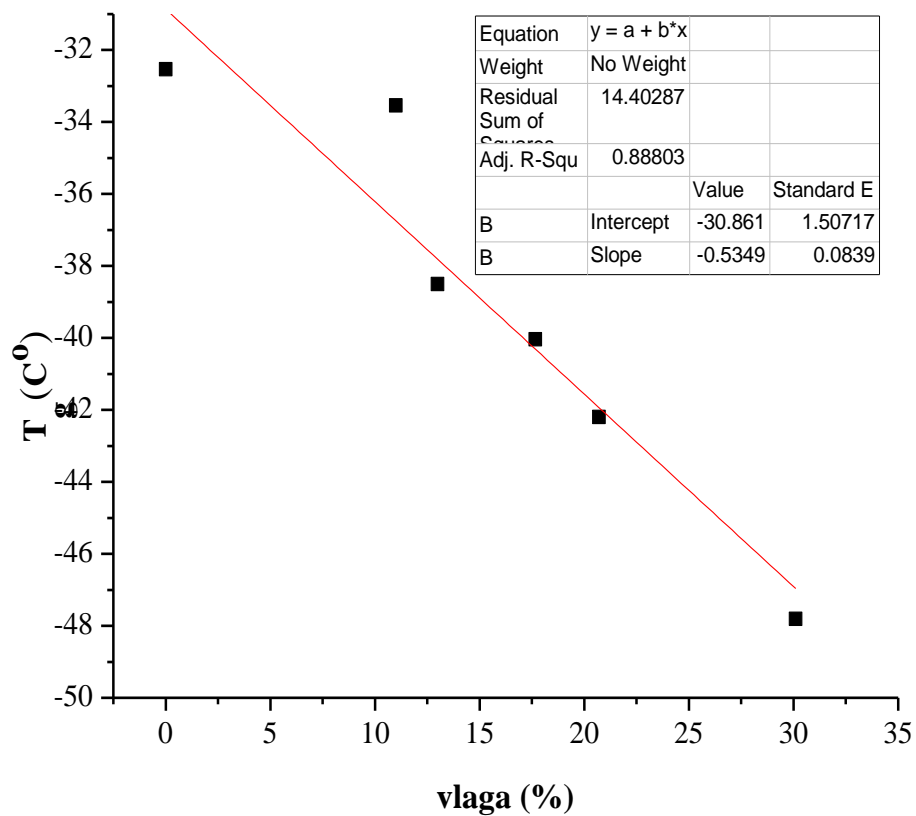
**Slika 52.** Tipične MDSC krive melase šećerne repe: a) melasa s 25% vlage; b) melasa s 30% vlage

**Tabela 15.** Temperatura staklastog prelaza ( $T_g$ ), toplotni kapacitet ( $\Delta C_p$ ) i vlaga (%) melase i potpuno suve melase.

<b>melasa</b>	<b><math>T_{on}</math> (°C)</b>	<b><math>T_g</math> (°C)</b>	<b><math>T_{end}</math> (°C)</b>	<b><math>\Delta C_p</math> (J/g°C)</b>	<b>Vlaga (%)</b>
<b>1</b>	-47.0±0.9	-40.1±0.5	-33.10±1.5	1.08±0.09	17.66
<b>2</b>	-38.69±1.1	-33.5±0.2	-33.5±1.3	0.90±0.10	11.03
<b>3</b>	-46.5±0.7	-42.2±0.4	-38.4±0.9	1.03±0.08	20.70
<b>4</b>	-47.3±0.6	-38.5±0.3	-30.1±1.1	1.14±0.05	13.7
<b>5</b>	-53.0±1.0	-47.8±0.7	43.06±1.6	1.16±0.10	30.1
<b>Suva melasa</b>	-52.83±1.2	-32.53±0.6	-19.50±1.8	0.51±0.03	0

Temperatura staklastog prelaza ( $T_g$ ) je u saglasnosti s rezultatima iz literature (Sopade et al 2007). Temperature staklastog prelaza su se kretale od -54.30 °C do -32.10 °C, a toplotni kapacitet ( $\Delta C_p$ ) u vrednostima od 1.1 do 2.4 J/g°C ( Slika 51. i Tabela 15.). Osušena melasa je imala staklasti prelaz  $T_g$  na temperaturi -33.0 °C, što je u saglasnosti sa podacima koje su dobili Sopade i saradnici (Sopade et al 2007) koristeći Fox-ov model za predikciju staklastog prelaza suve melase. Uzorci melase s najvećim procentom vlage imali su najmanje temperature staklastog prelaza, dok su najveće temperature staklastog prelaza dobijene za uzorke melase koji su sadržali manje vlage i za uzorak suve melase (Slika 53). Dobijeni rezultati  $T_g$  vrednosti su uporedivi sa vrednostima koje je dobio Roos (Roos 1993) za staklaste prelaze niskomolekulskih ugljenih hidrata. Voda je poznata po svom “plastifikujućem” delovanju, uopšte uzev na sve materijale, uključujući i melasu. Što je veća količina vode prisutna u materijalu to je temperatura staklastog prelaza niža (Rahman 1995, Roos 1995 Collares et al 2004).

Dobijene MDSC krive uzoraka melase pokazale su termalna svojstva melase pri nižim temperaturama. Dobijene krive reverzibilnog i nereverzibilnog toplotnog toka ukazuju na postojanje jednoobraznog termalnog procesa (Slika 51).



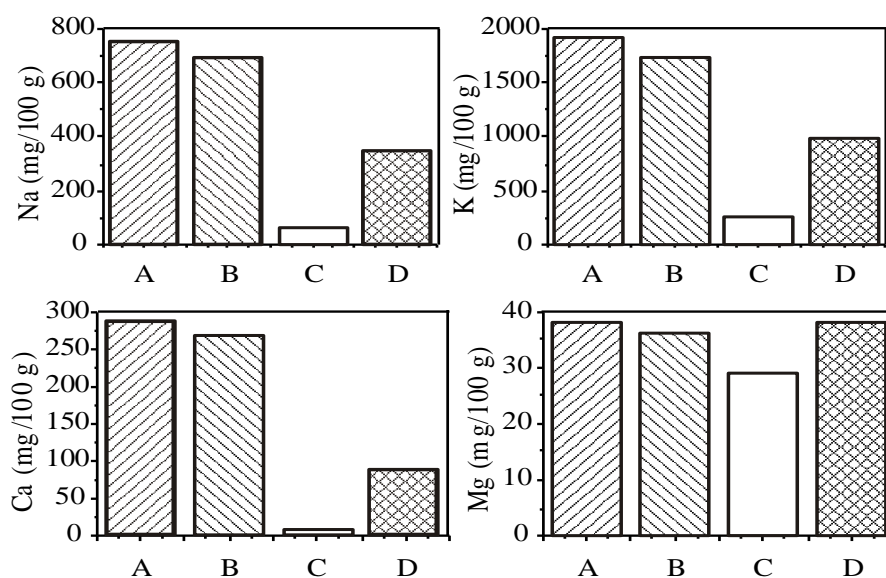
**Slika 53.** Zavisnost temperature staklastog prelaza ( $T_g$ ) od količine vode (%) u uzorcima melase.

#### 4.11. Analiza sastava makroelemenata osmotski dehidratanog svinjskog mesa melasom šećerne repe

Rezultat procesa osmotske dehidracije mesa u rastvoru melase šećerne repe su promjenjene nutritivne, hrtanjive karakteristike dehidriiranog mesa. Sadržaj makroelemenata  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  i  $\text{Mg}^{+2}$  u melasi pre i posle osmotske dehidracije, osmotski dehidratisanom mesu i svežem svinjskom mesu prikazan je u Tabeli 16 i na Slici 54.

**Tabela 16.** Sadržaj makroelemenata  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  i  $\text{Mg}^{+2}$  u melasi pre i posle osmotske dehidracije, osmotski dehidratisanom mesu i u svežem svinjskom mesu

Uzorak	Vlaga $105^{\circ}\text{C}$ (%)	$\text{Na}^+$ (mg/100 g)	$\text{K}^+$ (mg/100 g)	$\text{Ca}^{+2}$ (mg/100 g)	$\text{Mg}^{+2}$ (mg/100 g)
Melasa šećerne repe pre osmotske deh.	20.73±0.64	749±21	1939±9	289±3	37.9±0.7
Melasa šećerne repe posle osmotske deh.	26.79±0.78	689±7	1731±12	268±6	35.9±0.7
Sveže svinjsko meso	72.71±0.54	62±1	250±9	6.3±0.3	29.1±0.6
Osmotskei deh. svinjsko meso	43.69±0.15	342±10	988±6	89±1	37.8±0.8



**Slika 54.** Sadržaj makroelemenata  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  i  $\text{Mg}^{+2}$  u melasi pre i posle osmotske dehidracije, u osmotski dehidratisanom mesu i u svežem svinjskom mesu. A- Melasa šećerne repe pre osmotske dehidracije; B- Melasa šećerne repe posle osmotske dehidracije; C- Sveže svinjsko meso; D- osmotski dehidratisano svinjsko meso.

Dobijeni rezultati sdržaja makroelemenata u melasi šećerne repe u poređenju sa sadržajem makroelemenata u svežem svinjskom mesu pokazali su značajno veći sadržaj  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  i manji sadržaj  $\text{Mg}^{+2}$  u melasi šećerne repe. U osmotski dehidrisanom svinjskom mesu značajan je porast katjona  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  u poređenju s količinom istih katjona u svežem svinjskom mesu Tako je nađeno 5.5 puta više katjona  $\text{Na}^+$ , 4 puta više katjona  $\text{K}^+$  i 13 puta više katjona  $\text{Ca}^{2+}$ . Sadržaj katjona  $\text{Mg}^{+2}$  u osmotski dehidratisanom svinjskom mesu je malo povećan i doseže količine  $\text{Mg}^{+2}$  prisutne u melasi šećerne repe.

Tomović i saradnici 2011 su proučavali sadržaj minerala (fosfora, kalijuma natrijuma, kalcijuma, cinka, gvožđa, bakra i magnezijuma) u mišićnom tkivu (*M. semimembranosus*) i u jetri različitih sojeva svinja prisutnih u Vojvodini. Pokazano je da nema uticaja genetskog porekla svinja na sadržaj minerala određenih u mišićnom tkivu (*M. semimembranosus*) i u jetri svinja. U ovom radu dobijeni rezultati sdržaja makroelemenata u svežem svinjskom mesu u sagalsnosti sa literaturnim podacima (Tomović et al 2011).

Poznato je da mali viševalentni joni organizuju vodu, na taj način što stvaraju tzv. vodu „male gustine“, dok veliki jednovalentni joni dovode do stvaranja „vode visoke gustine“ (Puolanne 2010). Voda male gustine je je inertna i ima veću viskoznosti (a time i smanjuje aktivnost vode) od vode velike gustine. Zbog toga se naziva i voda koja gradi strukturu (*structure making*) – kosmotropska voda koju čine kozmotropski joni. Tako na primer jednovalentni katjoni  $\text{Na}^+$  i  $\text{H}^+$ , dvovalentni katjoni  $\text{Ca}^{+2}$  i  $\text{Mg}^{+2}$ , dvovalentni anjoni  $\text{HPO}_4^{2-}$  i  $\text{SO}_4^{2-}$  hidrofobne amino kiseline, glukoza i neki jednovalentni anioni ( $\text{OH}^-$ ) su kalsifikovani u kosmotrope (Puolanne 2010) i stabilišu nativne konformacije mnogih proteina. Uglavnom, kosmotropi i kaotropi prate Hofmeister –ovu seriju (Baldwin,1996, Puolanne 2010.)

U visokom koncentracijama anjonski kosmotropi su isključeni iz protein–voda međufaze. Kaotropi, rušioci struktura (*structure breaking*) joni poseduju suprotni efekat od kosmotropa, te oslabljuju vodonične mostove, te čine molekule vode pokretljivijim, tzv. ukupnu vodu (*bulk water*) i izgrađuju tzv. „vode velike gustine“. Jaki kaotropi su  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , i  $\text{Br}^-$ , veliki jednovalentni joni  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{C}(\text{NH}_3)^{4+}$ , kao i  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , i  $\text{HSO}_4^-$ .

