

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODELEK ZA ŽIVILSTVO

Jure SADAR

**SPREMLJANJE PARAMETROV KAKOVOSTI V GOVEJIH
MIŠICAH *LONGISSIMUS LUMBORUM* IN *TRICEPS BRACHII* MED
ZORENJEM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EVALUATION OF QUALITY PARAMETERS DURING AGEING
OF BEEF *LONGISSIMUS LUMBORUM* AND *TRICEPS BRACHII*
MUSCLES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno na Katedri za tehnologijo mesa in gotovih jedi, Katedri za vrednotenje živil na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomske naloge imenovala doc. dr. Leo Gašperlin in za recenzentko prof. dr. Terezijo Golob.

Mentorica: doc. dr. Lea Gašperlin

Recenzentka: prof. dr. Terezija Golob

Komisija za ocenjevanje in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jure Sadar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 637.517.2:547.46(043)=863
KG	meso / goveje meso / <i>m. longissimus lumborum</i> / <i>m. triceps brachii</i> / zorenje mesa / aminokisline / HPLC / rezna trdnost / senzorične lastnosti
AV	SADAR, Jure
SA	GAŠPERLIN, Lea (mentorica)/GOLOB, Terezija (recenzentka)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2006
IN	SPREMLJANJE PARAMETROV KAKOVOSTI V GOVEJIH MIŠICAH <i>LONGISSIMUS LUMBORUM</i> IN <i>TRICEPS BRACHII</i> MED ZORENjem
TD	diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 57 str., 26 pregl., 13 sl., 71 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen dela je bil spremljati vpliv zorenja (2, 7, 14 in 28 dni pri temperaturi 1 °C) na kemijske (vsebnost beljakovin, maščob, vode, pepela, pH-vrednost in vsebnost prostih aminokislin in peptidov), senzorične (barvo, mehkobo, sočnost, vonj in aromo) in instrumentalne (barva in rezna trdnost) parametre. V poskus so bile 24 ur <i>post mortem</i> vključene dolge hrbtne mišice <i>m. longissimus lumborum</i> (LL) in debela plečeta <i>m. triceps brachii</i> (TB) normalne kakovosti treh telic in treh bikov lisaste pasme. Nezorena goveja mišica LL v povprečju vsebuje 22,5 g/100g beljakovin, 2,6 g/100g maščob, 1,2 g/100g pepela in 73,9 g/100g vode. Goveja mišica TB pa v povprečju vsebuje 22,1 g/100g beljakovin, 2,9 g/100g maščob, 1,3 g/100g pepela in 73,3 g/100g vode. Uporabljena HPLC metoda za določanje vsebnosti prostih aminokislin in peptidov je dala zadovoljive rezultate (KV od 0,5 % do 31,7 %). Z zorenjem v presnem govejem mesu narašča vsebnost vseh prostih aminokislin (izjema so asparagin pri LL ter glutamin in glicin pri TB) in peptidov. V goveji mišici LL 2 dni <i>post mortem</i> je bila koncentracija prostih aminokislin 40,5 µmol/g, po 28-ih dneh 86,5 µmol/g, v mišici TB 2 dni <i>post mortem</i> 39,5 µmol/g, po 14-ih dneh pa 63,8 µmol/g; po 14-em dnevu koncentracija v obeh mišicah ostane nespremenjena. Vsebnost nekaterih dipeptidov se je med 28-dnevnim zorenjem v obeh mišicah značilno povečala. Rezna trdnost toplotno obdelanih vzorcev se je med zorenjem zmanjševala: v mišici LL se je v 14 dneh zorenja zmanjšala za 40 %, v mišici TB pa v 28 dneh za 33 %. Barva, mehkoba, vonj in aroma se med 28-dnevnim zorenjem značilno izboljšajo, sočnost ostane nespremenjena. Za zagotovitev celotne senzorične kakovosti mišice LL zadostuje dva tedna zorenja, medtem, ko je potrebno mišico TB zoriti dlje (4 tedne).

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDC 637.517.2:547.46(043)=863
CX meat / beef / *m. Longissimus lumborum* / *m. Triceps brachii* /ageing of meat / / amino acids / HPLC / Warner Bratzler share force / sensory properties
AU SADAR, Jure
AA GAŠPERLIN, Lea (supervisor)/GOLOB, Terezija (reviewer)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2006
TI EVALUATION OF QUALITY PARAMETERS DURING AGEING OF BEEF *LONGISSIMUS LUMBORUM* AND *TRICEPS BRACHII* MUSCLES
DT Graduation thesis (University studies)
NO X, 57 p., 26 tab., 13 graph., 71 ref.
LA sl
AL sl/en

AB The influence of *post mortem* ageing on chemical (protein content, fat, water, ash, pH value, content of free amino acids and peptides), sensory (colour of raw muscles, tenderness, juiciness, smell and flavour intensity) and instrumental (colour and cutting value) parameters of beef muscles *longissimus lumborum* (LL) and *triceps brachii* (TB) (24 h *post mortem*, normal meat quality) was investigated over a 28 days ageing period. Beef muscles originated from 6 commercially slaughtered animals, 3 bulls and 3 heifers of Simmental breed. The nonaged LL beef muscle on average contained 22.5 g/100g proteins, 2.6 g/100g fat, 1.2 g/100g ash and 73.9 g/100g water. Whereas the TB beef muscle on average contained 22.1 g/100g proteins, 2.9 g/100g fat, 1.3 g/100g ash and 73.3 g/100g water. The HPLC method used for determining the content of free amino acids and peptides gave satisfactory results (KV from 0.5 % to 31.7 %). Content of free amino acids (the exceptions was asparagine in LL and glutamine and glycine in TB) and peptides in raw beef meat during ageing was increased. Content of main free amino acids in LL beef muscle two days *post mortem* was 40.5 µmol/g, after 28 days of ageing 86.5 µmol/g, in the TB muscle 2 days *post mortem* 39.5 µmol/g and after 14 days 63.8 µmol/g; after that content in both muscles remained unchanged. Content of dipeptides in both muscles increased with ageing. The cutting value of roasted samples decreased during the ageing: in LL muscles in a 14-day period of ageing decreased up to 40 %, in TB muscles in 28 days decreased up to 33 %. The colour, tenderness, smell and aroma were during 28-day of ageing improved, whereas the juiciness remained the same. In order to ensure the whole sensory quality of the muscle two weeks of ageing were sufficient whereas the TB muscle had to be aged over a longer period of time (4 weeks).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 LISASTA PASMA GOVEDI.....	3
2.2 MIKROSTRUKTURA MIŠIČNEGA VLAKNA	3
2.2.1 Miofibrile.....	4
2.3 KEMIJSKA SESTAVA MESA.....	5
2.3.1 Voda.....	6
2.3.2 Maščobe.....	6
2.3.3 Ogljikovi hidrati	6
2.3.4 Minerali	7
2.3.5 Vitamini.....	7
2.3.6 Beljakovine.....	7
2.3.6.1 Miofibrilarne beljakovine	7
2.3.6.2 Beljakovine vezivnega tkiva in organelov	8
2.3.6.2.1 Kolagenska vlakna.....	9
2.3.6.2.2 Elastinska vlakna.....	9
2.3.6.2.3 Mitohondrijske beljakovine	9
2.3.6.3 Beljakovine sarkoplazme	9
2.3.6.3.1 Mioglobin	9
2.3.6.3.2 Hemoglobin	11
2.3.6.3.3 Miogen.....	11
2.4 ZORENJE MESA	11
2.4.1 Encimski mehanizem mehčanja mesa	12
2.4.1.1 μ -kalpainska teorija	13
2.4.1.2 Razpoložljiv prost kalcij	13
2.4.1.3 Aktivacija kalpaina s kalcijem	14
2.4.2 Neencimski mehanizem mehčanja mesa – kalcijeva teorija.....	14
2.4.2.1 Slabljenje črt Z.....	14
2.4.2.2 Slabljenje povezav filamentov, nastalih med rigorjem.....	15
2.4.2.3 Razgradnja konektina (titina).....	15
2.4.2.4 Razgradnja nebulina	16
2.4.2.5 Razgradnja dezmina.....	17
2.4.3 Sproščanje aminokislin med zorenjem.....	17
3 MATERIAL IN METODE	21
3.1 NAMEN DELA	21
3.2 MATERIAL.....	21
3.2.1 Anatomska lokacija mišic in razsek govedine.....	21
3.3 NAČRT DELA	22

3.4	METODE DELA	23
3.4.1	Instrumentalna analiza	23
3.4.1.1	Barva	23
3.4.1.2	Tekstura	23
3.4.2	Senzorična analiza	23
3.4.3	Fizikalno-kemijske analize	24
3.4.3.1	Določanje vsebnosti skupnih mineralnih snovi	24
3.4.3.2	Določanje vsebnosti vode s sušenjem	24
3.4.3.3	Določanje vsebnosti maščobe po Weibullu in Stoldt	24
3.4.3.4	Določanje vsebnosti beljakovin	24
3.4.3.5	Merjenje vrednosti pH v ekstraktu	24
3.4.3.6	Določanje vsebnosti prostih aminokislin	25
3.4.3.6.1	Priprava vzorcev	25
3.4.3.6.2	Priprava standardov	26
3.4.3.6.3	Kromatografski pogoji	26
3.4.3.6.4	Izračun	27
3.4.4	Statistična analiza	28
4	REZULTATI	29
4.1	OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA	29
4.1.1	Ponovljivost metod	29
4.1.2	Osnovni statistični parametri	29
4.1.3	Vpliv mišice na kemijsko sestavo govedine	30
4.1.4	Vpliv spola živali na kemijsko sestavo govedine	30
4.2	VREDNOST PH IN VSEBNOST PROSTIH AMINOKISLIN	30
4.2.1	Ponovljivost metod	30
4.2.1.1	Vsebnost prostih aminokislin	30
4.2.2	Osnovni statistični parametri	32
4.2.3	Vpliv mišice	33
4.2.4	Vpliv spola	34
4.2.5	Vpliv časa zorenja	36
4.3	INSTRUMENTALNO IZMERJENI PARAMETRI BARVE IN TEKSTURE	38
4.3.1	Osnovni statistični parametri	38
4.3.2	Vpliv mišice	38
4.3.3	Vpliv spola	39
4.3.4	Vpliv zorenja	39
4.4	SENZORIČNE LASTNOSTI	40
4.4.1	Osnovni statistični parametri	40
4.4.2	Vpliv mišice	40
4.4.3	Vpliv spola	41
4.4.4	Vpliv zorenja	41
4.5	KORELACIJSKA ANALIZA	42
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	44
5.1	RAZPRAVA	44
5.2	SKLEPI	48
6	POVZETEK	50
7	VIRI	53
8	ZAHVALA	58

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Kemijska sestava mesa lisaste pasme goveda slovenskega porekla (Marin, 2000).	6
Preglednica 2:	Vsebnost posameznih prostih aminokislin ($\mu\text{g AK/g}$ vzorca) v mišici <i>triceps brachii</i> 3 dni, 5 dni, 10 dni in 14 dni <i>post mortem</i> (Fieldt in sod., 1996).	18
Preglednica 3:	Osnovni podatki o živalih.	21
Preglednica 4:	SD1 v 0,05M HCL vsebuje naslednjih 27 aminokislin:	26
Preglednica 5:	Ponovljivost med paralelkami pri določanju vsebnosti vode, maščob, beljakovin in pepela v presni goveji mišici LL.	29
Preglednica 6:	Rezultati kemijske analize govejih mišic LL in TB z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.	29
Preglednica 7:	Vpliv mišice na kemijsko sestavo govedine (n=12).	30
Preglednica 8:	Vpliv spola živali na kemijsko sestavo govedine (n=12).	30
Preglednica 9:	Ponovljivost med paralelkami določanja vsebnosti prostih aminokislin in peptidov v presni goveji mišici LL ($\mu\text{mol AK/g}$ vzorca).	31
Preglednica 10:	Rezultati meritev fizikalnih in kemijskih parametrov zorenih govejih mišic LL in TB z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.	32
Preglednica 11:	Vpliv mišice na vrednost pH in vsebnost prostih aminokislin v zoreni govedini (n=48).	33
Preglednica 12:	Vpliv spola živali na vrednost pH in vsebnost prostih aminokislin v zoreni govedini (n=48).	35
Preglednica 13:	Vpliv časa zorenja na vrednost pH in vsebnost prostih aminokislin v goveji mišici LL (n=24).	36
Preglednica 14:	Vpliv časa zorenja na vrednost pH in vsebnost prostih aminokislin v goveji mišici TB (n=24).	37
Preglednica 15:	Rezultati instrumentalno izmerjenih parametrov barve in teksture zorenih govejih mišic LL in TB z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.	38
Preglednica 16:	Vpliv mišice na instrumentalno izmerjene parametre barve in teksture zorene govedine (n=48).	38
Preglednica 17:	Vpliv spola živali na instrumentalno zmerjene parametre barve in teksture zorene govedine (n=48).	39
Preglednica 18:	Vpliv časa zorenja na na instrumentalno izmerjene parametre barve in teksture zorene govedine (n=48).	39
Preglednica 19:	Rezultati ocenjevanja senzoričnih lastnosti zorenih govejih mišic LL in TB z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.	40
Preglednica 20:	Vpliv mišice na senzorične lastnosti zorene govedine (n=48).	40
Preglednica 21:	Vpliv spola živali na senzorične lastnosti zorene govedine (n=48).	41
Preglednica 22:	Vpliv časa zorenja na senzorične lastnosti zorene govedine (n=48).	41
Preglednica 23:	Pearsonovi korelacijski koeficienti med senzorično ocenjenim vonjem in aromo pečene govedine ter prostimi aminokislinami.	42
Preglednica 24:	Pearsonovi korelacijski koeficienti med senzorično ocenjeno barvo presne in mehko pečene govedine ter instrumentalno izmerjenimi parametri barve in teksture.	43

KAZALO SLIK

Slika 1:	Bik lisaste pasme (Pogačar in sod., 1998).	3
Slika 2:	Struktura mišičnega vlakna (Saladin, 2002).	4
Slika 3:	Struktura sarkomere (Valin in Ouali, 1992).	5
Slika 4:	Struktura hema (Potthast, 1987).	10
Slika 5:	Shema treh najpomembnejših oblik mioglobina (N, N ⁺ pomenijo štiri dušikove atome štirih pirolnih obročev porfirinskega prstana, GL je globin, puščice predstavljajo koordinatne vezi, ostale interatomske linije označujejo kovalentne ali ionske vezi) (Hamm, 1975).	11
Slika 6:	Shematski prikaz razgradnje α -konektin na β -konektin in 1200 kDa segment (Takahashi, 1999).	16
Slika 7:	Shematski prikaz podenot nebulina (Tatsumi in sod., 1993).	16
Slika 8:	Vpliv koncentracije Ca ²⁺ na razgradnjo dezmina (Takahashi, 1999).	17
Slika 9:	Vpliv časa zorenja na vsebnost vseh prostih aminokislin v presnem govejem mesu (Polak, 2003).	19
Slika 10:	Vpliv časa zorenja na vsebnost prostih aminokislin, v osmih delih (A-H) mišice <i>longissimus dorsi</i> (Mullen in sod., 2000).	20
Slika 11:	Kromatogram standardne mešanice aminokislin.	27
Slika 12:	Kromatogram prostih aminokislin in peptidov vzorca 7 dni zorene mišice LL.	27

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AAA	α -aminoadipinska kislina
ADP	adenozin difosfat
AGAT	L-arginin/glicin-amidinotransferaza
Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kislina
ATP	adenozin trifosfat
C-C	cistin
CIT	citrulin
Cys	cistein
EDTA	etilendinitrilotetraocetna kislina
GABA	γ -amino-n-butrična kislina
GAMT	S adenozil/L-metionin/N-gvanidinoacetat- metiltransferaza
Gln	glutamin
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
GPR	glicin-prolin
HCL	kloro vodikova kislina
His	histidin
HLV	γ -hidroksilizin
HPLC-MS	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z masnim detektorjem
Hyp	4-hidroksiprolin
Ile	izolevcin
Leu	levcin
LL	<i>longissimus lumborum</i>
LMM	lahki meromiozin
Lys	lizin
Mb	mioglobin
MbO ₂	oksimioglobin
Met	metionin
MetMb	metmioglobin
MHIS	metil-histidin
ORN	ornitin
Pcr	kreatin fosfat
Phe	fenilalanin
PHP	prolin-hidroksiprolin
Pro	prolin
Reagent 1	interna standardna raztopina
Reagent 2	raztopina za izpiranje
Reagent 3A	medij I
Reagent 3B	medij II
Reagent 4	organska raztopina I
Reagent 5	organska raztopina II
Ser	serin

SD 1	standardna raztopina aminokislin 1
SD 2	standardna raztopina aminokislin 2
SD 3	standardna raztopina aminokislin 3
TB	<i>triceps brachii</i>
Thr	treonin
TMM	težki meromiozin
TPR	tiaprolin
Trp	triptofan
Tyr	tirozin
Val	valin

1 UVOD

Meso predstavlja pomemben sestavni del vsakdanje prehrane. Ocene porabe mesa v Evropski zvezi kažejo, da je letna poraba mesa 84,3 kg na prebivalca, od tega 18,6 kg govejega mesa. Ocenjujejo, da v Sloveniji zaužijemo letno 66,6 kg mesa na prebivalca, od tega 20 kg govejega mesa (Čepin in sod., 1997).

Zorenje je kompleksen biokemijski proces na mišičnini in mastnini, ki ga usmerjajo naravno prisotni encimi mesa. Posledica proteolize (razgradnje beljakovin) je poškodovanje strukturnih beljakovin. Znano je, da se pri tem povečuje koncentracija vseh posameznih prostih aminokislin razen glutamina, alanina, ornitina in dipeptida karnozina ter anserina. Meso postaja tudi bolj mehko, topno in žvečljivo. Z zorenjem meso pridobi posebej cenjene jedilne lastnosti, mehkobo in aromo. Hkrati so produkti razkroja beljakovin in maščob nosilci značilnega vonja in okusa. Z zorenjem meso pridobi posebej cenjene jedilne lastnosti, mehkobo in aromo, kar je še posebej poudarjeno pri govejem mesu. Zato je zorenje zelo priporočljivo za meso, ki ga namenjamo za suhe postopke toplotne priprave (pečenje, pečenje na žaru,...).

Običajno zorimo mlado govedino in teletino, v manjši meri tudi meso divjadi, drobnice in kuncev. Piščančjega in prašičjega mesa namensko ne zorimo saj je meso mehko že 48 ur po zakolu. Meso mladih živali je mehkejše in zato bolj primerno za suhe postopke toplotne obdelave, saj se mlado vezivo hitreje zmehča. Za meso starejših živali, ki je namenjeno tem postopkom kulinarične priprave, pa je zorenje še bolj potrebno.

Za zorenje pa vse mišice niso enako primerne. Načeloma lahko zorimo vse kose mesa, vendar se za suhe toplotne postopke in zato za zorenje uporabljajo predvsem mehki kosi, kot so file (pljučna pečenka), ledja (šimbasa), bržola (hrbet), križ (ramstek) in notranje stegno. Manj pogosto pa je zorenje zunanega stegna (črni krajec, beli krajec) ter tankega in debelega plečeta (odstranjene večje strukture veziva).