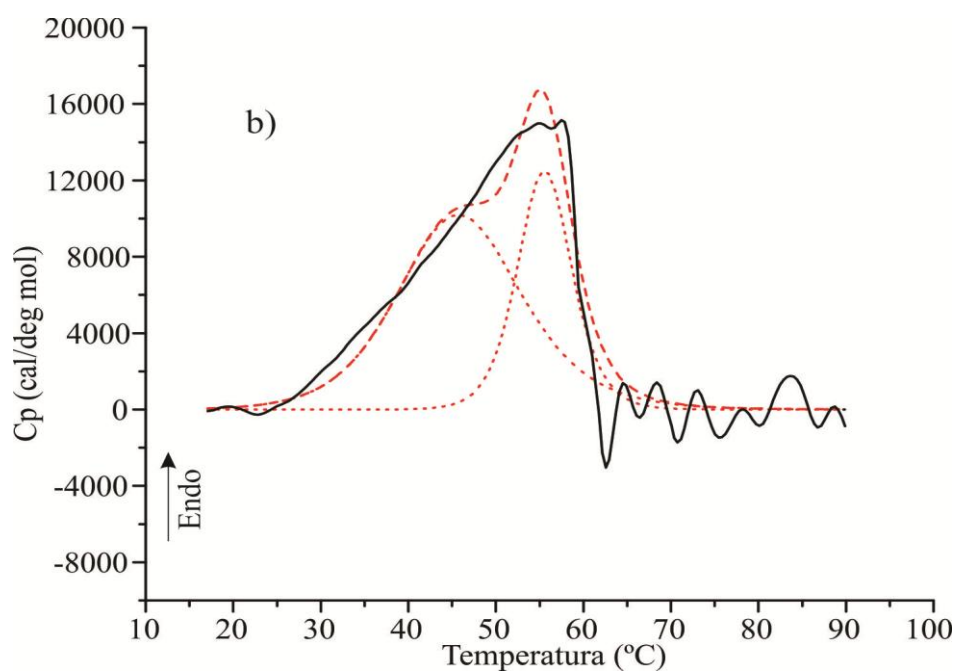
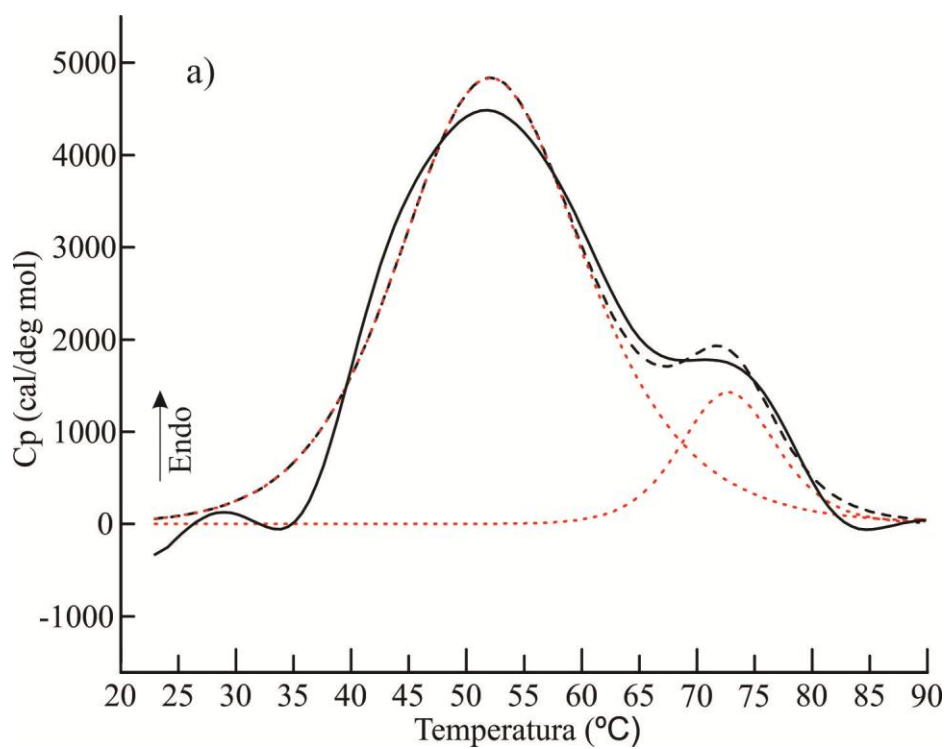
Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju da je tokom osmotske dehidratacije svinjskog mesa melasom šećerne repe, došlo do interakcije s kosmotrofnim jonima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  prisutnih u melasi šećerne repe, koji utiču na stabilizaciju proteinskih struktura, kao i do interakcije s kaotropnim  $\text{K}^+$ . Međutim, nađeno je da se slabo hidratirani joni, kao što su  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$  adsorbuju na nepolarne površine i međufaze, pošto voda pre gradi voda –voda veze

no slabije veze koje gradi sa kaotropima. **Može da se pretpostavi da interakcija proteina mesa s kosmotropnim jonima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  iz mesa utiče na nađenu termalna stabilizaciju osmotski dehidratiranog svinjskog mesa u ovom radu, kao i na pomenutu reorganizaciju vode prisutne u osmotski dehidratiranom mesu.**

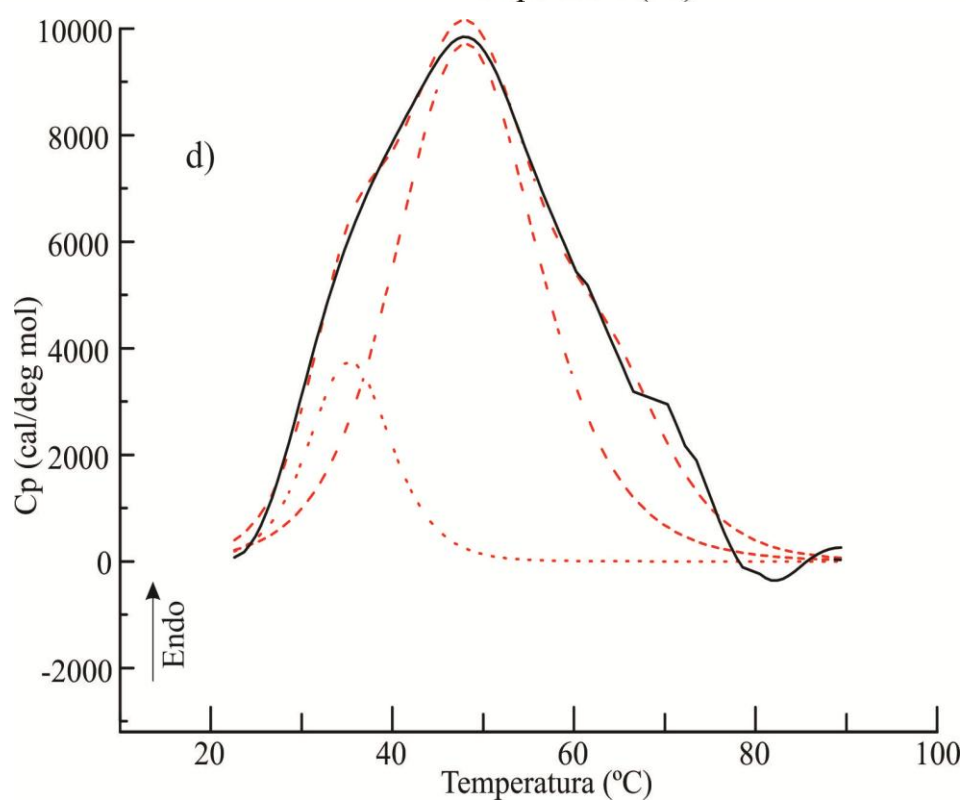
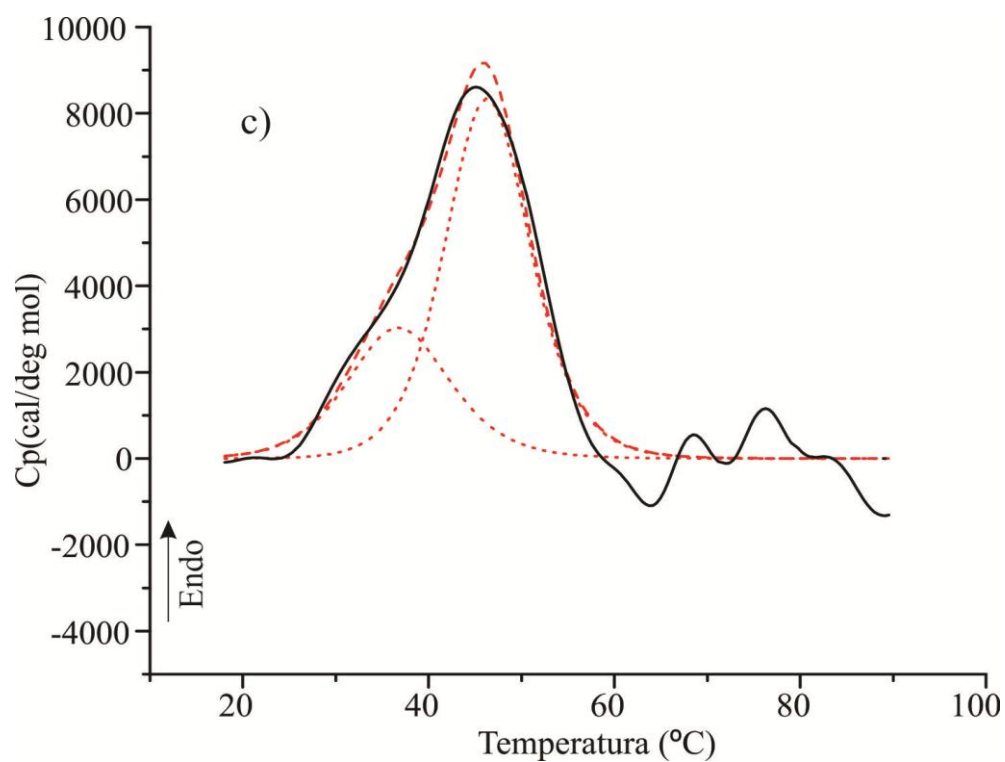
#### **4.12. Interakcija jona s albuminom goveđeg seruma metodom mikro senzitivna diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)**

Interakcija jona s proteinima mesa je od velike važnosti za za proučavanje procesa do kojih dolazi u mesu *post mortem*, koji uveliko određuju kvalitet mesa, kao i u procesima osmotske dehidratacije, gde ove interakcije mogu da utiču na hranjive, mineralne karakteristike proizvoda i bitne osobine stanja vode u dobijenom proizvodu, osmotski osušenom svinjskom mesu (Puolanne 2010). Da bi se prikazala složenost procesa interakcije jona s proteinima mesa, korišćen je model sistem jednostavne interakcije proteina s jonom cinka. Izvršeno je proučavanje interakcije ovog biogenog metala sa albuminom goveđeg seruma (BSA) metodom diferencijalne skenirajuće mikrokalorimetrije. Proces termalne denaturacije BSA (0.05mM) praćen je u uslovima male jonske jačine (dejonizovana voda) i pri dodatku 0.05 mM, 0.30 mM, 0.45 mM, 1.00 mM, 20.00 mM  $\text{ZnCl}_2$  pH=6.2. Dobijene DSC krive pokazale su zavisnost procesa termalne denaturacije od dodatka cinkovih jona. Pokazalo se da su dobijene više vrednosti entalpije denaturacije ( $\Delta H^{\text{cal}}$ ) proteina u prisustvu cinkovih jona ( $\text{Zn}^{+2}$ ) u poređenju s dobijenim entalpijama denaturacije ( $\Delta H^{\text{cal}}$ ) proteina u dejonizovanoj vodi, što znači da je došlo do stabilizacije strukture proteina u prisustvu jona cinka  $\text{Zn}^{+2}$ . Temperature maksimuma prelaza ( $T_m$ ) koji odgovara denaturaciji, odmotavanju (*unfolding*) proteina su neznatno smanjene povećavanjem koncentracije cinkovih jona. Oblik DSC krivih (Slika 55, Tabela 17), koji predstavlja meru kooperativnosti procesa izraženu kao odnos kalorimetrijske entalpije i Vant Hoff-ove entalpije ( $\Delta H^{\text{cal}}/\Delta H^{\text{VH}}$ ), tj. broj domena proteina koji nezavisno prolaze kroz proces denaturacije (Privalov 1980) (Tabela 17) ukazuju na postojanje perturbacija za vreme odmotavanja (*unfolding*) što je povezano s ravnotežom umotanog i razmotanog proteina (Sharke P.D. Ross 1990).

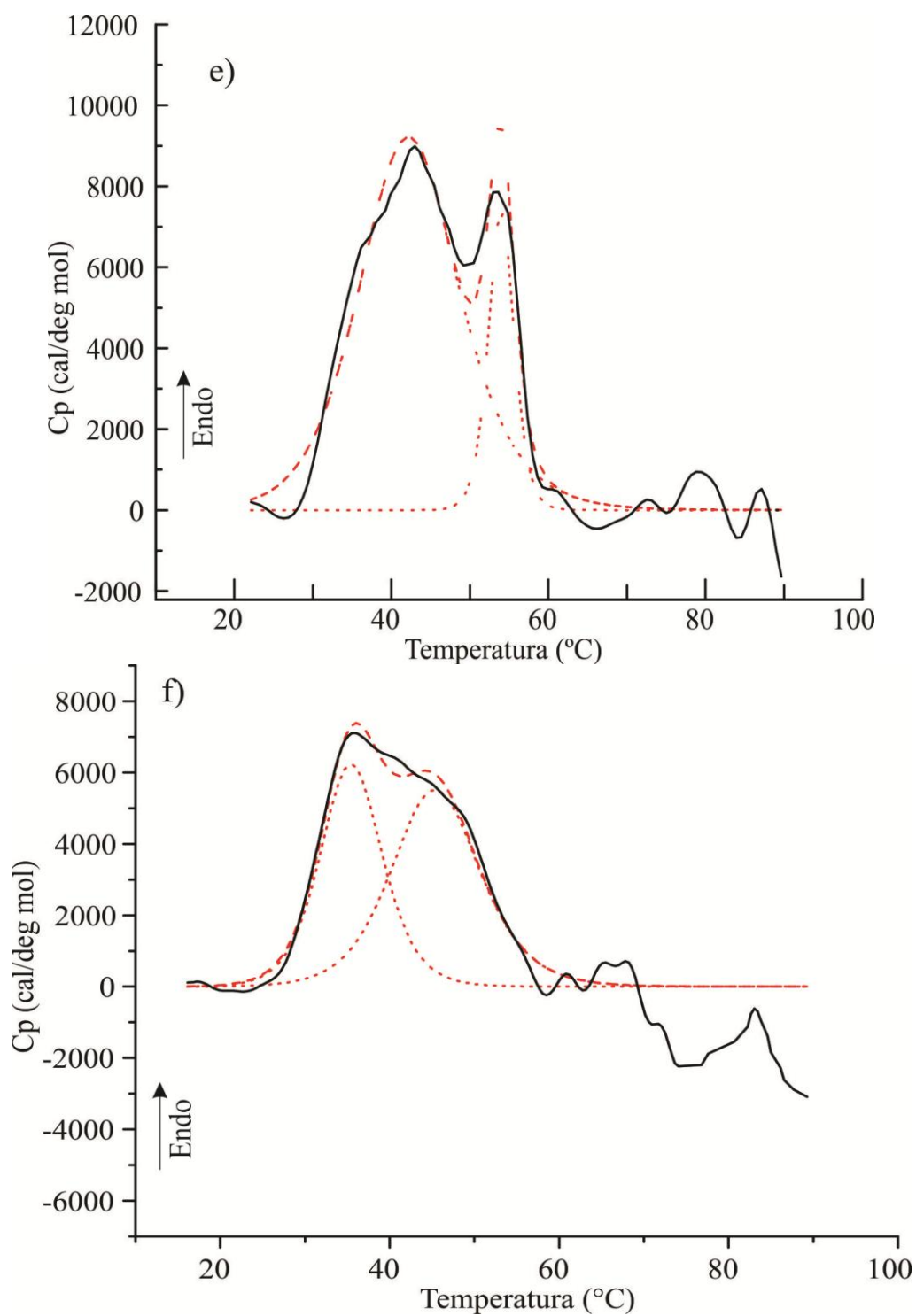




**Slika 55.** DSC krive denaturacije BSA u dejonizovanoj vodi i u prisustvu različitih koncentracija  $\text{ZnCl}_2$  pri  $\text{pH}=6.2$ : a) dejonizovana voda; b)  $0.05 \text{ mM ZnCl}_2$