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen naloge je bil spremljati parametre kakovosti in vsebnost posameznih prostih aminokislin ter peptidov dveh govejih mišic (*m. longissimus lumborum* – LL in *m. triceps brachii* – TB) šestih živali (trije biki in tri telice) v različnih stopnjah zrelosti (po zakolu in v treh različnih intervalih zorenja) ter na njihovi podlagi ugotoviti optimalen čas zorenja in primernost obeh mišic za zorenje. Želeli smo tudi ugotoviti, ali je postopek priprave vzorcev (EZ: faast podjetja Phenomenex ZDA) primeren za določanje prostih aminokislin, ter uvesti in preveriti visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC) v kombinaciji z masnim detektorjem.

Naše hipoteze so bile:

- da se bo koncentracija vseh posameznih prostih aminokislin razen glutamina povečevala;
- da se bodo zaradi proteolize izboljšale senzorične lastnosti, kot so mehkoba mesa, sočnost in aroma;

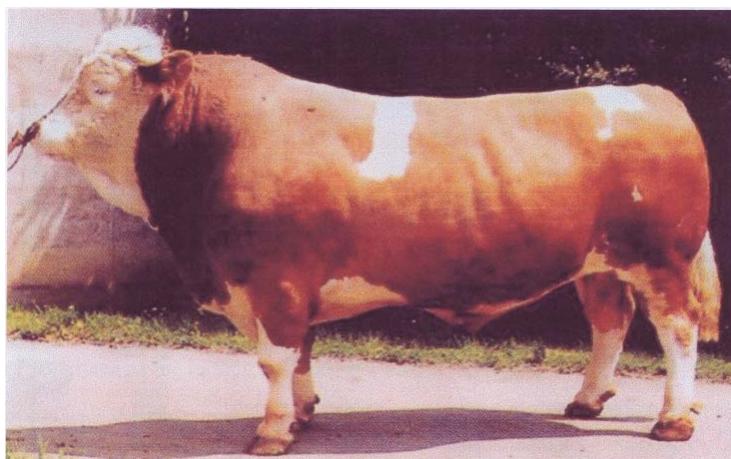
- da bo mišica LL primernejša za zorenje kot mišica TB ter
- da bo optimalni čas zorenja mišic LL in TB različen.

2 PREGLED OBJAV

2.1 LISASTA PASMA GOVEDI

Prvotna domovina lisaste pasme je področje reke Simme v Švici, zato je ta pasma po svetu znana kot simentalka. Od tam se je pasma razširila v nemške in avstrijske dežele ter naprej v Podonavje in na Balkan. Poglavitne rejske dežele lisaste pasme so Švica, Nemčija in Avstrija. V Sloveniji je to najbolj zastopana pasma in njen delež se giblje okoli 60 % (Ferčej in sod., 1989).

Barva živali se spreminja od rumenkaste preko rjave do rdečkaste, z večjimi ali manjšimi belimi lisami. Glava, noge in rep so beli z redkimi lisami rjavega odtenka (Caput, 1996).



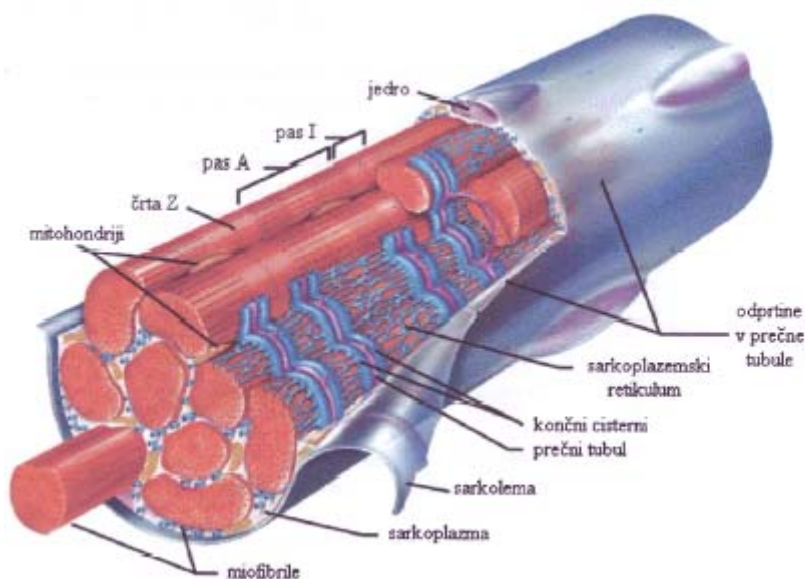
Slika 1: Bik lisaste pasme (Pogačar in sod., 1998)

2.2 MIKROSTRUKTURA MIŠIČNEGA VLAKNA

Osnovna enota skeletnih mišic je dolga cilindrična, mnogojedrna celica, ki jo imenujemo mišično vlakno.

Mišično vlakno je sestavljeno iz (Valin in Ouali, 1992):

- sarkoleme – nežne ovojnice, ki ovija mišično vlakno po celi dolžini;
- sarkoplazme – homogene, razmeroma viskozne tekočine, v kateri se nahajajo miofilamenti, jedra in drugi celični organeli;
- miofibril – kratkih kontraktilnih niti;
- jedra – nosilca dednega materiala;
- celičnih organelov – mitohondrijev, endoplazemskega retikuluma, lizosomov itd..



Slika 2: **Struktura mišičnega vlakna (Saladin, 2002)**

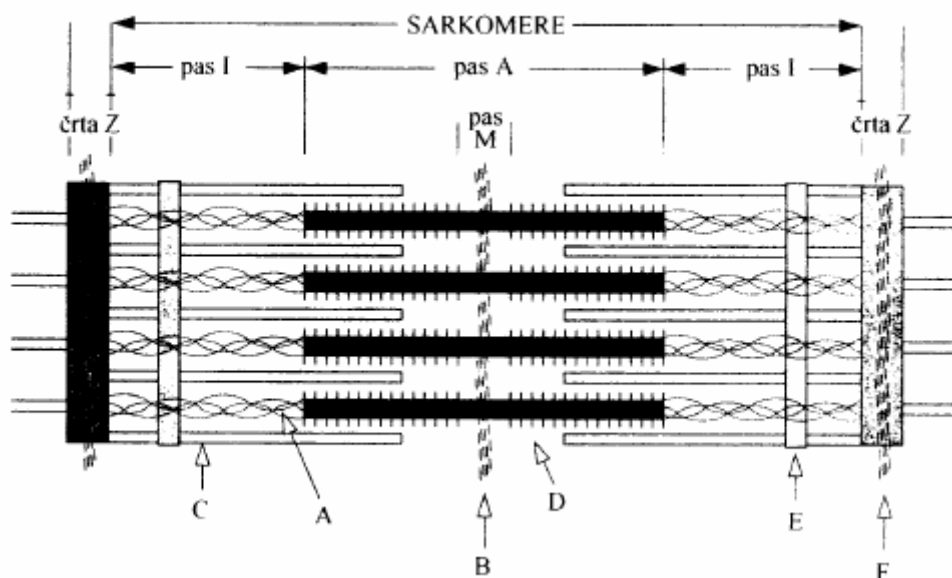
2.2.1 Miofibrile

Miofibrile so tanke niti, premera 1-2 μm , ki so v mišičnem vlaknu in ležijo tesno druga ob drugi. Miofibrile so osnovna enota mišičnega vlakna, v katerih se nahajajo še miofilamenti, debeli, imenovani miozin, in tanki, imenovani aktin.

Vsaka miofibrila je razdeljena na prečne odsečke, ki različno lomijo polarizirano svetlobo. Širši in temnejši je pas A, ožji in svetlejši pa je pas I. Sredi pasu I teče črta Z, polje med dvema črtama Z je strukturna in funkcionalna enota miofibrile, imenovana sarkomera (1,5-4,0 μm) (slika 3). Pasovi A in I ležijo drug poleg drugega in dajejo mišičnemu vlaknu prečno progasti videz. Od črte Z na vsaki strani se proti sredini prožijo svetle nitke – tanki filamenti, ki so sestavljeni iz prevladujoče beljakovine aktin, in jih zato imenujemo aktinski filamenti. V sredini sarkomere se nahajajo za svetlobo manj prepustne nitke ali filamenti, ki so debelejši, sestavljeni iz proteina miozina, in jih zato imenujemo miozinski filamenti (Bučar in sod., 1989).

Debelejši filamenti, ki tvorijo pas A, so iz miozinskih beljakovin. Filament ima rep, v katerem je pretežno lahki meromiozin, težki meromiozin pa sestavlja glavo. Glave kažejo ATP-azno aktivnost in aktivnost povezovanja z aktinom. Glava miozina med krčenjem in *rigor mortisom* tvori prečne vezi z aktinom, imenovane mostički (Bučar in sod., 1989).

Pri mirovanju mišice, se tanki in debeli filamenti v sarkomeri med sabo nekoliko prekrivajo. Področje, kjer so samo debeli filamenti, se imenuje H področje. Znotraj področja H, pa se nahaja pas M, ki služi za ohranjanje tridimenzionalne orientacije debelih miofilamentov (Calkins in Killinger, 2003). Črta Z je sestavljena iz beljakovin tropomiozina in α -aktina, tanki filamenti pasu I pa so sestavljeni iz F-aktina, G-aktina in tropomiozina (Bučar in sod., 1989).