**Slika 55.** DSC krive denaturacije BSA u dejonizovanoj vodi i u prisustvu različitih koncentracija  $\text{ZnCl}_2$  pri  $\text{pH}=6.2$ : c)  $0.30 \text{ mM ZnCl}_2$ ; d)  $0.45 \text{ mM ZnCl}_2$ .



**Slika 55.** DSC krive denaturacije BSA u dejonizovanoj vodi i u prisustvu različitih koncentracija  $ZnCl_2$  pri pH=6.2: a) dejonizovana voda; b) 0.05 mM  $ZnCl_2$ ; c) 0.30 mM  $ZnCl_2$ ; d) 0.45 mM  $ZnCl_2$ ; e) 1.00 mM  $ZnCl_2$ ; f) 20.00 mM  $ZnCl_2$

Ukupna entalpija denaturacije –kalorimetrijska entalpia ( $\Delta H^{cal}$ ), *van't Hoff* ( $\Delta H^{VH}$ ) entalpija i temperaturni maksimumi prelaza ( $T_m$ ) denaturacije BSA dati su u Tabeli 17. Odnos između  $\Delta H^{cal}/\Delta H^{VH}$  s povećanjem koncentracije cinka do 1mM Zn(II) (Tabela 17) je veći od 1, što ukazuje da mehanizam denaturacije koji nije jednostavni dvostepeni proces (Privalov i Khechinasvili 1974) te da se kooperativnost procesa smanjuje. Može da se pretpostavi da proces denaturacije BSA u prisustvu  $Zn^{+2}$  jona obavlja kroz intermedijarne stepene.

**Tabela 17.** Termodinamički parametri denaturacije BSA: temperature maksimuma prelaza ( $T_m$ ), kalorimetrijska entalpija ( $H^{cal}$ ) i *van't Hoff*-ova entalpija ( $H^{VH}$ )

ZnCl <sub>2</sub> c(mM)	T <sub>m1</sub> (°C)	$\Delta H^{cal1}$ (kJ/mol)	H <sup>VH1</sup> (kJ/mol)	$H^{cal1}/H^{VH1}$	T <sub>m2</sub> (°C)	$\Delta H^{cal2}$ (kJ/mol)	H <sup>VH2</sup> (kJ/mol)	$H^{cal2}/H^{VH2}$	BSA:ZnCl <sub>2</sub> mol ratio
0	52.4	435.63	163.51	2.66	72.8	66.19	359.65	0.18	-
0.05	46.0	<b>802.28</b>	179.95	4.45	55.6	<b>434.29</b>	436.89	0.99	1:1
0.30	36.9	176.60	218.90	0.80	46.4	<b>426.14</b>	278.06	1.53	1:6
0.45	35.4	189.24	262.04	0.72	48.4	<b>847.26</b>	152.13	5.56	1:9
1.00	42.4	<b>655.80</b>	194.38	3.37	54.0	133.46	824.58	0.16	1:20
20.00	35.5	253.84	326.26	0.80	45.5	319.61	243.80	1.31	1:400

Povećavanjem koncentracije  $Zn^{+2}$  jona dolazi do sužavanja termalnih prelaza u užem temperaturnom rasponu, što ukazuje na stabilizirajući uticaj cinkovih jona. Temperaturni maksimumi prelaza nisu se značajno menjali dodatkom cinkovih jona.

Profil DSC krive ukazuje na postojanje dva različita mesta vezivanja  $Zn^{+2}$  na BSA, što je u saglasnosti s literaturom (Stewart et al 2003, Andre i Guillaume 2004).

Konstanta vezivanja ( $K_{bI}$  i  $K_{bII}$ ) cinka za BSA izračunata je na obe temperature maksimuma dobijenih DSC prelaza, koristeći jednačinu (Giancola et al 1997)

$$K_b = \exp(-\Delta H^{cal}/R(1/T - 1/T_m))$$

gde je

$K_b$ - konstanta vezivanja na određenoj temperaturi

$\Delta H^{cal}$ -entalpija denaturacije

$T_m$ - temperaturni maksimum prelaza

R-univerzalna gasna konstanta.

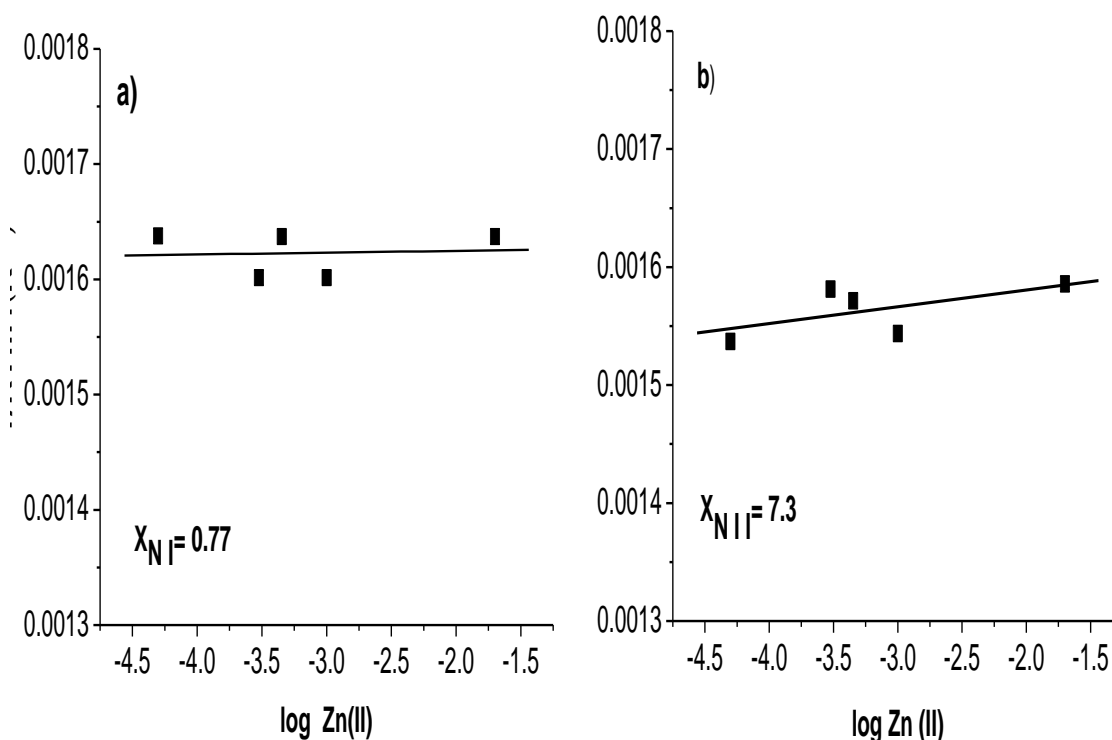
Dobijene konstante vezivanja cinka ( $K_{bI}$ ,  $K_{bII}$ ) na protein BSA ukazuju na postojanje dva različita mesta vezivanja (mesto I i II) što je u saglasnosti s literaturom (Stewart et al 2003,

Andre i Guillaume 2004). Konstante vezivanja ( $K_{bI}$ ) za mesto I i konstante vezivanja ( $K_{bII}$ ) za mesto II prikazane su u Tabeli 18.

**Tabela 18.:** Konstante vezivanja  $Zn^{+2}$  na BSA: ( $K_{bI}$ ) za mesto I na temperaturnom maksimumu  $T_{mI}$  i ( $K_{bII}$ ) za mesto II na temperaturnom maksimumu  $T_{m2}$ .

c(mM)	$T_{mI}(^{\circ}C)$	$K_{bI}$ (M)	$T_{m2}(^{\circ}C)$	$K_{bII}$ (M)
0.05	45.8	$7.0 \times 10^{-9}$	55.5	$4.6 \times 10^{-2}$
0.30	36.7	$2.7 \times 10^{-2}$	46,2	$1.0 \times 10^{-3}$
0.45	35.2	$4.7 \times 10^{-2}$	48.3	$2.0 \times 10^{-10}$
1.00	42.3	$5.4 \times 10^{-7}$	53.9	$5.0 \times 10^{-3}$
20.00	35.4	$3.6 \times 10^{-2}$	45.4	$3.0 \times 10^{-3}$

Srednja vrednost broja liganada  $X_N$ , vezanih za mol nativnog proteina može da se dobije iz DSC rezultata predstavljanjem zavisnosti ( $\log Zn^{+2}$ ) i recipročne temperature maksimuma prelaza ( $1/RT_m$ ) od logaritma koncentracije  $Zn^{+2}$  (Cousins 1985, Rosengarth et al 2001, Rosgen 2001, Roseen i Hinz 2001) Slika 56 a) i b).



**Slika 56:** Zavisnost recipročne temperature maksimuma prelaza ( $1/RT_m$ ) od logaritma ukupne koncentracije  $Zn^{+2}$  ( $\log Zn^{+2}$ ): a) određivanje srednje vrednosti broja liganada  $X_{NI}$  na temperaturnom maksimumu prvog prelaza ( $T_{mI}$ ) b) određivanje srednje

vrednosti broja liganada  $X_{NII}$  na temperaturskom maksimumu drugog prelaza ( $T_{m2}$ ). Puna linija je linearni fit.

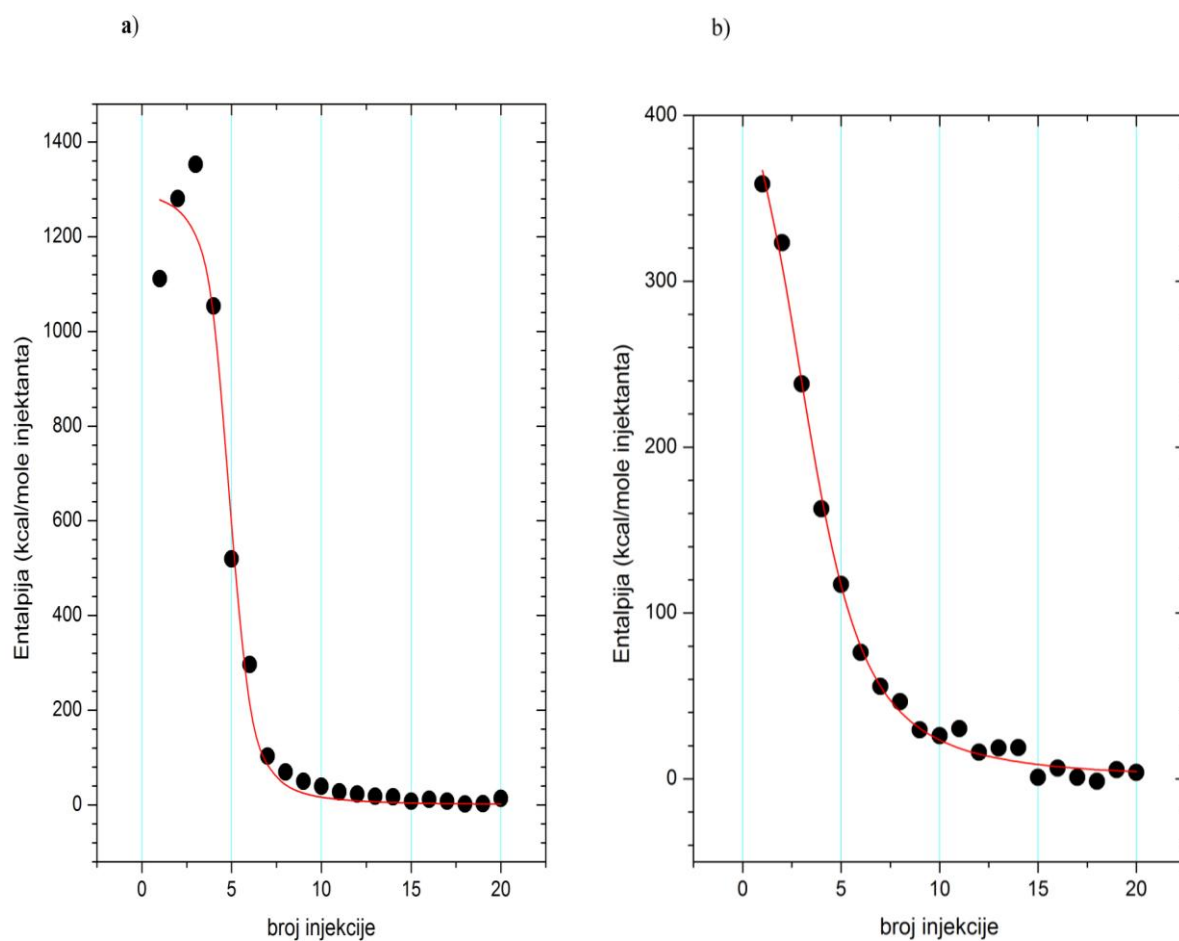
**Srednja vrednost broja liganada  $X_N$ , vezanih za nativni protein nađena u ovom radu za BSA je iznosila blizu 1 za prvo mesto vezivanja ( $X_{NI}=0.77$ ), i 7 za drugo mesto vezivanja ( $X_{NII}=7.3$ ). Može da se zaključi da je srednja vrednost broja liganada  $X_N$ , za prvo mesto vezivanja (I) na temperaturi maksimuma ( $T_{m1}$ ), manja nego za drugo mesto vezivanja II, što je u saglasnosti s rezultatima dobijenim za konstante vezivanja za prvo mesto I ( $K_{bI}$ ) i drugo mesto II ( $K_{bII}$ ) (Tabela 18. ) dobijenim u ovom radu.**