- A – longitudinalni filamenti: titin ali konektin
- B – prečni filamenti: dezmin
- C – tanki filamenti: aktin, tropomiozin, troponin in aktinin
- D – debeli filamenti: miozin, C-protein, H-protein, X-protein
- E – črta N2: aktinin, filamin, dezmin, vinculin, talin, zevgmatin, Z-protein
- F – M-protein, miomiozin, kreatin-kinaza in skelemin

Slika 3: Struktura sarkomere (Valin in Ouali, 1992)

2.3 KEMIJSKA SESTAVA MESA

Meso opredeljujemo predvsem kot beljakovinsko živilo, čeprav je po svoji sestavi tudi pomemben vir drugih hranilnih sestavin, predvsem maščob, ter nehranilnih, toda biološko visokovrednih sestavin, kot so minerali in vitamini (Žlender, 1997).

Pusto presno mišično tkivo (mišičnina) brez vidne maščobe, ne glede na živalsko vrsto, vsebuje okrog 75 % vode, 18-22 % beljakovin, 1-5 % maščob, 1 % mineralnih snovi in do 1 % ogljikovih hidratov. Ta razmerja sestavin se nekoliko spremenijo pri bolj zamaščenem mesu, predvsem na račun zmanjšanja deleža vode, medtem ko se delež ostalih sestavin malo spreminja. Sestava mišičnine se precej spremeni tudi med toplotno obdelavo zaradi izgube mase, tako da se voda zmanjša na 58 do 64 %, beljakovine se povečajo na 24-31 % in prav tako maščobe na 2-10 %, druge sestavine, z izjemo vitaminov, pa se ohranijo na približno isti ravni (Bučar in sod., 1989).

Preglednica 1: Kemijska sestava mesa lisaste pasme goveda slovenskega porekla (Marin, 2000)

parameter	(g/100 g)
voda	75,16
beljakovine	21,19
maščobe	4,00
pepel	1,15
holesterol	70,61

2.3.1 Voda

Voda je po količini prevladujoča inter- in intracelularna sestavina mesa, v kateri so raztopljene, s prehranskega in fiziološkega vidika, mnoge pomembne sestavine (sarkoplazemske beljakovine, proste aminokisline, mlečna kislina, razne anorganske snovi, vitamini idr.). Sama nima nobene hranilne vrednosti, pomembno pa vpliva na senzorično in tehnološko kakovost mesa (Bučar, 1997).

2.3.2 Maščobe

Maščobe v mesu so kot podkožne, medmišične in mišične. So najbolj variabilna sestavina mesa, na katero vplivajo številni dejavniki: vrsta živali in pasma, vrsta kosa ali anatomska lokacija, spol, starost, način vzreje in stopnja prehranjenosti ter način obdelave in predelave mesa.

Nasičenost maščob oziroma maščobnokislinska sestava je zelo značilna za posamezne živalske vrste. Prehrabeniki živalske maščobe, še posebej v rdečem mesu, označujejo kot nasičene maščobe (NMK), za katere menijo, da so rizični dejavnik za nastanek bolezni srca in ožilja ter določenih oblik raka. Delež nasičenih maščobnih kislin je v živalskih maščobah, predvsem v rdečem mesu, večji kot v rastlinskih oljih. Najbolj nasičene (40-50 %) so maščobe mesa klavne živine (govedina, ovčetina, svinjina), nekoliko manj perutnine in konjetine (30-36 %) in najmanj rib (20-30 %). Delež enkratnenasičenih maščobnih kislin (ENMK) je podoben (okrog 40 %) v različnih vrstah mesa in perutnine, v ribah je že precej variabilen, medtem ko so največje razlike v deležu večkratnenasičenih maščobnih kislin (VNMK; Salobir, 1997).

2.3.3 Ogljikovi hidrati

V presnem in pripravljenem mesu so tudi ogljikovi hidrati, vendar je delež tako majhen, da jih v prehrani ne upoštevamo. V živi mišici je sicer okrog 1 % glikogena ali živalskega škroba, ki pa se v procesu posmrtnih biokemijskih sprememb mišice v meso skoraj ves porabi in pretvori v mlečno kislino, ki meso rahlo zakisa na pH = 5,4-5,8. Glikogena je v mesu običajno pod 0,5 % (Žlender, 1997).

2.3.4 Minerali

V mesu klavnih živali je mineralnih snovi (rudnin) okrog 1 %. V primerjavi z drugimi živali meso vsebuje malo natrija, klora in joda. Meso je pomemben vir železa in cinka (Žlender, 1997).

2.3.5 Vitamini

Meso je najpomembnejši vir nekaterih v vodi topnih vitaminov: tiamina – B₁, riboflavina – B₂, niacina, folne kisline, piridoksina – B₆, vitamina B₁₂. Tako je meso dvojno bogat vir niacina, ker vsebuje tako niacin in njegov prekurzor triptofan. Vitamin B₆ je potreben za transfer amino skupin v beljakovinah. Meso je izvrsten vir tako beljakovin, kot tudi vitamina B₆. Vitamin B₁₂ potrebuje organizem za sintezo DNA v vsakem trenutku delitve celic. Fetus potrebuje za rast zlasti veliko vitamina B₁₂, ki je dosegljiv samo iz animalnih živil, kot so meso, mleko in jajca (Lupton in Cross, 1994).

2.3.6 Beljakovine

Beljakovine mišičnine sestavlja 20 aminokislin, 9 esencialnih za odrasle oziroma 11 za otroke. Med beljakovinami mišičnega in veznega tkiva so precejšnje razlike. Vezno tkivo je mnogo siromašneje z esencialnimi aminokislinami, tako da imajo koža, kite in kosi mesa z veliko vrhnjega in notranjega veziva nižjo biološko vrednost (Žlender, 1997).

Beljakovine so najpomembnejša sestavina mesa in so v notranjosti celic nosilci celične strukture in s tem vseh lastnosti, ki so odvisne od te strukture. Lawrie (1979) je beljakovine mesa razdelil na tri večje skupine:

- miofibrilarne,
- sarkoplazemske in
- beljakovine vezivnega tkiva in celičnih organelov.

2.3.6.1 Miofibrilarne beljakovine

Miofibrilarne beljakovine so topne v 0,6 M raztopini elektrolitov, ne pa v vodi. So v miofibrilah, ki so sestavni del mišičnega vlakna. Med miofibrilarne beljakovine prištevamo (Valin in Ouali, 1992):

- glavna kontraktilna proteina: miozin in aktin;
- regulacijske proteine: tropomiozin, C-troponin, I-troponin, T-troponin, α -aktinin, β -aktinin, γ -aktinin, Eu-aktinin;
- citoskeletne proteine: titin (konektin), nebulin (beljakovina linije N2), C-protein, M-protein, dezmin (selektin), filamin, viementin, sinemin, X-protein, I-protein, F-protein, kreatin-kinazo.

a) miozin

Od celotne količine miofibrilarnih beljakovin v skeletni mišici živali odpade 45 % na beljakovino miozin. Molekulska masa miozina je okoli 520 kDa (Honikel, 2004). Molekula miozina je sestavljena iz šestih različnih polipeptidov: en par sestavlja dolgo

težko verigo in dva para lahko verigo. Prva komponenta se imenuje lahki meromiozin (LMM), druga pa težki meromiozin (TMM) (Rahelić, 1978, Murphy 1998).

LMM je sestavljen iz dveh identičnih polipeptidnih verig, ki tvorita α -vijačnico. Glede na aminokislinsko sestavo ima ta del miozinske glave veliko kislih in bazičnih aminokislin, tako da ima navzven veliko pozitivnih in negativnih nabojev. Zaradi tega ima rep molekule veliko sposobnost vezave vode (Rahelić, 1978).

TMM ima v delu vratu manj vijačne strukture, v predelu glave sta polipeptidni verigi zelo malo ali sploh nista zaviti. Ta predel vsebuje veliko prolina, ki zaradi imino skupine onemogoča nastanek zavoja vijačnice. Zaradi take zgradbe se glava miozinske molekule povezuje z aktinom (Rahelić, 1978).

b) aktin

Aktin (molekulska masa 42 kDa) je globularni protein, ki se tvori v več fazah. V prvi fazi se polipeptidne verige, ki nastanejo na ribosomih, povežejo v globularni aktin (G-aktin). G-aktin je skoraj okrogle oblike. Sferična oblika G-aktina je možna, ker aktin vsebuje prolin, tako da ima ta beljakovina malo nabojev na stranskih ostankih aminokislin (s tem je preprečen nastanek α -vijačnice). Nepolarne skupine beljakovin se obrnejo proti sredini globula, polarne proti površini (Rahelić, 1978).

2.3.6.2 Beljakovine vezivnega tkiva in organelov

Beljakovine vezivnega tkiva se nahajajo v vezivnem oziroma podpornem tkivu. Niso topne v vodi.

Vezivno tkivo vsebuje veliko neesencialnih aminokislin, kot so glicin, prolin, 4-hidroksi prolin, 5-hidroksilizin (Plestenjak, 1995). Najpomembnejša je visoka vrednost glicina in prolina, ki skupaj prispevata približno polovico vseh aminokislin. Hidroksilizin je pomemben za oblikovanje prečnih vezi v kolagenu.

Vezivno tkivo v mišičevju (endomizij, perimizij, epimizij) je sestavljeno iz goste mreže različnih vlaken, ki ležijo v substanci. Sestavljajo jo glikoproteini, ogljikovi hidrati, lipidi in voda.

Vezivno tkivo ima celične in necelične komponente. Fibroblasti, mastne celice in makrofagi so najpomembnejše tipi celic. Obkroža jih homogen matriks iz amorfnih mukopolisaharidov, hondroitinskih sulfatov in hialuronske kisline. Vse skupaj pa je prepleteno z mrežo kolagenskih in elastinskih vlaken.

Poznamo tri vrste vlaken:

- kolagenska vlakna,
- elastinska vlakna,
- retikulinska vlakna (Bučar in sod., 1989).