**Na osnovu dobijenih rezultata, po određenom većem broju liganada  $X_N$ , i po određenoj konstanti vezivanja  $K_{bII}$ , može da se zaključi da mesto II ima veći afinitet vezivanja jona cinka.**

Iako postoji dosta literaturnih podataka o interakciji Zn(II)-BSA (*Stewart 2003, Liu et al 2005, Gu et al 2001, Masuoka et al 1993*), ali još uvek nije sa sigurnošću određen afinitet ovih mesta vezivanja, zbog različitih eksperimentalnih uslova (pH, puferi, helirajući agensi, različite varijanse albumina itd). **Po rezultatima dobijenim u ovom radu može da se zaključi da postoji specifična interakcija cinka sa BSA, kao i da postoje specifična mesta vezivanja jona  $Zn^{+2}$  za protein BSA. Ova interakcija dovodi do stabilizacije proteinske strukture, s obzirom na entalpiju denaturacije ( $\Delta H^{cal}$ ) te može da se pretpostavi kosmotropski efekat (*Puolanne 2010*) ovog jona na strukturu proteina. Dobijeni različiti odnosi  $\Delta H^{cal}/\Delta H^{VH}$  stepena kooperativnosti ukazuju na perturbacije, reorganizovanje proteinske strukture vezivanjem jona cinka.**

### 4.13. Interakcija jona sa albuminom goveđeg seruma metodom Izotermale titracione kalorimetrije (ITC)

Interakcija albumina goveđeg seruma BSA s različitim kosmotrofnim i kaotropnim jonima praćena je metodom izotermalne titracione kalorimetrije (ITC). Interakcija BSA s jonima cinka pri temperaturi od 37°C i pri temperaturama od T= 37°C i T=20°C prikazana je na Slici 57. Interakcija BSA s jonima Al<sup>+3</sup> i Na<sup>+</sup> prikazana je na Slici 58. Termodinamički parametri vezivanja jona na protein albumina goveđeg seruma dobijeni iz ITC titracionih krivih prikazani su u Tabeli 19.



**Slika 57:** Titracione krive interakcije BSA sa 20mM ZnCl<sub>2</sub> na temperaturi od T= 37°C (a), i na temperaturi od T= 20°C, (b): integralna kriva sa eksperimentalnim tačkama (●) i (---) kriva dobijena fitovanjem.

**Tabela 19.** Termodinamički parametri vezivanja jona na protein albumina govedeg seruma dobijeni iz ITC titracionih krivih.

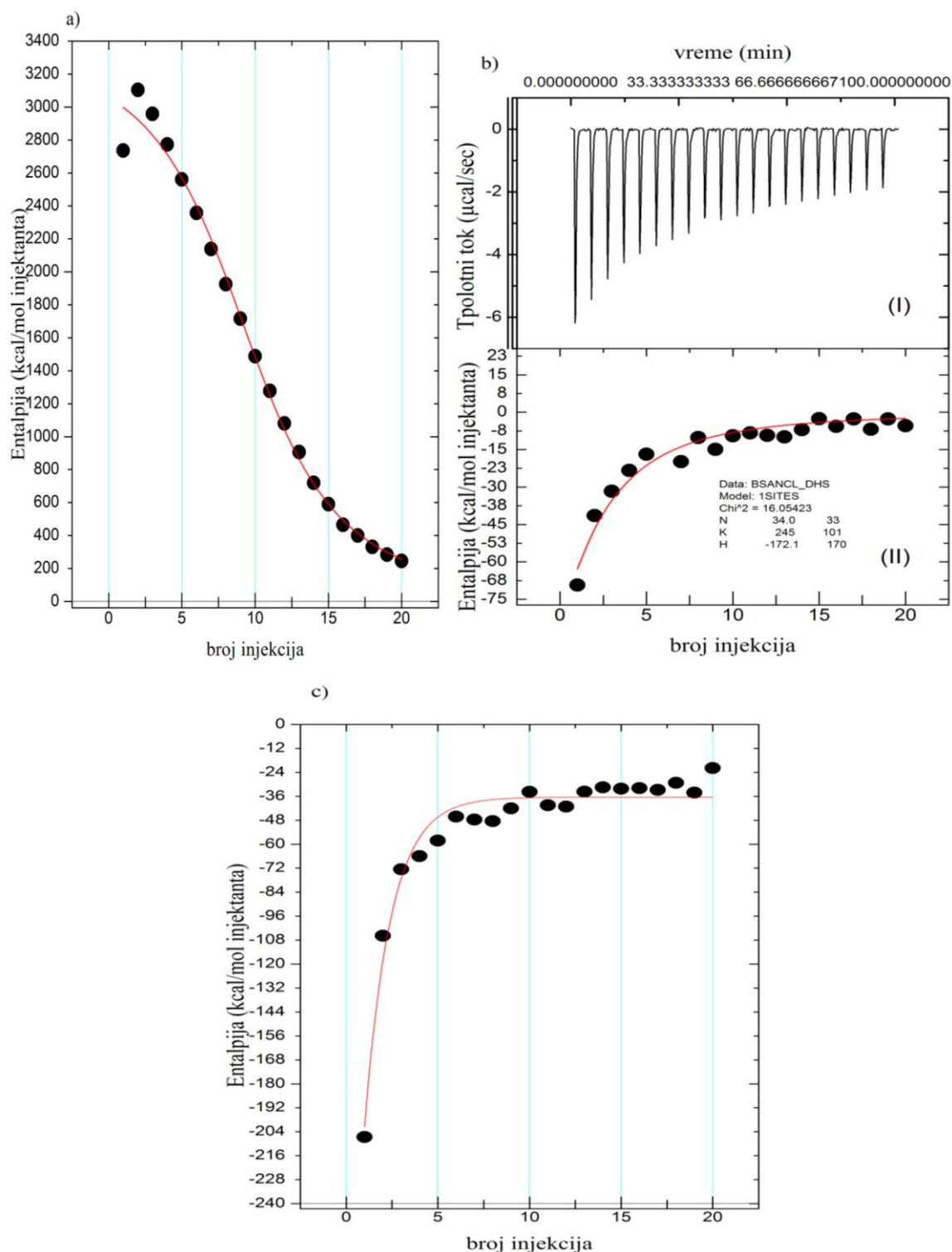
jon	so	temperatura (°C)	broj mesta vezivanja N	konstanta vezivanja $K_b$ (M)	entalpija vezivanja $\Delta H$ (kJ/mol)	Chi2	slobodna energija $\Delta G$ (kJ/mol)	entropija $\Delta S$ (kJ/mol)
$K^+$	KCl	37	28	$3.79 \times 10^2$	-889	15.2	-992.1	332
$Na^+$	NaCl	37	34	$2.45 \times 10^2$	-720	16.05	-645.6	-241
$Al^{3+}$	$AlCl_3$	37	257	$7.03 \times 10^2$	9501.0	7484.2	-407.3	31961
$Ni^{2+}$	$NiSO_4$	37	78	$1.53 \times 10^2$	-841.3	36.6	1828.7	3183
$Pb^{2+}$	$Pb(NO_3)_2$	37	49	$0.92 \times 10^2$	-3081.5	172.01	1165	9901
$Cd^{2+}$	$CdSO_4$	37	8	$36.23 \times 10^2$	21849	11546	9358824	-30119
$Zn^{2+}$	$ZnCl_2$	20	5.5	$1.494 \times 10^2$	20.59	30.8	-396.9	1283
$Zn^{2+}$	$ZnCl_2$	37	7.3	$1.675 \times 10^2$	54.59	40.1	-443.6	1254
$Cu^{2+}$	$Cu SO_4$	37	47	$57.13 \times 10^2$	54097	1178	12924	126938

Iz dobijenih rezultata može da se vidi da se interakcija različitih jona sa BSA ogleda u različitim vrednostima konstanti vezivanja, entalpije vezivanja i u broju mesta vezivanja. To ukazuje na specifičnost ili nespecifičnost vezivanja jona za protein, kao i na postojanje specifičnih mesta vezivanja. Tako vrednosti dobijene za  $Cu^{+2}$  i  $Zn^{+2}$ , za koje je poznato postojanje karakterističnih, specifičnih mesta vezivanja na protein, ali na albumin ljudskog seruma (HSA) i albumin psećeg seruma (DSA) (Masuoka et al 1994), kao i za  $Cd^{+2}$  (Shcharbin et al 2007) dobijene u ovom radu ukazuju na visoku specifičnost, s obzirom na dobijene vrednosti konstante vezivanja (K), entalpije vezivanja ( $\Delta H$ ) i broja mesta vezivanja (N) što je u saglasnosti sa literaturom. Elektrostatske interakcije se odigravaju između jona i polarnih grupa proteina i egzotermnog su karaktera (-) (Wang et al 2011). Termodinamičke vrednosti dobijene za interakciju  $Zn^{2+}$  jona metodom ITC u potpunosti su u saglasnosti s dobijenim vrednostima interakcije određenim DSC metodom u ovom radu. Tako su broj mesta vezivanja, za prvo i drugo mesto vezivanja (5 i 7, Tabela 19) kao i konstante vezivanja dobijene različitim metodama, veoma bliske vrednosti s visokim stepenom podudaranja. Određeni termodinamički parametri interakcije ostalih jona sa BSA ukazuju na malu specifičnost vezivanja, te da su ove interakcije nespecifičnog karaktera. Može da se pretpostavi da je njihov uticaj na protein kosmotropski ili kaotropki kao što je definisano Hofmeister –ovim nizom (Puolanne 2010).

U literaturi postoji veliki broj podataka koje se odnose na određivanje termodinamičkih parametara interakcije različitih jona sa albuminom govedeg seruma (Hei Carter 1992, Liu et al 2005, Shcharbin et al 2007, Masuoka et al 1994) međutim direktno upoređivanje s



rezultatima dobijenim u ovom radu nije moguće zbog velike raznolikosti uslova pri kojima su interakcije praćene, kao što su uslovi pH, pufera, temperatura, vrste i porekla proteina.



**Slika 58.** ITC titracione krive interakcije BSA s jonima: a)  $\text{Al}^{+3}$  integralna kriva sa eksperimentalnim tačkama (●) i kriva dobijena fitovanjem (---); b)  $\text{Na}^{+}$  (I) sirovi podaci, (II) integralna kriva sa eksperimentalnim tačkama (●) i kriva dobijena fitovanjem (---) i c)  $\text{Ca}^{+2}$  integralna kriva sa eksperimentalnim tačkama (●) i kriva dobijena fitovanjem (---)

## 5. ZAKLJUČAK

Osmotskom dehidracijom svinjskog mesa *Longissimus dorsi* dobijen je proizvod sa smanjenom količinom vlage. Karakteristike novonastale proteinske osnove definisane su metodama termalne analize i upoređene s termalnim odlikama svežeg mesa.

Iz rezultata dobijenih u ovom radu jasno može da se zaključi da osmotskom dehidracijom mesa u melasi šećerne repe dolazi do očekivanog gubitka vode ali i do promene u jačini interakcija preostale slobodne vode s proteinskom osnovom i smanjenja količine vezane vode u proteinskoj osnovi u poređenju s vodom svežeg mesa.

Vezana voda kod osmotski dehidratiranog svinjskog mesa je smanjena za oko 4% u poređenju sa svežim mesom. Slobodna voda kod osmotski dehidratiranog mesa uopšteno ima energetski jaču interakciju za čvrsti proteinski matriks nego kod svežeg mesa. Pri tome je očigledno postojanje dva energetski različita stepena interakcije ili veze vode u osmotski dehidratiranom svinjskom mesu.

Može da se pretpostavi da ova dva energetski različita stepena jačine vezivanja vode odgovaraju vodi koju održavaju kapilarne sile zarobljenoj tzv. imobiliziranoj, nepokretnoj vodi.