2.3.6.2.1 Kolagenska vlakna

Kolagenska vlakna so brezbarvne, podolžne progaste niti, debele od 1 do 12 μm . Kolagensko vlakno je sestavljeno iz kolagenskih fibril, debeline od 0,3 do 0,5 μm , ki se združujejo v filamente. Osnovna enota fibril je molekula tropokolagena, ki je iz treh polipeptidnih verig, dve sta indentični (α_1), tretja pa malo drugačna (α_2). Te tri verige se z intramolekularnimi vezmi povezujejo med seboj v kompaktno trojno vijačnico (Bučar in sod., 1989; Davies, 2004).

Količina kolagenskih vlaken je večja v mišicah, ki opravljajo več dela. Kolagenska vlakna so raztegljiva za okoli 40 % njihove dolžine. Povrnejo se v prvotno dolžino brez trajnih deformacij (Davies, 2004).

Struktura endomizija je zelo stabilna pri zorenju, saj se med zorenjem nič ne spremeni in tudi vlažna toplotna obdelava ne vpliva nanj. Struktura perimizija se spremeni med drugim in tretjim tednom zorenja. Opaziti je tudi biokemične spremembe na kolagenu in sicer kolagen razpada na manjše dele (Taylor, 2004).

2.3.6.2.2 Elastinska vlakna

Elastinska vlakna so rumene barve. Zgrajena so podobno kot kolagenska vlakna, le da so vezi med polipeptidnimi verigami v molekuli tropoelastina termostabilne (Rahelić, 1978). Polipeptidne verige so naključno razporejene. Elastinska vlakna so raztegljiva do 250 % njihove velikosti brez trajnih deformacij (Davies, 2004).

2.3.6.2.3 Mitohondrijske beljakovine

V to skupino beljakovin spadajo encimi, ki so v mitohondrijih in sodelujejo v dihalni verigi. Mitohondrije imajo vse celice aerobov. Mišične celice, živčne celice in žlezne celice ter embrionalne celice imajo veliko mitohondrijev. Osnovna funkcija mitohondrijev je celično dihanje in tvorba energetsko bogatih snovi (ATP).

V notranji mitohondrijski membrani so citokromi, ki so katalizatorji celičnega dihanja oz. zadnji prenašalci elektronov v dihalni verigi (funkcija: sprememba oksidacijskega števila). Po svoji strukturi so hemoproteini, imajo prostetično skupino, ki je podobna hemoglobinovi. Razlikujemo tri skupine, ki jih zaznamujemo z a, b in c. Znotraj skupine označujemo posameznike z indeksi.

2.3.6.3 Beljakovine sarkoplazme

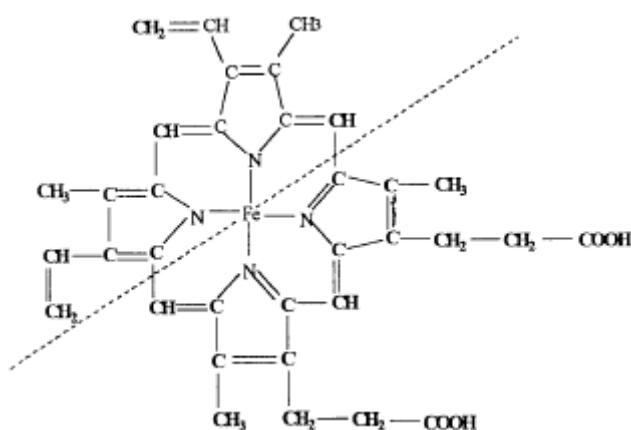
Nahajajo se v sarkoplazmi, to je celični plazmi mišičnega vlakna. Topne so v vodi in solni kislini. Poglavitne beljakovine sarkoplazme so mioglobin, hemoglobin in miogen.

2.3.6.3.1 Mioglobin

Mioglobin, ki se nahaja v sarkoplazmi mišičnih vlaken, je glavni nosilec barve mesa. V živi celici služi kot prinašalec in zaloga kisika (Faustman in sod., 1990). K barvi mesa nekaj malega prispeva še hemoglobin, ki izvira iz nepopolne izkrvavitve. Barva mesa je okvirno določena s 95 % mioglobina in 5 % hemoglobina (Potthast, 1987).

Mioglobin in hemoglobin se po kemijski zgradbi uvrščata med hemoproteine. Beljakovinska komponenta je globin, hem pa prostetična skupina. Globin predstavlja 96 % molekule in hem 4 % (Hamm, 1975).

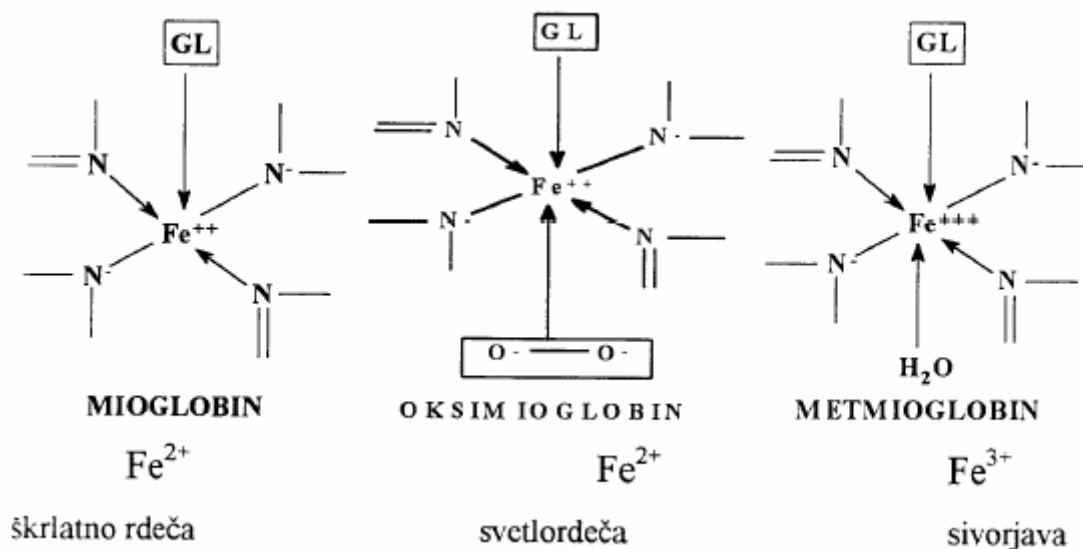
Hem je sestavljen iz porfirinskega obroča in atoma železa. Železov atom je v oksidacijskem stanju +2 in ima koordinacijsko število 6. Štiri vezi tvori s porfirinskim obročem, eno z globinom, medtem, ko je šesta vez prosta za reverzibilne in ireverzibilne reakcije (slika 4).



Slika 4: Struktura hema (Potthast, 1987)

Barva mesa je odvisna od koncentracije pigmenta, kemijskega stanja pigmenta in fizikalnih lastnosti mesa (razpršitve in absorpcije svetlobe). Na koncentracijo mioglobina v mesu vplivajo naslednji dejavniki (Hamm, 1975; Livingston in sod., 1981; Potthast, 1987; Bučar, 1989): vrsta in pasma živali, starost živali in način reje, prehrana živali (železo v prehrani), vrsta mišice (tip presnove) in njena aktivnost.

Barva mesa je določena z dvema oksidacijskima stanjema centralnega Fe atoma v hemu. Dezoksimioglobin, pogosto poimenovan tudi mioglobin (Mb) ali reducirani mioglobin, vsebuje železo v fero obliki (Fe^2), ne vsebuje pa ligandov na šestem koordinativnem mestu. Škrlatno rdeča (ali zamolklo rdeča, žametasto rdeča) barva te oblike je vidna v globini mišice. Ko molekula kisika zasede šesto vez železovega iona v hemu, nastane oksimioglobin (MbO_2), ki je odgovoren za pojav svetlo rdeče barve svežega mesa. Ti dve reducirani obliki mioglobina se lahko oksidirata v nezaželen sivorjav metmioglobin (MetMb), v katerem se železo v hemu pretvori v feri obliko in voda zasede šesto koordinacijsko mesto (slika 5). Barva mesa je torej določena z razmerjem med posameznimi stanji mioglobina: reducirano, oksigenirano in oksidirano obliko (Gašperlin, 1998).



Slika 5: Shema treh najpomembnejših oblik mioglobina (N, N pomenijo štiri dušikove atome štirih pirolnih obročev porfirinskega prstana, GL je globin, puščice predstavljajo koordinatne vezi, ostale interatomske linije označujejo kovalentne ali ionske vezi) (Hamm, 1975)

2.3.6.3.2 Hemoglobin

Hemoglobin je po zgradbi zelo podoben mioglobinu razlikuje pa se po funkciji. Je v krvi in služi prenosu kisika po telesu (Nelson in Cox, 2000).

2.3.6.3.3 Miogen

Miogen predstavlja v vodi topno frakcijo sarkoplazme in obsega različne encime kot so:

- lipolitični,
- proteolitični,
- glikolitični,
- fosforilaze itd..

Vsi encimi so za kakovost mesa zelo pomembni. Sodelujejo pri zorenju mesa in posmrtni glikolizi (Nelson in Cox, 2000).

2.4 ZORENJE MESA

Lehman (1907, cit. po Takahashi, 1996) je prvi povezal teksturo in mehkobo mesa. Precejšnje izboljšanje mehkoobe mesa je opazil v osmih dneh *post mortem* Penny (1980). Razlago je ponudil Hoagland (1917, cit. po Takahashi, 1996), ki je trdil, da je proteoliza tisti proces, ki pripomore k mehčanju mesa.