S obzirom na to da se oko 85% vode mišićnog tkiva nalazi unutar guste miofibrilarne mreže (intermiofibrilarno), a 15% se nalazi izvan ove mreže (ekstrafibrilarno), iz dobijenih rezultata može da se zaključi da osmotskom dehidracijom dolazi do izuzetno velikih promena u mehaničkoj strukturi mesa. O veličini ovih promena najslikovitije govori promena količine vezane vode koju odlikuje nepokretljivost, upravo zbog čvrstine veze čak i pri upotrebi jakih mehaničkih ili fizičkih sila, kao što su zamrzavanje ili grejanje. Osmotskom dehidracijom dolazi do promene i pregrupisanja preostale vode u dva oblika što ukazuje na mehaničko strukturne promene u interfibrilarnoj mreži i na pojednostavljivanje strukture proteinske osnove. Strukturne promene u interfibrilarnoj mreži i pojednostavljivanje strukture proteinske osnove ogledaju se u obrazovanju tri strukturna nivoa osmotski dehidratiranog mesa, koje se odnose na :

1. strukturni nivo vode vezane na protein tj. postojanje proteinske strukture i posle osmotske dehidracije (strukturni nivo I);

2. strukturni nivo mreže sa ujednačeno manjim porama tj. nivo energetski jače vezane imobilizirane, nepokretne vode (strukturni nivo II);
3. strukturni nivo mreže sa ujednačeno većim porama tj. nivo energetski slabije vezane imobilizirane vode (strukturni nivo III).

Ispitivanjem termalnih osobina uzoraka osmotski dehidratiranog mesa sa smanjenom vlagom (ispod 20%) nađeno je postojanje staklastog prelaza, pošto je najveći deo vode vezan za čvrstu proteinsku osnovu. U ovom radu su prvi put nađene i određene temperature staklastog prelaza za za sušeno svinjsko meso sa vlagom nižom od 20%.

Praćenjem termalnih promena u osmotski dehidratiranom svinjskom mesu u periodu od 60 dana pokazano je da rezultati o stabilnosti osmotski dehidratiranog mesa dobijeni u ovom radu ukazuju na stabilnost proizvoda u ispitivanom vremenskom periodu. Pokazano je da termalna stabilnost može da bude značajan pokazatelj i ostalih činilaca stabilnosti proizvoda, kao što su mikrobiološka stabilnost, aktivnost vode, pH stabilnost, i oksidativna stabilnost. Pošto promene izazvane delovanjem mikroorganizama, oksidativne promene kao i promene u aktivnosti vode, neminovno izazivaju promene u strukturi matriksa hrane koje se ogledaju u promenama termalnih osobina hrane, metode termalne analize mogu da se koriste za brzo ispitivanje proizvoda poznatih termalnih odlika.

Termalne osobine osmotski dehidratiranog mesa praćene su pri rehidraciji, te je nađeno da su najpovoljniji uslovi rehidracije s obzirom na postignuti procenat rehidracije (R 99%) čuvanja i održavanja homogenosti strukture proteinske osnove rehidracija na 40°C u vremenu od 60min. Ovako visoki procenat rehidracije pokazatelj je uspešnosti sušenja s obzirom na sačuvanost same strukture proteinske osnove.

Pokazano je postojanje nativnih struktura proteina osmotski osušenog mesa u početnom stadijumu rehidracije. Tako osmotskom dehidracijom dolazi do konformacionih promena, do delimične denaturacije proteina mesa, što je vidljivo iz dobijenih entalpija ( $\Delta H$ ) denaturacije pojedinih proteina mesa koje se smanjuju u procesu dehidracije. Temperature maksimuma denaturacije za pojedini proteinski

prelaz su nešto veće kod osmotski dehidratiranog mesa u poređenju sa svežim mesom i uglavnom ostaju bliskih vrednosti tokom rehidracije.

U procesu rehidracije dolazi do daljeg smanjenja entalpija denaturacije ( $\Delta H$ ) pojedinih proteina i do zadržavanja malog procenta nedenaturisanih ili veoma malo konformaciono promenjenih proteina. Njihove strukture su zadržane pri rehidraciji na temperaturi od 20°C i u vremenu od 15 min i 45 min, 30°C i u vremenu od 15 min i 40°C i u vremenu od 15 min. Pri daljoj rehidraciji prisustvo ovakvih struktura nije nađeno. Pri rehidraciji vidljiv je nestanak proteinskih prelaza u temperaturskom opsegu od 60°C do 70°C. Interakcija s komponentama melase (ugljeni hidrati i soli) i proteina je očigledna, pa se smanjenje entalpije dobijene za osmotski dehidratirano meso može da protumači navedenim interakcijama komponenti melase (soli, ugljeni hidrati) s proteinima koje dovode do konformacionih promena, a one dovode do, u ovom radu nađenih, termalnih odlika nagrađene proteinske osnove.

Određeni su kinetički parametri denaturacije proteina svežeg i osmotski dehidratiranog svinjskog mesa. Vrednosti energija aktivacije ( $E_a$ ) dobijene za proteine osmotski osušenog mesa su nešto veće od vrednosti  $E_a$  dobijenih za sveže meso. To je u saglasnosti s rezultatima koji se odnose na povećane temperaturske maksimume denaturacije proteina osmotski osušenog mesa, nađene u ovom radu, te može da se pretpostavi da je nastala proteinska osnova termalno i kinetički stabilnija. Kinetika denaturacije proteina u novostvorenoj proteinskoj osnovi osmotski osušenog svinjskog mesa u melasi ukazuje na trajnost proizvoda.

Metodom modulovane diferencijalne kalorimetrije (MDSC) pokazano je da u uzorku dehidriranog svinjskog mesa postoji deo proteina koji daju prelaze proteinske denaturacije, dok je deo proteina nagrađio proteinsku osnovu osmotskom dehidracijom i daje prelaze karakteristične za umrežene makromolekule i gelove.

Analiza sastava makroelemenata  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  osmotski dehidratiranog svinjskog mesa melasom šećerne repe pokazala je da dolazi do značajnog porasta sadržaja makroelemenata u osmotski osušenom svinjskom mesu. Ovaj porast je posledica interakcije s proteinima mesa. Složenost ovih procesa prikazana je na model sistemu interakcije jona sa proteinom albuminom govedeg seruma (BSA).

Pručena je interakcija BSA s jonima cinka, te su određene konstante vezivanja cinka za protein, kao i broj mesta vezivanja metodama diferencijalne skenirajuće mikrokalorimetrije i metodom izotermalne titracione kalorimetrija (ITC). Iz rezultata dobijenih u ovom radu može da se zaključi da postoji specifična interakcija cinka sa BSA, kao i da postoje posebna specifična mesta vezivanja jona  $Zn^{+2}$  za protein BSA. Ova interakcija dovodi do stabilizacije proteinske strukture, s obzirom na entalpiju denaturacije ( $\Delta H^{cal}$ ) te može da se pretpostavi kozmotropski efekat ovog jona na strukturu proteina. Dobijeni različiti odnosi  $\Delta H^{cal}/\Delta H^{VH}$  stepena kooperativnosti ukazuju na reorganizaciju proteinske strukture vezivanjem jona cinka.

Nađena su dva specifična mesta vezivanja cinka za protein s različitim afinitetima vezivanja i uticaj stabilizacije proteinske strukture interakcijom sa jonima, kao što je i nađena odlika nagrađene proteinske osnove osmotski dehidratiranog svinjskog mesa.

Metodom izotermalne titracione kalorimetrija (ITC) pokazano je postojanje interakcija različitih jona ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) s proteinom albuminom (BSA), te su određeni kinetički i termodinamički parametri vezivanja: konstante vezivanja (K), entalpije vezivanja ( $\Delta H$ ) i broja mesta vezivanja (N), slobodna energija ( $\Delta G$ ) i entropija ( $\Delta S$ ).

## 6. LITERATURA

1. Alberty R. A., Marvin H. H. (1951): Study of Protein-Ion Interaction by the Moving Boundary Method. The Combination of Bovine Serum Albumin with Chloride Ion. *J. Biol Chem.*, **73** 3220-322.
2. Amako D. E. N., Youling L. X. (2001): Effects of carnagen on thermal stability of proteins from chichen thigh and breast muscles. *Food research International* **34** 247-253
3. Andre C., Guillaume Y.C. (2004): Zinc–human serum albumin association: testimony of two binding sites, *Talanta* **63** 503-508.
4. Akkose A., Aktas N. (2008): Determination of glass transition temperature of beef and effects of various cryoprotective agents on some chemical changes. *Meat Science* **80** 875–878.
5. Aktas N. , Kaya M. (2001): Influence of weak organic acids and salts on the denaturation characteristics of intramuscular connective tissue. A differential scanning calorimetry study. *Meat Science* **58** 413–419.
6. Akta N. (2003): The effects of pH, NaCl and CaCl<sub>2</sub> on thermal denaturation characteristics of intramuscular connective tissue. *Thermochimica Acta* **407** 105–112.
7. Babić J., Cantalejo M J., Arroqui C. (2009): The effects of freeze-drying process parameters on Broiler chicken breast meat. *LWT - Food Science and Technology* **42** 1325–1334.
8. Baldwin R. L. (1996): How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal* **71** 2056–2063.
9. Baldwin R. L. (2002): Making a network of hydrophobic clusters. *Science* **295** 1657.
10. Bilbao-Sáinz, C., Andrés, A., Fito, P., (2005): Hydration kinetics of dried apple as affected by drying conditions. *Journal of Food Engineering* **68** 3 369–376.
11. Bchir B., Besbes S., Attia H., Blecker C. (2009): Osmotic dehydration of pomegranate seeds: mass transfer kinetics and differential scanning calorimetry characterization. *International Journal of Food Science and Technology* **44** 2208–2217.
12. Bell L. N. (1996): Kinetics of non-enzymatic browning in amorphous solid systems: distinguishing the effects of water activity and the glass transition. *Food Res. Int.*, **28** 591-597.
13. Bellof G., Most E. Pallauf J. (2006): Concentration of Ca, P, Mg, Na and K in muscle, fat and bone tissue of lambs of the breed German Merino Landsheep in the

course of the growing period. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **90** 385–393.

14. Brandts J.F. (1964): The Thermodynamics of Protein Denaturation. I. The Denaturation of Chymotrypsinogen. *J. Am. Chem. Soc.* **86** 20 4291–4301.
15. Brandts J.F. (1964): The Thermodynamics of Protein Denaturation. II. A Model of Reversible Denaturation. and Interpretations Regarding the Stability of Chymotrypsinogen. *J. Am. Chem. Soc.* **86** 20 4302–4314.
16. Brandts, J.F. I Lin, L.N. (1990): Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochemistry* **29** 6927-6940.
17. Bertram H.C., Purslow P.P, Andersen H. J. (2002): Relationship between Meat Structure, Water Mobility, and Distribution: A Low-Field Nuclear Magnetic Resonance Study. *J. Agric. Food Chem.* **50** 824-829.
18. Bertram H.C., Wu Z., van den Berg F., Andersen H.J. (2006): NMR relaxometry and differential scanning calorimetry during meat cooking, *Meat Science* **74** 4 684–689.
19. Bertram H.C., Kohler A. , Bo-Cker U., Ofstad R., Andersen H. J. (2006) Heat-Induced Changes in Myofibrillar Protein Structures and Myowater of Two Pork Qualities. A Combined FT-IR Spectroscopy and Low-Field NMR Relaxometry Study, *J. Agric. Food Chem.* **54** 1740-1746.
20. Bischof J. C., He X.-M. (2005): Thermal Stability of Proteins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1066**, 12-33.
21. Bozec L. Odlyha M. (2011) Thermal Denaturation Studies of Collagen by Microthermal Analysis and Atomic Force Microscopy. *Biophys J.* **101** 1 228–236.
22. Boyer C., Joandel S., Ouali A., Culioli J. (1996): Determination of Surface Hydrophobicity of Fast and Slow Myosins from Rabbit Skeletal Muscles: Implication in Heat-Induced Gelation *Journal of the Science of Food and Agriculture* **72** 3367–375.
23. Brodsky B., Persikov A. V. (2005): Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv. Protein Chem.* **70** 301–339.
24. Castro-Giráldez M., Fito P.J., Fito P. (2010): Non-equilibrium thermodynamic approach to analyze the pork meat (*Longissimus dorsi*) salting process. *Journal of Food Engineering* **99** 24–30.
25. Cantor, C. R. and Schimmel, P.R. *Biophysical Chemistry: Part II Techniques for the study of Biological Structure and Function*, W H Freeman and Co, Oxford. 1980.
26. Chen H-H., Xu S-Y., Wang Z. (2007): Interaction between flaxseed gum and meat protein *Journal of Food Engineering* **80** 1051–1059.
27. Chen T., Oakley D.M. (1995): Thermal analysis of proteins of pharmaceutical interest *Thermochimica Acta* **248** 229-244.

28. Chen F. L., Wei Y. M., Zhang B. (2010): Characterization of water state and distribution in textured soybean protein using DSC and NMR. *Journal of Food Engineering* **100** 522–526.
29. Cheng X-f., Zhang M. , Adhikari B., Islam Md. N. (2014): Effect of Power Ultrasound and Pulsed Vacuum Treatments on the Dehydration Kinetics, Distribution, and Status of Water in Osmotically Dehydrated Strawberry: a Combined NMR and DSC Study. *Food Bioprocess Technol* **7** 2782–2792.
30. Collares, F. P., Finzer, J. R. D., Kieckbusch, T. G. (2004). Glass transition control of the detachment of food pastes dried over glassplates. *Journal of Food Engineering*, **61** 261–267.
31. Collignan A, Raoult-Wack AL (1994): Dewatering and salting of cod by immersion in concentrated salt and sugar solutions. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie* **27** 259-264.
32. Collignan A., Bohuon P., Deumier F., Poligne I. (2001): Osmotic treatment of fish and meat products. *J. Food Eng.* **49** 153-162.
33. Collins, K. D., Neilson, G. W., Enderby, J. E. (2007): Ions in water: Characterizing the forces that control chemical processes and biological structure. *Biophysical Chemistry* **128** 95–104.
34. Curtin L.V. (1983): *Molasses in Animal Nutrition, Molasses - General Considerations*, National Feed Ingredients Association West Des Moines, Iowa.
35. Cordella C., Moussa I., Martel A.C., Sbirrazzuoli N., Lizzani-Cuvelier L. (2002): Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives. *J. Agric. Food Chem.* **50** 1751-1764.
36. Corzo O., Bracho N. (2005): Osmotic dehydration kinetics of sardine sheets Zugarramurdi and Lupin model. *Journal of Food Engineering* **66** 1 51-56.
37. Cousins R.J. (1985): Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* **65** 238-309.
38. Coulatate T.P. (2002) *FOOD The Chemistry of its components*, RSC, The Royal Society of Chemistry, Fourth Edition, pp 126 Proteins, pp 389 Water.
39. Ding Y., Liua R., Rong J., Xiong S. (2014): Heat-induced denaturation and aggregation of actomyosin and myosin from yellow cheek carp during setting *Food Chemistry* **149** 237–243.
40. Deumier F., Bohuon, P., (2005): Densities, viscosities and water activities of ternary NaCl–glucose syrup–water systems from 283.1 to 298.1 K *Journal of Food Engineering* **68** 377–383



41. Djelveh G., Gros J.-B., Emam-Djomeh Z. (2001): Osmotic Dehydration of Food in a Multicomponent Solution Part II. Water Loss and Solute Uptake in Agar Gels and Meat *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **34** 319-323.
42. Della Gatta G., Richardson M. J., Sarge S.M., Stølen S. (2006): Standards, calibration, and guidelines in microcalorimetry. Part 2. Calibration standards for differential scanning calorimetry (IUPAC Technical Report) *Pure Appl. Chem.* **78** 7 1455–1476.
43. Delgado A. E., Sun D-W. (2002): Desorption isotherms and glass transition temperature for chicken meat *Journal of Food Engineering* **55** 1–8.
44. Deydier E., Guilet R., Sarda S., Sharrock P. (2005): Physical and chemical characterisation of crude meat and bone meal combustion residue: “waste or raw material?” *Journal of Hazardous Materials B.* **121** 141–148.
45. Dziomdziora M., Krala L. (2006): Cryoprotection of pork. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **15/56** 1 23–27.
46. Der, A., Kelemen, L., Fábíán, L., Taneva, S. G., Fodor, E., Páli, T.(2007): Interfacial water structure controls protein conformation. *Journal of Physical Chemistry B* **111** 5344–5350.
47. Ensor S. A., Sofos, J. N., Schmidt, G. R. (1991): Differential scanning calorimetric studies of meat protein-alginate mixtures. *Journal of Food Science*, **56** 1 175–182.
48. Fan F., Roos Y. H. (2016): Structural relaxations of amorphous lactose and lactose-whey protein mixtures. *Journal of Food Engineering* **173** 106-115.
49. Filipović V. : Uticaj procesa osmotske dehidracije na prenos mase i kvalitet mesa svinja, Doktorska disertacija , Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet prehrambeno-biotehnološke nauke , Novi Sad 2013.
50. Fennema O. R. (1985): Water and ice. In O. R. Fennema (Ed.), *Food chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc.
51. Fennema O. R. (1990): Comparative water holding properties of various muscle foods. Review relating to definitions, methods of measurement, governing factors, comparative data and mechanistic matters. *Journal of Muscle Foods* **1** 363–381.
52. Fernandez-Martin F., Lopez-Lopez I., Cofrades S., & Jiménez-Colmenero, F. (2009): Influence of adding Sea Spaghetti seaweed and replacing the animal fat with olive oil or a konjac gel on pork meat batter gelation. Potential protein/alginate association. *Meat Science*, **83**, 209-217.
53. Fernandez-Martín F., Fernández P. , Carballo J., Jiménez-Colmenero F. (2000) DSC study on the influence of meat source, salt and fat levels, and processing parameters on batters pressurisation *European Food Research and Technology* **211** 387-392.

54. Findlay C.J., Stanley D.W. (1984): Differential Scanning Calorimetry of Beef Muscle: Influence of Sarcoma Length. *Journal of Food Science* **49** 1529-1534.
55. Graiver N., Pinotti A., Califano A. N., Zaritzky N. (2006): Diffusion of sodium chloride in pork tissue. *Journal of Food Engineering* **77** 910-918.
56. Gill P. S., Sauerbrunn S. R., Reading M. (1993): Modulated differential scanning calorimetry. *J. Therm. Anal.* **40** 931-939.
57. Giancola C., De Sena C., Fessas D., Graziano G., Barone, G. (1997): DSC studies on bovine serum albumin denaturation effects of ionic strength and SDS concentration. *Int. J. Biol. Macromol.* **20** 193-204.
58. Guo M., Zou H., Wang H., Kong L., Ni J. (2001): Binding of metal ions with protein studied by a combined technique of microdialysis with liquid chromatography. *Anal.Chim.Acta* **443** 91-99.
59. Goni O., Munoz M., Ruiz-Cabello J., Escribano M., Merodio C. (2007): Changes in water status of cherimoya fruit during ripening. *Postharvest Biology and Technology* **45** 147–150.
60. Graziano G. (2004): Water: cavity size distribution and hydrogen bonds. *Chemical Physics Letters* **396**, 226–231.
61. Guizani N., Rahman M. S., Klibi M., Al-Rawahi A. Bornaz S. (2013): Thermal characteristics of *Agaricus bisporus* mushroom: freezing point, glass transition, and maximal-freeze-concentration condition *International Food Research Journal* **20** 4 1945-1952.
62. Hansen E., Andersen M. L., Skibsted L. H. (2003): Mobility of solutes in frozen pork studied by electron spin resonance spectroscopy: evidence for two phase transition temperatures *Meat Science* **63** 63–67.
63. Haque MD. Karmul., Roos Y.H. (2005): Crystallization and X-ray Diffraction of Crystals Formed in Water-Plasticized Amorphous Spray-dried and Freeze-dried Lactose/Protein Mixtures *Journal of Food Science*, **70** 5 359-366.
64. He X.M., Carter C.D., (1992): Atomic structure and chemistry of human serum albumin, *Nature* **358** 209-215.
65. Hermansson, A. M., Langton, M. (1988): Filamentous structures of bovine myosin in diluted suspensions and gels. *Journal of Science Food and Agriculture* **42** 355–369.
66. Hermansson, A. M. (1986): Water- and fat-holding. In D. A. Ledward, & J. R. Mitchell (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp. 273–314). London: Elsevier.
67. Honikel, K. O. (2004): Conversion of muscle to meat. In W. K. Jensen, C. E. Devine, & M. Dikeman (Eds.), *Encyclopedia of meat sciences.*, Elsevier Academic Press.

68. Huff-Lonergan E., Lonergan S. M. (2005): Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes, Review, *Meat Science* **71** 194–204.
69. Hughes J.M., Oiseth S.K., Purslow P.P., Warner R.D (2014): A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness *Meat Science* **98** 520–532.
70. Hui Y.H. *Food Drying Science and Technology: Microbiology, Chemistry Applications*, DEStech Publications, Inc. 2007. Chapter 18, pp 437.
71. Inoue C, Ishikawa M. (1997): Glass Transition of Tuna Flesh at Low Temperature and Effects of Salt and Moisture. *Journal of Food Science* **62** 3 496-499.
72. Ishiwatari N., Fukuoka M., Hamada N., Sakai N. (2011): Heat transfer analysis-based prediction of protein denaturation and umami component of meat during cooking. In *Proceedings of the Eleventh International Congress on Engineering and Food*, Athen, Greece.
73. Ishiwatari N., Fukuoka M., Sakai N. (2013): Effect of protein denaturation degree on texture and water state of cooked meat. *Journal of Food Engineering* **117** 361–369.
74. Ishioroshi M., Samejima K., Yasui, T. (1979): Heat induced gelation of myosin: Factors of pH and salt concentration. *Journal of Food Science* **44** 1280–1284.
75. Israelachvili J., Wennerström H. (1996): Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. *Nature* **379** 219–225.
76. Istrate D., Popescu C., Moller M. (2009): Non-Isothermal Kinetics of Hard a-Keratin Thermal Denaturation *Macromol. Biosci.* **9** 805–812.
77. Jahnert S., Vaca Chavez F., Schaumann G. E., Schreiber A., Schonhoff M. Findenegg G. H. (2008): Melting and Freezing of water in cylindrical silica nanopores. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10** 6039–6051.
78. Jiménez-Colmenero, F. Cofrades S., Herrero A.M., Fernández-Martín F., Rodríguez-Salas L., Ruiz-Capillas C. (2012): Konjac gel fat analogue for use in meat products: Comparison with pork fats. *Food Hydrocolloids* **26** 63-72.
79. Jimenez-Colmenero F., Cofrades S., Carballo J., Fernandez P., Fernandez-Martín F. (1998): Heating of Chicken and Pork Meat Batters under Pressure Conditions: Protein Interactions. *J. Agric. Food Chem.* **46** 4706-4711.
80. Kasapis S. (2012): Relation between the structure of matrices and their mechanical relaxation mechanisms during the glass transition of biomaterials: A review, *Food Hydrocolloids* **26** 464-472.
81. Kajitani S., Fukuoka M., Sakai N. (2011): Kinetics of Thermal Denaturation of Protein in Cured Pork Meat. *Japan Journal of Food Engineering* **12** 1 19 – 26.

82. Kalichevsky M. T., Jaroszkiewicz E. M., Ablett S., Blanshard J. M. V. Lillford P. J. (1992): The glass transition of amylopectin measured by DSC, DMTA and NMR, *Carbohydr. Polym.*, **18** 77-88.
83. Kazemi S. Ngadi M.O. (2011): Claude Gariépy Protein Denaturation in Pork Longissimus Muscle of Different Quality Groups, *Food Bioprocess Technol* **4** 102–106.
84. Kawakami H., Morita J., Takahashi K. , Yasui T. (1971): Thermal Denaturation of Myosin, Heavy Meromyosin and Subfragment 1, *J Biochem* **70** 4 635-648.
85. Kemp R.B. (1993): An historical review of developments in cellular microcalorimetry, *Pure &App. Chem.* **65** 9 1875-1880.
86. Kijowski, J. M., I Mast M. G. E. (1988): Effect of sodium chloride and phosphates on the thermal properties of chicken meat proteins. *Journal of Food Science*, **53** 2 367–370.
87. Karlson P. (199): *Biokemija, Školska knjiga Zgreb , VIII izdanje*
88. Krokida, M. K. Marinos-Kouris, D. (2003): Rehydration kinetics of dehydrated products. *Journal of Food Engineering* **57** 1–7.
89. Kouassi K, Roos HY (2001): Glass transition and water effects on sucrose inversion in noncrystalline carbohydrate food systems. *Food Res. Int.* **34** 895- 901.
90. Kovačević D., Mastanjević K. (2011): Cryoprotective Effect of Trehalose and Maltose on Washed and Frozen Stored Beef Meat, *Czech J. Food Sci.* **29** 1 15–23.
91. Kumagai H., Nakamura K. Fujiwhara J. (1985): DSC Measurement of Frozen Water in Liquid Foods, *Agric. Biol. Chem.*, **49** 11 3097-3101.
92. Kurozawa L.E., Park K.J., Dupas Hubinger M. (2009): Effect of maltodextrin and gum arabic on water sorption and glass transition temperature of spray dried chicken meat hydrolysate protein. *Journal of Food Engineering* **91** 287–296.
93. Laakkonen, E., Laaksonen T. J., Kuuva T., Jouppila K. Roos Y. H. (2002): Effects of Arabinoxylans on Thermal Behavior of Frozen Wheat Doughs as Measured by DSC, DMA, and DEA. *J. Food Sci.* **67** 223-230.
94. Laakkonen, E., Sherbon, J. W. i Wellington, G. H. (1970): Low temperature, long-time heating of bovine muscle. *Journal of FoodScience* **35** 175–181.
95. Lee A. L. i Wand A. J. (2001): Microscopic origins of entropy, heat capacity and the glass transition in proteins. *Nature* **411** 501-504.
96. Lewicki P.P. (1998): Effect of pre-drying treatment, drying and rehydration on plant tissue properties: A review. *International Journal of Food Properties* **1** 1 1–22.