Zorenje mesa poteka odvisno od vrste in zvrsti mesa. To je voden proces za meso goved (praviloma za mehke kose, za pripravo mesa s suhimi, hitrimi postopki) in divjačino. Zorenje ni potrebno niti priporočljivo za tiste kose goved, ki jih nameravamo kuhati v vodi, v pari ali dušiti. Začetno zorenje poteka običajno v mesni industriji med hlajenjem pridobljenega mesa in nanj uporabnik ne more vplivati. Zoreno meso se pripravlja v gastronomiji za najbolj cenjene in izbrane mesne jedi (Bučar, 1997). Zorenje povzročajo številni zapleteni biokemični procesi, s pomembnimi posledicami za mikrostrukturo in funkcionalne lastnosti mesa ter s pomembnimi implikacijami za mehkobo mesa. Primarni mehanizem zorenja mesa, torej mehčanje mesa *post mortem*, pripisujejo proteolizi ključnih miofibrilarnih in citoskeletnih beljakovin (Ouali, 1990, Valin in Ouali, Koohmaraie, 1996).

Razlikujemo tri osnovne postopke zorenja od zakola do toplotne obdelave. Običajno zorenje poteka od 10 do 14 dni pri temperaturah od 0 do 4 °C in daje zadovoljive jedilne lastnosti. Pospešeno zorenje traja do 8 dni pri temperaturi 4 °C. Dolgotrajno zorenje poteka do 8 tednov pri temperaturi -1 do 0 °C, a zahteva obvezno vakuumsko pakiranje (Gašperlin, 2000).

Ko je doseženo stanje polnega rigorja, je zaključena glikolitična faza biokemijskih sprememb v mišici *post mortem*. Meso je na dotik trdo in suho. Čez nekaj dni začne trdota mišic popuščati zaradi proteolize. Poveča se količina prostih aminokislin in dušika ter izboljša tekstura mesa. Mehčanje mesa je posledica razgradnje pasu M in črte Z. Rahelič (1987) ugotavlja, da so spremembe v črti Z izrazitejše v mišicah prašičev kot pa v mišicah goveda. Ouali (1990) pa pripisuje ključno vlogo v procesu zorenja izgubi miofibrilarne povezave v območju linij N2 (sestavlja jih citoskeletni nebulin), ki so mesto intracelularne akumulacije kalcija.

Čeprav je proteoliza med zorenjem mesa omejena, so nekatere študije pokazale, da so ji podvrženi tako kontraktilni kot citoskeletni proteini. Penny in Dransfield (1979, cit. po Valin in Ouali, 1992) sta ugotovila, da obstaja povezava med izginjanjem troponina T in stopnjo mehčanja mesa, vendar so kasnejše raziskave ovrgle to povezavo. Poleg troponina T pride še do razgradnje troponina I in težke miozinske verige. Od citoskeletnih beljakovin sta med zorenjem mesa samo nebulin in dezmin podvržena razgradnim procesom. Ugotovili so, da med zorenjem, koncentracija beljakovin z molsko maso od 28 do 34 kDa izredno poveča.

Možni mehanizmi zorenja, ki so opisani v literaturi, so lahko encimske ali neencimske narave.

2.4.1 Encimski mehanizem mehčanja mesa

Izmed množice proteolitičnih encimskih sistemov v mišici, sta pomembna samo dva (Ouali, 1990). To sta skupina kislih, lizosomskih encimov, katapsinov D, B, H in L, ki delujejo v kislem območju pH ter skupina kalcij odvisnih nevtralnih proteinaz, kalpainov tudi imenovanih kalpain I, μ M kalpain, in kalpain II, mM kalpain, ki imajo optimum delovanja v nevtralnem pH. Ouali (1990) spremembe med zorenjem razlaga s sinergističnim delovanjem katapsinov in kalpainov in visoko ionsko močjo v mišici *post*

mortem. Nasprotno pa Koohmaraie (1996) poudarja, da so kalpaini, predvsem kalpain I, verjetno edine proteinaze, ki so direktno vključene v procese mehčanja.

2.4.1.1 μ -kalpainska teorija

Po μ -kalpainski hipotezi ima glavno vlogo pri mehčanju in zorenju mesa μ -kalpain, ta postane aktiven, ko se v mišicah *post mortem* iz sarkoplazemskega retikuluma sprostijo večje količine Ca^{2+} ionov. Aktivni kalpaini so nestabilni in njihova aktivnost pada s časom zorenja mesa. Aktivnost kalpainov omejujejo dejavniki, kot so kalpastatini, inhibitorji prisotni v mišicah, vrednost pH in temperatura mišice po zakolu. Po mnenju Dransfielda (1999) s to teorijo lahko razložimo procese, ki potekajo v mišičnini po zakolu.

Kalpaini cepijo peptide na mestu, kjer je na P1 tirozin (Tyr) ali metionin (Met) ali arginin (Arg) in na P2 levcin (Leu) ali valin (Val) (Sasaki in sod., 1984). Kalpaini so intracelularne nevtralne proteinaze odvisne od kalcija in jih uvrščamo v skupino cisteinskih endopeptidaz (EC 3.4.22). V to skupino spadajo tudi katepsini B, L, H, papain in bromelin. Kalpaini se nahajajo v citosolu in imajo pH optimum med 7,2 in 8,2. Goveje skeletne mišice vsebujejo 25 μg μ -kalpaina/g mišičnine. Mišice vsebujejo tudi kalpastatine, ki inhibirajo kalpaine (Murachi, 1989) s tem, da se vežejo na mesto vezave Ca^{2+} in/ali na aktivno mesto kalpainov. 1 molekula kalpastatina inhibira 4 molekule kalpainov. Vendar pa v mišicah ni dovolj kalpastatinov, da bi zavrli delovanje vseh kalpainov.

Kalpaini so heterodimeri, sestavljeni iz dveh podenot: večje 80 kDa in manjše 28 kDa. Pri aktivaciji kalpainov se Ca^{2+} veže na obe podenoti, kar privede do avtolize podenot in njihove aktivacije (80 kDa $\rightarrow$ 76 kDa in 28 kDa $\rightarrow$ 18 kDa). Nadaljnja avtoliza povzroči inaktivacijo kalpainov. Kalpaine lahko popolnoma inaktiviramo z dodatkom EDTA (Dransfield, 1998).

Kalpainska hipoteza zorenja mesa temelji na proteolitski razgradnji beljakovin predvsem z μ -kalpainom. Razlike v trdoti mesa pa lahko nastanejo zaradi različne aktivnosti μ -kalpainov.

Proces proteolize v mišičnini *post mortem* zajema:

- povečanje koncentracije prostih Ca^{2+} ,
- aktivacijo kalpainov s Ca^{2+} ,
- proteolizo mišičnih struktur s kalpaini.

2.4.1.2 Razpoložljiv prost kalcij

Skupna količina Ca^{2+} v mišičnih vlaknih govedi je okrog 1,5 mmol/kg mišičnine in se giblje med 0,6 mmol/kg (Doornenbal in Murray, 1981) pa do 8 mmol/kg. V živi mišici je koncentracija prostega Ca^{2+} le 0,2 μM (Kurebayashi in sod., 1993) in je veliko prenizka, da bi aktivirala μ -kalpain oz. m-kalpain. Večina Ca^{2+} je shranjena v sarkoplazemskem retikulu. Koncentracijo Ca^{2+} v citosolu uravnava kalcijeva črpalka, ki je energijsko odvisna od ATP. Ko nastopi celična smrt, se zaloge energijsko bogatih snovi začno zmanjševati, kar med drugim povzroči odpoved kalcijeve črpalke in povečanje prostega

Ca^{2+} v citosolu mišičnih vlaken. Ob koncu rigorja se koncentracija Ca^{2+} poveča na 100 μM (Jeacocke, 1993). Ta koncentracija prostega Ca^{2+} pa je zadostna le za aktivacijo μ -kalpain ne pa za m-kalpain (Dransfield, 1993). Seveda pa je koncentracija prostega Ca^{2+} odvisna od anatomskega dela, vrste mesa, vrste mišičnih vlaken in pogojev ravnanja z mesom po zakolu – sama temperatura skladiščenja, hitrosti zniževanja vrednosti pH... (Jamie in sod., 1992; Dransfield, 1992; Zamora in sod., 1996).

2.4.1.3 Aktivacija kalpaina s kalcijem

Do sedaj še ni neposrednih dokazov, da se po celični smrti kalpaini aktivirajo s Ca^{2+} in s tem pomembno prispevajo k spreminjanju teksturnih lastnosti mesa. Geesink in Goll (1995) pa sta v mesu našla fragmente kalpainov velike 76 kDa, na podlagi katerih bi lahko sklepali, da je prišlo do aktivne oblike kalpaina in s tem do proteolitičnega delovanja, čeprav fragment ni bil aktiven. S spreminjanjem koncentracije kalpainov v govedini so ugotovili, da se koncentracija le-teh zmanjšuje in doseže minimalno vrednost po 15-ih dneh. Zelo podobno se dogaja s koncentracijo kalpastatinov. Skupaj s temi spremembami pa se tudi izboljšujejo teksturne lastnosti mišičnine. Iz teh ugotovitev lahko sklepamo na aktivacijo kalpainov in porabo kalpastatina ter na proteolitične procese, ki potekajo s proteinazami (Zamora in sod., 1996; Dransfield, 1998). Tudi Thomson in sod. (1996) so prišli do podobnih zaključkov in ugotovili visoko pozitivno korelacijo ($R^2=0,81$) med vrednostjo pH mišičnine in koncentracijo kalpainov v mišičnih vlaknih po zakolu.