97. Li S., Dickinson L. C., Chinachoti P. (1998): Mobility of “unfreezable” and “freezable” water in waxy corn starch by <sup>2</sup>H and <sup>1</sup>H NMR. *J. Agric. Food Chem.* **46** 62–71.
98. Liu, XF., Xia Y-M., Fang Y. (2005): Effect of metal ions on the interaction between bovine serum albumin and berberine chloride extracted from a traditional Chinese Herb *Coptis chinensis franch.* *Journal of Inorganic Biochemistry* **99** 1449–1457.
99. Li R., Kerr W.L., Toledo R.T. Teng Q. (2001): <sup>31</sup>P NMR analysis of chicken breast meat vacuum tumbled with NaCl and various phosphates, *J. Sci food Agric.* **81** 576-582.
100. Liu M. N., Foegeding A. E., Wang S-F., Smith D. M., Davidian M. (1996): Denaturation and Aggregation of Chicken Myosin Isoforms, *J. Agric. Food Chem.* **44** 1435-1440.
101. Liu J., Puolanne E., Ertbjerg P. (2014): Temperature induced denaturation of myosin: Evidence of structural alterations of myosin subfragment-1 *Meat Science* **98** 2 124–128.
102. de Lima A.G.B., Queiroz M.R., Nebra S.A. (2002): Simultaneous moisture transport and shrinkage during drying of solids with ellipsoidal configuration, *Chemical Engineering Journal* **86** 85–93.
103. Lončar B. (2015): “Hemometrijski pristup analizi osmotske dehidracije srebrnog karaša (*Carassius gibelio*)“ DOKTORSKA DISERTACIJA, UNIVERZITET U NOVOM SADU TEHNOLOŠKI FAKULTET, PREHRAMBENO BIOTEHNOLOŠKE NAUKE.
104. Markov D. I., Zubov E. O., Nikolaeva O. P., Kurganov B. I., Levitsky D. I. (2010): Thermal Denaturation and Aggregation of Myosin Subfragment 1 Isoforms with Different Essential Light Chains. *Int. J. Mol. Sci.* **11** 4194-4226.
105. Mišljenović N. M., Koprivica G. B., Pezo L. L., Kuljanin T. A, Bodroža Solarov M. I. and Filipčev B. V. (2011): Application of Peleg model to study mass transfer during osmotic dehydration of apple in sugar beet molasses *APTEFF* **42** 1-288.
106. Marchetti L., Andrés S.C., Califano A.N. (2013): Textural and thermal properties of low-lipid meat emulsions formulated with fish oil and different binders, *LWT - Food Science and Technology* **51** 514-523.
107. Marcotte M., Taherian A. R., Karimi Y. (2008): Thermophysical properties of processed meat and poultry products, *Journal of Food Engineering* **88** 315–322.

108. Matteini P., Cicchi R., Ratto F., Kapsokalyvas D., Rossi F., de Angelis M., Pavone F. S., Pini R. (2012): Thermal transitions of fibrillar collagen unveiled by second-harmonic generation microscopy of corneal stroma, *Biophysical Journal* **103** 1179–1187.
109. Mitchell, J. R. (1998): Water and food macromolecules. In S. E. Hill, D. A. Ledward, & J.R. Mitchell (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp. 50–76). Gaithersburg: Aspen Publishers.
110. Medina-Vivanco, M., Sobral, P.J.A., Sereno A.M., Hubinger, Dupas M (2004): Thermal analysis of osmotically dehydrated Tilapia muscle: Effect of sodium chloride and sucrose on dehydration temperature of myofibrillar proteins. *Proceedings of the 14<sup>th</sup> international drying symposium (IDS 2004), C*, 1859-1867.
111. Martens, H. i Vold, E. (1976): DSC studies of muscle protein denaturation. In *Proceedings of the 22nd European meeting of meat research workers, Malmo , Sweden* (p. J 9.3).
112. Masuoka J., Hegenuer J., Van Dyke B. R., Saltman P. (1993): Intrinsic Stoichiometric Equilibrium Constants for the Binding of Zinc(II) and Copper(II) to the High Affinity Site of Serum Albumin *J Biol Chem.* **268** 29 21533-7.
113. Masuoka J., Saltman P. (1994): Zinc(II) and Copper(II) Binding to Serum Albumin a comparative study of dog, bovine, and human albumin, *The Journal of Biological Chemistry.* **269** 41 25557-61.
114. Marcone M.F., Wang S., Albabish W., Nie S., Somnarain D., Hill A. (2006): Review Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology, *Thermochimica Acta* **445** 168–178.
115. Martinez-Alvarez O., Gomez-Guillen M.C. (2006): Effect of brine salting at different pHs on the functional properties of cod muscle proteins after subsequent dry salting *Food Chemistry* **94** 123–129.
116. Mazza, G., Biliaderis, C. G. (1989): Functional properties of flaxseed mucilage, *Journal of Food Science*, **54**, 1302–1305.
117. Merzel F. & Smith J. C. (2002): Is the first hydration shell of lysozyme of higher density than bulk water? *PANAS*, **99** 8 5378–5383.
118. Mišljenović, N., Koprivica G., Lević Lj. (2010): Comparison of the kinetics of osmotic drying apples in sugar beet molasses and sucrose solutions, *Journal on Processing and Energy in Agriculture (former PTEP)* **14** 1 32-35.

119. Mišljenović, N., Koprivica, G., Lević, Lj., Stoilković, S., Kuljanin T. (2011): Counter-current osmotic dehydration of carrot and apple in sucrose solutions and sugar beet molasses. *Journal on Processing and Energy in Agriculture (former PTEP)* **15** 3 146-148.
120. Mišljenović, N., Koprivica, G., Pezo, L., Lević, Lj., Čurčić, B., Filipović, V. Nićetin, M. (2012): Optimisation of the osmotic dehydration of carrot cubes in sugar beet molasses, *Thermal Science* **16** 1 43-52.
121. Micard V., Morel M.-H, Bonicel J, Guilbert S. (2001): Thermal properties of raw and processed wheat gluten in relation with protein aggregation, *Polymer* **42** 2 477–485.
122. Mišljenović N.M., Koprivica G. B., Lević Lj. B., Filipčev B. V. Kuljanin T. A. (2009): Osmotic dehydration of red cabbage in sugar beet molasses – mass transfer kinetics, *APTEFF*, **40** 145-154.
123. Moelbert, S., Normand, B., De Los Rios, P. (2004): Kosmotropes and chaotropes: Modelling preferential exclusion, binding and aggregate stability. *Biophysical Chemistry*, 112, 45–57.
124. Moates G.K, Parker R., Ring S.G (2001): Dynamic mechanical and dielectric characterisation of amylose–glycerol films *Carbohydrate Polymers* **44** 247–253.
125. Morita, J. I., & Yasui, T. (1991): Involvement of hydrophobic residues in heat-induced gelation of myosin tail subfragment from rabbit skeletal muscle. *Agricultural Biological Chemistry* **55** 597–599.
126. Mrad N. D., Bonazzi C., Boudhrioua N., Kechaou N., Courtois F. (2012): Influence of sugar composition on water sorption isotherms and on glass transition in apricots, *Journal of Food Engineering* **111** 403–411
127. Mrad N. D., Bonazzi C., Courtois F, Kechaou N., Boudhrioua Mihoubi N. (2013): Moisture desorption isotherms and glass transition temperatures of osmo-dehydrated apple and pear, *Food and bioproducts processing* **91** 121–128.
128. Muguruma, M., Katayama, K., Nakamura M. (1987): Low temperature dehydration improves the quality of intermediate moisture meats, *Meat Science* **21** 99-109.
129. Mulet, J. García-Reverter, R. Sanjuán, J. Bon (1999): Sorption Isothermic Heat Determination by Thermal Analysis and Sorption Isotherms, *Journal of Food Science* **64** 1 64–68.
130. Muñoz I., Garcia-Gil N., Arnau J., Gou P. (2012): Rehydration kinetics at 5 and 15 °C of dry salted meat *Journal of Food Engineering* **110** 465–471.

131. Mu C., Li D., Wei Lin, Ding Y., Zhang G. (2007): Temperature induced denaturation of collagen in acidic solution *Biopolymers*, **86** 282–287.
132. Nistora M-T., Pamfila D., Schickb C., Vasilea C. (2014): Study of the heat-induced denaturation and water state of hybrid hydrogels based on collagen and poly (N-isopropyl acrylamide) in hydrated conditions, *Thermochimica Acta* **589** 114–122.
133. Noel T. R., Parker R. Ring S. G. (1996): A comparative study of the dielectric relaxation behaviour of glucose, maltose, and their mixtures with water in the liquid and glassy states *Carbohydr. Res.* **282** 193-206.
134. Offer, G., Trinick, J. (1983): On the mechanism of water holding in meat – the swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Science* **8**, 245–281.
135. Offer, G., Cousin, T. (1992):. The mechanism of drip production –formation of 2 compartments of extracellular-space in muscle postmortem. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **58**, 107–116.
136. Olbrich H. (1963): *The Molasses*, Institut für Zuckerindustrie, Berlin (Germany)
137. Oladele, A.K., Odedeji, J.O. (2008): Osmotic dehydration of Catfish (*Hemisyndontis membranaceus*): Effect of temperature and time, *Pakistan Journal of Nutrition* **7** 1 57-61.
138. Ohkuma C., Kawai K., Viriyarattanasak C., Mahawanich T. (2008): Glass transition properties of frozen and freeze-dried surimi products: Effects of sugar and moisture on the glass transition temperature *Food Hydrocolloids* **22** 255–262.
139. Ogawa S., Osanai S. (2012). Glass Transition Behavior of Aqueous Solution of Sugar-Based Surfactants, Supercooling, Prof. Peter Wilson (Ed.), ISBN: 978-953-51-0113-0, InTech, Available from:  
<http://www.intechopen.com/books/supercooling/glass-transition-behavior-of-aqueous-solution-of-sugar-basedsurfactants>
140. Orlien V., Risbo J., Andersen M. L., Skibsted L. H. (2003) The Question of High- or Low-Temperature Glass Transition in Frozen Fish. Construction of the Supplemented State Diagram for Tuna Muscle by Differential Scanning Calorimetry, *J. Agric. Food Chem.* **51**. 211-217.



141. Pan J., Shen, H., Juan You Yongkang Luo (2011): Changes in physiochemical properties of myofibrillar protein from silver carp (*hypophthalmichthys mollitrix*) during heat treatment, *Journal of Food Biochemistry* **35** 939–952.
142. Panagopoulou A., Kyritsis A., Sabater i Serra R., Gómez Ribelles J.L., Shinyashiki N., Pissis P. (2011): Glass transition and dynamics in BSA–water mixtures over wide ranges of composition studied by thermal and dielectric techniques, *Biochimica et Biophysica Acta* **1814** 1984–1996.
143. Passot S., Cenard S., Inès Douania, Ioan Cristian Tréléa, Fernanda Fonseca (2012): Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria, *Fonseca Food Chemistry* **132** 1699–1705.
144. Paterson, B.C., Parrish, F.C., Stromer, M.H. (1988): Effects of salt and pyrophosphate on the physical and chemical properties of beef muscle. *Journal of Food Science* **53** 5 1258–1265.
145. Paredi, M.E., Tomas, M.C., & Crupkin, M. (2003): Thermal behavior of myofibrillar proteins from the adductor muscles of scallops: a differential scanning calorimetric study (DSC). *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **20** 2 153-159.
146. Pospiech E., M.L. Greaser, B. Mikolajczak, W. Chiang and M. Krzywdzinska (2002): Thermal properties of titin from porcine and bovine muscles. *Meat Science* **62** 2 187-192.
147. Pearce K.L., Rosenvold K., Andersen H. J., Hopkins D.L. (2011): Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes (Review). *Meat Science* **89** 111–124.
148. Peleg, M. (1988): An empirical model for the description of moisture sorption curves. *Journal of Food Science* **53** 1216–1219.
149. Pezo L.L., Lević L.B., Cvetković B.R., Kovač O.A. (2014): Effects of temperature and immersion time on rehydration of osmotically treated pork meat, *Chemical industry* **53** 260–270.
150. Phisut N. (2012): Factors affecting mass transfer during osmotic dehydration of fruits, *International, Food Research Journal* **19** 1 7-18.
151. Puolanne E., Halonen M. (2010): Theoretical aspects of water-holding in meat (Review) *Meat Science* **86** 151–165.

152. Pollack, G. H. (2003). The role of aqueous interfaces in the cell. *Advances in Colloid and Interface Science*, 103, 173–196.
153. Privalov P. L., Khechinasvil N.N. (1974): A Thermodynamic Approach to the Problem of Stabilization of Globular Protein Structure *J. Mol. Biol.* **86** 665–684.
154. Potes N., Kerry J. P., Roos Y.H. (2014): Protein Modifications in High Protein-Oil and Protein-Oil-Sugar Systems at Low Water Activity *Food Biophysics* **9** 49–60.
155. Privalov P. Scanning microcalorimeters for studying macromolecules (1980): *Pure&Appl. Chem.* 52 479-497.
156. Purslow, P. (2001): Meat Structure and Quality. *Meat Science* , 247-249.
157. Quinn F.X., Kampff E., Smyth G., McBrierty V.J.(1988): Water in Hydrogels. 1. A Study of Water in Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone/methylmethacrylate) Copolymer *Macromol.* **21**, 3191–3198
158. Rahman M. S., (2006): State diagram of foods: Its potential use in food processing and product stability, *Trends in Food Science & Technology* **17** 129–141.
159. Reading M., Luget A., Wilson R. (1994): Modulated differential scanning calorimetry. *Thermochim. Acta* **238** 1–2 295–307.
160. Reyes A., Perez N., Mahn A. (2011): Theoretical and Experimental Study of Freeze-Drying of “loco” (*Concholepas concholepas*) *Drying Technology* **29** 1386–1395.
161. Rosgen J., Hinz H.J., (2001): Folding energetics of ligand binding proteins. I. Theoretical model *J.Mol.Biol* **306** 809-824.
162. Rosengarth A., Rosgen J. Hinz H.J., Gerke V, (2001): Folding energetics of ligand binding proteins. *J.Mol. Biol.* **306** 825-835.
163. Rochdi A., Foucat L., Renou J-P. (2000): NMR and DSC studies during thermal denaturation of collagen *Food Chemistry* **69** 295-299.
164. Rahman M. S., Kasapis S., Guizani N., Al-Amri O.S. (2003): State diagram of tuna meat: freezing curve and glass transition *Journal of Food Engineering* **57** 321–326.
165. Rahman M. S. (2009): *Food Properties Handbook, Second Edition Chapter 6 Prediction of ice content in frozen food* CRC Taylor&Frances Group 150-197.

- 166.Rahman, M.S., Al-Saidi, G., Guizani, N., & Abdullah, A. (2010): Development of state diagram of bovine gelatin by measuring thermal characteristics using differential scanning calorimetry (DSC) and cooling curve method. *Thermochimica Acta*, **509** 1-2 111-119.
- 167.Rahman, M.S. (2012). Applications of macro-micro region concept in the state diagram and critical temperature concepts in determining the food stability. *Food Chemistry*, **132** 4, 1679-1685.
- 168.Ribeiro S. da C. A., Tobinaga S. (2004): Osmotic Dehydration Of Mapará Catfish (*Hypophthalmus edentatus*) Fillets: Effect Of Ternary Solutions *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande* **6** 2 115-122.
- 169.Roos Y. H., (2003): Thermal Analysis, State Transitions And Food Quality, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **71** 197–203.
- 170.Roos, Y.H., & Karel, M. (1991): Applying state diagrams to food processing and development. *Food Technology*, **45** 12 66-71.
- 171.Roos Y.H., (1993): Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates *Carbohydrate Research*, **238** 39–48.
- 172.Roos Y.H. (1986): Phase Transitions and Unfreezable Water Content of Carrots, Reindeer Meat and White Bread Studied using Differential Scanning Calorimetry *Journal of Food Science* **51** 3 684–686.
- 173.Roos Y. H. (1995) *Phase Transitions in Foods*, Academic Press, San Diego, CA. 360-370.
- 174.Roos Y. H. and Potes N. (2015): Quantification of Protein Hydration, Glass Transitions, and Structural Relaxations of Aqueous Protein and Carbohydrate–Protein Systems *J. Phys. Chem. B* **119** 7077–7086.
- 175.Ruiz-Cabrera, M.A., & Schmidt, S.J. (2015): Determination of glass transition temperatures during cooling and heating of low-moisture amorphous sugar mixtures. *Journal of Food Engineering* **146** 36-43.
- 176.Ruiz-Ramirez J., Serra X., Arnau J., Gou P. (2005): Profiles of water content, water activity and texture in crusted dry-cured loin and in non-crusted dry-cured loin, *Meat Science* **69** 519–525.

177. Shia Qi-L., Zhaob Y., Chenc H-H, Li Z-J, Xuea C-H (2009): Glass transition and state diagram for freeze-dried horse mackerel muscle *Thermochimica Acta* **493** 55–60.
178. Svergun D. I., Richard S., Koch M. H. J., Sayers Z., Kuprin S., Zaccai G. (1998): Protein hydration in solution: Experimental observation by x-ray and neutron scattering *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2267–2272.
179. Sopade P.A. Lee S.B., White E.T., Halley P.J. (2007): Glass transition phenomena in molasses *LWT* **40** 1117–1122.
180. Suzuki, T. and Franks, F. (1993): Solid-liquid phase transitions and amorphous states in ternary sucrose-glycine-water systems. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **89** 3283–3288.
181. Suden J. R., Pearson A. M. , Dugan L. R. Jr. (1964): Rehydration of Freeze-Dried Pork as Related to pH and Protein Denaturation *Journal of Food Science*, 29 2 192–197.
182. Shcharbin D. , Mazurb J., Szwedzka M. Wasiak M. , Palecz , B., Przybyszewskad M., Zaborski M. , Bryszewskaa M. (2007): Interaction between PAMAM 4.5 dendrimer, cadmium and bovine serum albumin: A study using equilibrium dialysis, isothermal titration calorimetry, zeta-potential and fluorescence *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **58** 286–289.
183. Saldo J., Sendrab E., Guamisa B., (2002): Changes in water binding in high-pressure treated cheese, measured by TGA (thermogravimetric analysis) *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3203–207.
184. Slade L., Levine H., (1991): Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **30** 115-126
185. Slade L. Levine H., (1995): Glass Transitions and Water-Food Structure Interactions *Adv. Food Nutr. Res.*, **38** 103-269.
186. Sablani S. S , Bruno L., Kasapis S., R. Symaladevi M. (2009): Thermal transitions of rice: Development of a state diagram *Journal of Food Engineering* **90** 110–118.
187. Santchurn S.J., Collignan A., Trystram G. (2007): Impact of solute molecular mass and molality, and solution viscosity on mass transfer during immersion of meat in a complex solution *Journal of Food Engineering* **78** 1188–1201.

- 188.Schmidt F.C., Carciofi B.A.M., Laurindo J.B. (2008): Salting operational diagrams for chicken breastcuts: Hydration–dehydration Journal of Food Engineering **88** 36–44.
- 189.Schmidt F.C., Carciofi B.A.M., Laurindo J.B. (2009): Application of diffusive and empirical models to hydration, dehydration and salt gain during osmotic treatment of chicken breast cuts Journal of Food Engineering **91** 553–559.
- 190.Schubring R. (2007): DSC measurements on sharks, *Thermochimica Acta* **458** 124–131.
- 191.da Silva V. M., Silva L. A., de Andrade J. B., da Cunha Veloso M.C., Vieira Santos G. (2008): Determination of moisture content and water activity in algae and fish by thermoanalytical techniques, *Quím. Nova* **31** 901-905.
- 192.Sikes A., Tornberg E., & Tume R. (2010): A proposed mechanism of tenderizing post-rigor beef using high-pressure-heat treatment. *Meat Science* **84** 390–399.
- 193.Stabursvik E. , Martens H. (1980): Thermal denaturation of proteins in *Post rigor* muscle tissue as studied by differential scanning calorimetry, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **31** 1034–1042.
- 194.Sun X. D. Holley R. A. (2011) Factors Influencing Gel Formation by Myofibrillar Proteins in Muscle Foods, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **10** 33-51.
- 195.Sharke A., Ross. P.D.(1990): Ligand-induced biphasic protein denaturation. *J Biol Chem* **265** 5055–5059.
- 196.Shi Qi-L. , Wang X., Zhao Y., Fang Z. (2012): Glass transition and state diagram for freeze-dried *Agaricus bisporus* *Journal of Food Engineering* **111** 667–674.
- 197.Shi Qi-L, Zhao Y. Chen , H-H., Li Z-J., Xue C-H. (2009): Glass transition and state diagram for freeze-dried horse mackerel muscle *Thermochimica Acta* **493** 55–60.
- 198.Stewart A.J., Blindauer C.A, Berzenko S., Sleep, D., Sadler P. (2003): Interdomain zinc site on human albumin. *PNAS* **100** 3701-3706.
- 199.Sunooj K.V., Radhakrishna K., Johnsy G., Bawa A.S. (2009): Factors influencing the calorimetric determination of glass transition temperature in foods: A case study using chicken and mutton, *Journal of Food Engineering* **91** 347–352.

- 200.Šuput D.Z., Lazić V. L., Pezo L. L., Lević Lj. B., Gubić J. M. Hromiš N. M., Šojić B. V. (2013): Modified atmosphere packaging and osmotic dehydration effect on pork quality and stability, *Romanian Biotechnological Letters* **18** 1860-1869.
- 201.Šuput Z. D., Lazić L. V., Lević B. Lj., Pezo L. L., Tomović M. V., Hromiš M. N. (2013): Effect of specific packaging conditions on myoglobin and meat color, *Food and Feed Research* **40** 1 1-10.
- 202.Schubring R. (2006): Thermal stability, texture, liquid holding capacity and colour of smoked salmon on retail level, *Thermochimica Acta* **445** 168–178.
- 203.Schubring R., (2004): Differential scanning calorimetric (DSC) measurements on the roe of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): influence of maturation and technological treatment, *Thermochimica Acta* **415** 89–98.
- 204.Taiwo K. A., Eshtiaghi M. N., Ade-Omowaye B. I. O. Knorr D. (2003): Osmotic dehydration of strawberry halves: influence of osmotic agents and pretreatment methods on mass transfer and product characteristics *International Journal of Food Science and Technology* **38** 693–707.
- 205.Talja R. A. , Roos Y. H. (2001): The phase and state transition effects on dielectric, mechanical, and thermal properties of polyols, *Thermochim. Acta* **380** 109-121.
- 206.Telis, V.R.N., Sobral, P.J.A. (2002): Glass transition of freeze-dried and air dried tomato. *Food Research International* **35** 435–443.
- 207.Thorarinsdottir, K. A., Arason, S., Geirsdottir, M., Bogason, S. G., Kristbergsson, K. (2002):Changes in myofibrillar proteins during processing of salted cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry, *Food Chemistry* **77** 377–385.
- 208.Tomović V.M., Petrović L.S., Tomović, M. S. Kevrešan Z.S., Džinić N. R. (2011) Determination of mineral contents of semimembranosus muscle and liver from pure and crossbred pigs in Vojvodina (northern Serbia) *Food Chemistry* **124** 342–348.
- 209.Tylewicz U., Panarese V., Laghi L., Rocculi P., Nowacka M., Placucci, G. (2011):NMR and DSC water study during osmotic dehydration of *Actinidia deliciosa* and *Actinidia chinensis* kiwifruit. *Food Biophysics*, **6** 2 327–333.
- 210.Tocci A. M. and Mascheroni R. H, (1998): Characteristics of Differential Scanning Calorimetry Determination of Thermophysical Properties of Meats, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **31** 418–426.

211. Tolstorebrov I., Eikevik T.M., Bantle M. (2014): A DSC study of phase transition in muscle and oil of the main commercial fish species from the North-Atlantic Food Research International **55** 303–310.
212. Tomaszewska-Gras J., Konieczny P. (2010): A DSC study on the effect of marination on the stability of skin collagen from chicken wings, *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* **9** 413-423.
213. Tortoe C. (2010): A review of osmodehydration for food industry, *Review, African Journal of Food Science* **4** 6 303 – 324.
214. Tornberg E. (2005): Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products (Review), *Meat Science* **70** 493–508.
215. Tornberg E. (2013) Engineering processes in meat products and how they influence their biophysical properties (Review), *Meat Science* 95 871–878.
216. Trujillo F.J., Wiangkaew C., Pham Q. T. (2007): Drying modeling and water diffusivity in beef meat, *Journal of Food Engineering* **78** 74–85.
217. Vyazovkin S., Sbirrazzuoli V.L.N. (2009): Thermal Denaturation of Collagen Analyzed by Isoconversional Method *Macromol. Biosci.* **9** 805–812.
218. Voutila L. (2009): Properties of intramuscular connective tissue in pork and poultry with reference to weakening of structure, *ACADEMIC DISSERTATION, Department of Food Technology University of Helsinki, Finland 2009. (EKT series 1445).*
219. Venturi L., Rocculi P., Cavani C., Placucci G., Dalla Rosa M., Cremonini M. A. (2007): Water Absorption of Freeze-Dried Meat at Different Water Activities: a Multianalytical Approach Using Sorption Isotherm, Differential Scanning Calorimetry, and Nuclear Magnetic Resonance *J. Agric. Food Chem.* **55** 10572–10578.
220. Venturi L.: NMR Study of Meat as Related to its Structural Organisation, *ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA FACOLTÀ DI AGRARIA Dottorato di Ricerca in Scienze degli Alimenti, 2007/08.*
221. Voutila L., Mullen A.M., Ruusunen M., Troy D., Puolanne E. (2007): Thermal stability of connective tissue from porcine muscles, *Meat Science* **76** 474–480.
222. Vučelić D., *Savremena biofizika: Volume 2. Biotermalna analiza, Naučna knjiga, 1987.*

223. Wilcox D. E. (2008): Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: An overview of recent studies, Review, *Inorganica Chimica Acta* **361** 857–867.
224. Wołoszyn J. (2002) The functional properties of muscles from force fed Mulard ducks. 2. The thermal properties of muscle proteins. *Arch. Geflugelk.* **66** 6 274 – 279.
225. Wolfe J., Bryant G. Koster K. L. (2002) What is ‘unfreezable water’, how unfreezable is it and how much is there? *CryoLetters* **23** 157–166.
226. Wright D.J. (1984): Wilding P. Differential scanning calorimetric study of muscle and its proteins: Myosin and its subfragments *Journal of the Science of Food and Agriculture* **35** 3 357–372.
227. Xiong Y.L., Brekke C.J., Leung H.K (1987): Thermal Denaturation of Muscle Proteins From Different Species and Muscle Types as Studied by Differential Scanning Calorimetry *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* **20** 357–362.
228. Xiong, Y. L., Blanchard, S. P. (1993): Viscoelastic properties of myofibrillar protein and polysaccharide composite gels. *Journal of Food Science* **58** 164–167.
229. Yongsawatdigula J., Parkb W. (2003): Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin *Food Chemistry* **83** 3 409–416.
230. Zhang X., Ookawa M., Tan Y., Ura K., Adachu S., Takagi Y. (2014): Biochemical characterization and assessment of fibril-forming ability of collagens extracted from Bester sturgeon *Huso huso* x *Acipenser ruthenus* *Food Chemistry* **160** 305-312.
231. Zhao J-H., Xin F-L., Wen, Xiao H-W., Ni Y-Y. (2015): State diagram for freeze-dried mango: Freezing curve, glass transition line and maximal-freeze-concentration condition, *Journal of Food Engineering*, **157** 49–56.