2.4.2 Neencimski mehanizem mehčanja mesa – kalcijeva teorija

Neencimsko teorijo mehanizma zorenja mesa je postavil Takahashi (1996) in jo poimenoval 'kalcijeva teorija mehčanja mesa'. Opira se na rezultate, ki sta jih prikazala David in Gilbert (1966, cit. po Takahashi, 1996), o proteolitski razgradnji, ki se pojavi v goveji mišici *longissimus thoracis (dorsi)* 30 dni po zakolu pri 2 °C in velja samo za 2,3 % proteinov. S tem sta avtorja zanikala direktno povezavo med proteolizo in mehčanjem mesa po zakolu. Takahashi tudi navaja poročilo Hamma (1969), po katerem proteoliza mišičnih beljakovin ne more igrati glavne vloge pri mehčanju mesa, vendar je lahko zavajoč faktor pri aseptičnem zorenju pri višjih temperaturah.

Po tej teoriji so fenomeni, ki spremljajo mehčanje mesa *post mortem*, kot so strukturne spremembe miofibril (slabitev črte Z, slabitev aktomiozinskega kompleksa, razgradnja titina, fragmentacija nebulina), slabitev intermediarnih nitk (fragmentacija dezmina) in slabitev veziva (endomizija in perimizija) posledica povečane koncentracije kalcijevih ionov *post mortem*, ne glede na spremljajoče procese proteolize.

2.4.2.1 Slabljenje črt Z

Črte Z povezujejo sosednje sarkomere in omogočajo premikanje tankih in debelih filamentov znotraj sarkomere. Med zorenjem so opazili razgradnjo mišičnih vlaken na 1 do 4 sarkomere (Takahashi, 1967). Slabljenje črt Z povzroča fragmentacijo sarkomer. Črte Z so sestavljene iz filamentov Z, v katerih sta glavni sestavini α -aktin in amorfni matriks

(Takahashi in Hattori, 1989). Amorfní matriks deluje kot povezovalni cement med posameznimi črtami Z. V pogojih, kakršni so v mišici po zakolu, ko koncentracija kalcijevih ionov naraste na 0,1 mM, ta amorfní matriks razpade in zelo oslabi črte Z. Ta proces se dogaja tudi brez prisotnosti proteinaz. Glavna sestavina matriksa so lipidi: fosfolipidi, triacilgliceroli, holesterol in proste maščobne kisline. Predvidevajo, da so predvsem fosfolipidi v fizioloških pogojih elektrostatično vezani na α -aktinin. Pri povečani koncentraciji se kalcijevi ioni vežejo in jim spremenijo elektrostatični naboj. Fosfolipidi se sprostijo z α -aktinina in iz črt Z, kar privede do oslabitve črt Z (Takahashi, 1999, Ahn in sod., 2003).

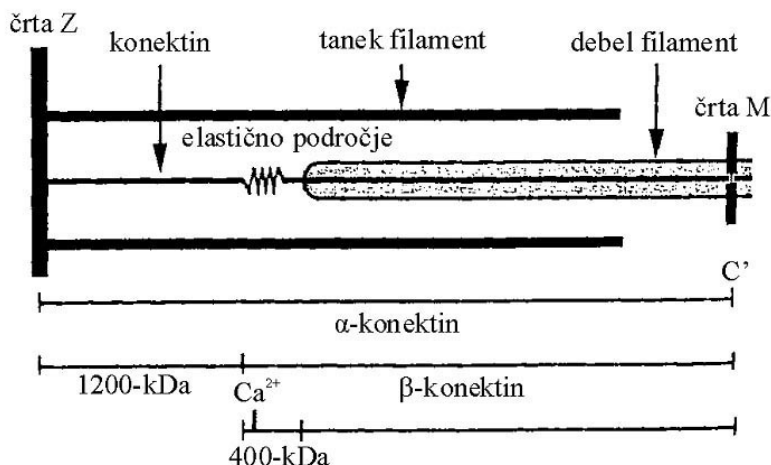
2.4.2.2 Slabljenje povezav filamentov, nastalih med rigorjem

Med rigorjem se vzpostavi močna povezava med aktinom in miozinom, nato pa pride do oslabitve te povezave in sarkomere se ponovno relaksirajo. V predelih A in I se nahaja tudi miofibrilarni protein paratropomiozin, ki se med zorenjem mesa, pri povečani koncentraciji Ca^{2+} v sarkomerah, veže na aktin v tankih filamentih in tako prispeva k sprostitvi vezi med aktinom in miozinom. Delež paratropomiozina, ki se veže na aktin, je v povezavi s povečanjem dolžine sarkomer med zorenjem (Takahashi in sod., 1995). Sarkomere pri govedini dosežejo svojo maksimalno dolžino po 10 dneh. To je še en dokaz, da vezava paratropomiozina oslabi vezavo med aktinom in miozinom ter tako bistveno prispeva k mehčanju mesa med zorenjem (Takahashi, 1996).

2.4.2.3 Razgradnja konektina (titina)

Konektin je elastičen protein, ki povezuje miozin s črto Z v sarkomeri. Konektin pripenja in drži miozin med kontrakcijo mišice v določenem položaju. Mišice so zelo elastične, kar lahko pripišemo predvsem konektinu. Z zorenjem pa mišica izgublja elastičnost in postaja bolj plastična. Zgubljanje elastičnosti je dobro povezano s povečanjem mehko-be mesa (Takahashi, 1996).

Ugotovili so tudi, da med zorenjem mesa pri povečani koncentraciji Ca^{2+} (0,01-0,1 mM), α -konektin razpade na β -konektin in na fragment, ki ima 1200 kDa (slika 6). Enako se zgodi in vitro v mešanici miofibril, obdelanih z raztopino 0,1 mM Ca^{2+} in levpeptinom, močnim proteinaznim inhibitorjem. V govedini pride do popolne razgradnje α -konektina po 10 dneh in s tem meso izgubi elastičnost (Takahashi, 1996).

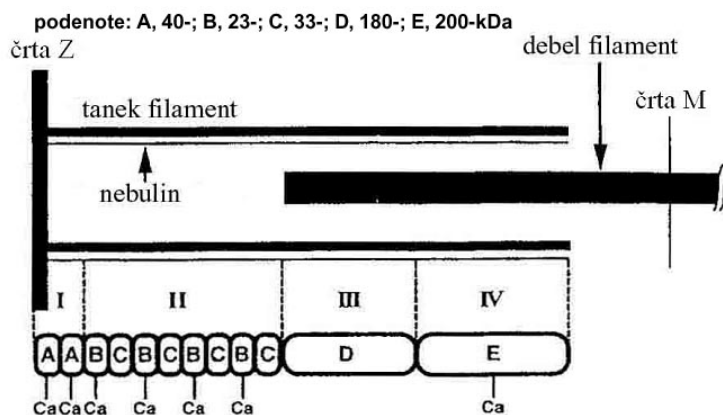


Slika 6: Shematski prikaz razgradnje α -konektin na β -konektin in 1200 kDa segment (Takahashi, 1999)

2.4.2.4 Razgradnja nebulina

Nebulin je še eden filamentozni protein, velik približno 800 kDa. Molekule nebulina povezujejo črte Z z aktinom. So zelo tanki filamenti, ki stabilizirajo strukturo aktinskih filamentov v mreži z miozinom. Ugotovili so da se med zorenjem količina nebulina zmanjšuje (Tatsumi, 1992), kar je posledica razgradnje nebulina na pet podenot, velikih 200, 180, 40, 33 in 23 kDa. Enake rezultate so dobili, če so miofibrile tretirali z raztopino 0,1 mM Ca^{2+} in 70 μM levpeptina. Dokazali so tudi, da se Ca^{2+} vežejo na podenote, velike 200, 40 in 23 kDa (Tatsumi, 1992). Iz tega so zaključili, da je za razgradnjo nebulina najverjetneje odgovorna vezava Ca^{2+} na njegove podenote. To povzroči destabilizacijo organizacije tankih filamentov ter tako pripomore k mehčanju mesa med zorenjem.

Na sliki 7 je model, ki ga je predlagal Tatsumi s sod. (1993). Prikazana so štiri področja: prvo je sestavljeno iz dveh 40 kDa podenot A, drugo iz štirih 33 kDa podenot B in štirih 23 kDa podenot C, tretje iz ene 180 kDa podenote D in četrto področje iz ene 200 kDa podenote E (Tatsumi in Takahashi, 2003).

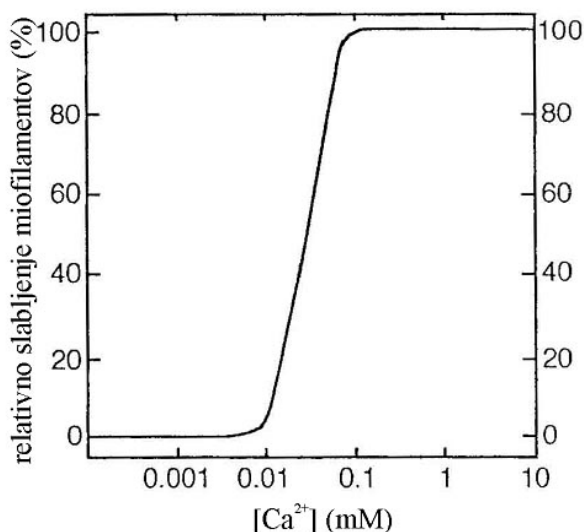


Slika 7: Shematski prikaz podenot nebulina (Tatsumi in sod., 1993)

2.4.2.5 Razgradnja dezmina

Dezmin obdaja vsako črto Z in se razteza med črtami Z sosednjih miofibril; v mišičnih vlaknih deluje kot tridimenzionalni matriks, ki povezuje posamezne miofibrile med seboj in s celično membrano. Na ta način dezmin določa ogrodje, ki mehansko povezuje miofibrile med krčenjem in sprostitvijo skeletne mišice. Dezmin je razvrščen kot citoskeletna beljakovina zaradi svoje funkcije (Takahashi, 1996).

Med zorenjem se molekule dezmina razgradijo na manjše enote. Vsebnost dezmina se pri zoreni govedini v 14 dneh zmanjša za 70-80 %. Dezmin razpade na enote z molsko maso 43-46, 40, 34-36 kg/mol. Enake rezultate so dobili *in vitro*, ko so ugotovili, da dodajanje Ca^{2+} in levpeptina povzroči razgradnjo dezmina na enako velike podenote kot *in vivo*. Razgradnja dezmina se začne pri koncentraciji 0,01 mM Ca^{2+} in doseže maksimalno vrednost pri koncentraciji 0,1 mM Ca^{2+} (slika 8). Temperatura v območju med 5 in 40 °C ne vpliva na razgradnjo dezmina. Ta odkritja jasno kažejo, da razgradnja dezmina med zorenjem mesa povzroči direktno delovanje Ca^{2+} in močno podpirajo kalcijevo teorijo mehčanja mesa. Posledica razpada tridimenzionalnega matriksa dezmina je mehčanje mesa (Takahashi, 1999).



Slika 8: Vpliv koncentracije Ca^{2+} na razgradnjo dezmina (Takahashi, 1999)

2.4.3 Sproščanje aminokislin med zorenjem

Koncentracija prostih aminokislin se z zorenjem govejega mesa povečuje. Te spremembe so posledica delovanja proteolitičnih encimov. Količina sproščenih aminokislin je odvisna od časa zorenja in od vrste posameznih mišic (Feidt in sod., 1996). Proteinaze, kot so kalpainsi in katepsini, povzročajo nastanek peptidov, medtem ko na povečanje koncentracije prostih aminokislin vplivajo encimi aminopeptidaze, ki imajo optimalen pH v nevtralnem območju (Moya in sod., 2001). Pri zorenju mesa imajo pglavitno vlogo katepsini, ki se sprostijo iz lizosomov in delujejo pri nižani vrednosti pH. Lizosomi se navadno razgradijo 5 dni *post mortem*. Vsebnost prostih aminokislin se poveča predvsem

po desetem dnevu zorenja pri 4 °C. Tudi razgradnja kolagena se začne po desetem dnevu zorenja, kar lahko vidimo iz razpredelnice 2, ko se poveča vsebnost hidroksiprolina (Hypro) (Feidt in sod., 1996).

Preglednica 2: Vsebnost posameznih prostih aminokislin ($\mu\text{g AK/g}$ vzorca) v mišici *triceps brachii* 3 dni, 5 dni, 10 dni in 14 dni *post mortem* (Fieldt in sod., 1996)

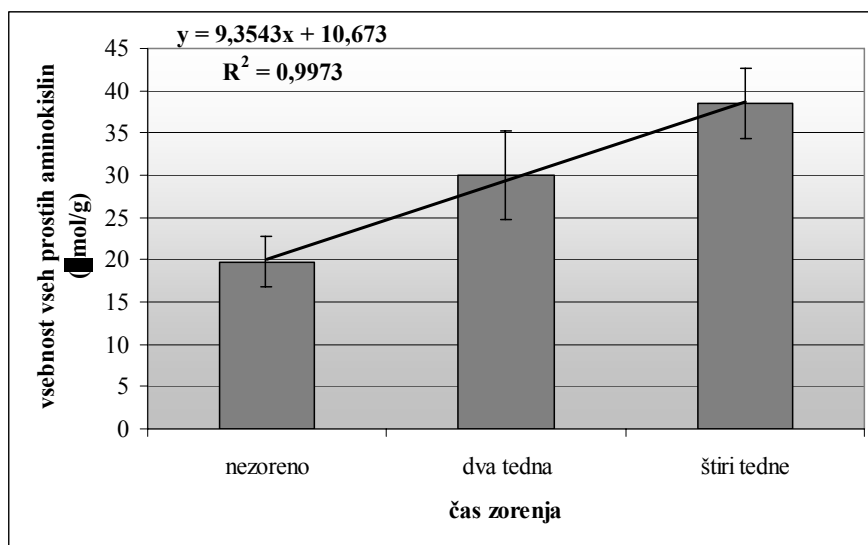
proste aminokisline	3 dni	5 dni	10 dni	14 dni
Ala	4,09	4,70	4,73	6,63
Asn	0,20	0,21	0,23	0,40
Asp	0,25	0,32	0,26	0,36
Glu	3,68	5,55	4,04	8,83
Gly	1,69	2,10	2,13	2,55
His	0,43	0,39	0,43	1,54
Hypro	0,16	0,23	0,30	0,62
Ile	0,31	0,31	0,68	0,68
Leu	0,50	0,67	1,15	1,73
Lys	0,23	0,20	0,29	0,77
Met	0,22	0,22	0,40	0,87
Pro	0,58	0,53	0,66	0,71
Ser	0,36	0,31	0,49	0,85
Thr	0,18	0,24	0,30	0,58
Val	5,10	4,21	4,34	4,82

Tudi vsebnost posameznih krajših peptidov se z zorenjem povečuje, kar je posledica delovanja endopeptidaz. V prvi stopnji delujejo kalpaini, nato pa katepsini (Fieldt in sod., 1998).

Polak (2003) je določal vsebnost prostih aminokislin presnih vzorcev presnih vzorcev govejih mišic LL z ionsko izmenjevalno tekočinsko kromatografijo. Koeficienti variabilnosti so bili v vseh primerih pod 10 %, razen pri cisteinu, kjer je bil enak 10 %. Nizke vrednosti koeficientov variabilnosti so kazali na dobro ponovljivost metode. Avtor tudi ugotavlja, da se med zorenjem ni značilno spremenila vsebnost karnozina in glutamina. Vsebnost karnozina je bila okrog 28 $\mu\text{mol/g}$ in vsebnost glutamina okrog 5,4 $\mu\text{mol/g}$ presnega mesa. Vsebnost vseh ostalih prostih aminokislin pa se je s časom zorenja statistično značilno povečevala. Tako je vsebnost prostega alanina naraščala od prvotnih 4,87 $\mu\text{mol/g}$ na končnih 7,95 $\mu\text{mol/g}$. Prostega arginina je bilo bistveno manj od alanina, na začetku 0,45 $\mu\text{mol/g}$, po dveh tednih zorenja je bilo 0,95 $\mu\text{mol/g}$ in po štirih tednih 1,25 $\mu\text{mol/g}$. Podobno vsebnost kot arginin je imel tudi asparagin. Prostega karnozina je bilo največ (27,82 $\mu\text{mol/g}$ pri nezorenem in 28,27 $\mu\text{mol/g}$ pri 4 tedne zorenem), vendar je ostal na enakem nivoju ne glede na stopnjo zorenja. Čas zorenja je vplival na povečanje vsebnosti med drugim tudi hidroksiprolina in prolina. Tako se je povečala vsebnost hidroksiprolina z začetnih 0,17 $\mu\text{mol/g}$ na 0,31 $\mu\text{mol/g}$ in prolina od 0,36 $\mu\text{mol/g}$ na 0,81 $\mu\text{mol/g}$.

Vsebnosti vseh prostih aminokislin razen glutamina so linearno naraščale s časom zorenja (slika 9), na začetku je bila vsebnost vseh prostih aminokislin 19,75 $\mu\text{mol/g}$ po dveh tednih

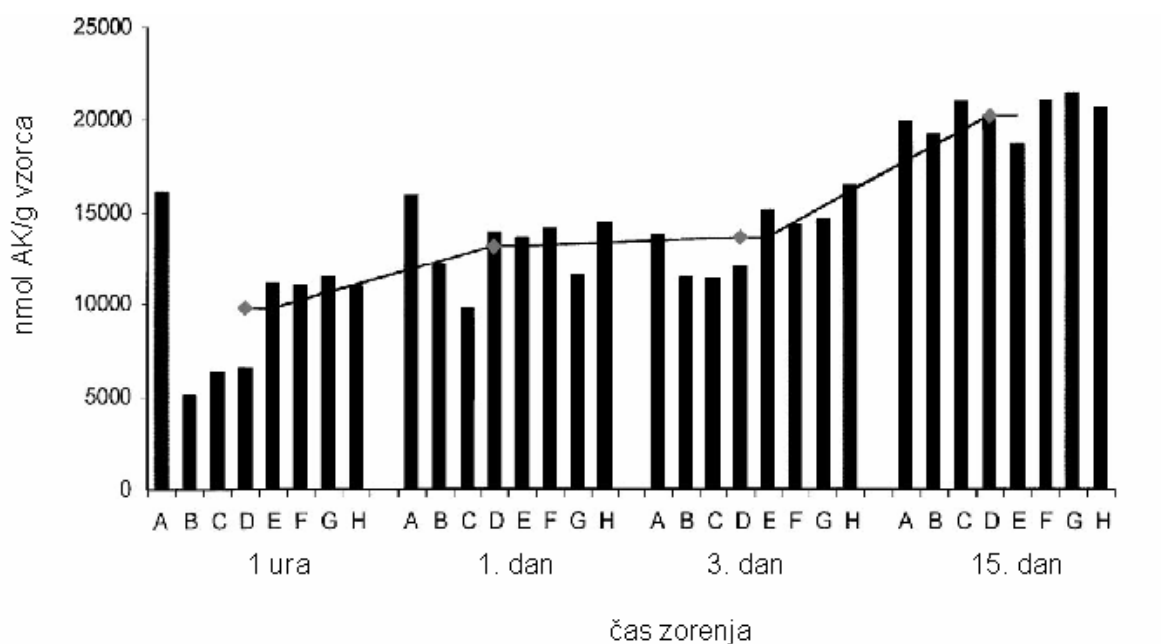
zorenja pa je narasla na 29,94 $\mu\text{mol/g}$, po štirih tednih zorenja pri 1 °C pa je dosegla 38,46 $\mu\text{mol/g}$ (Polak, 2003).



Slika 9: Vpliv časa zorenja na vsebnost vseh prostih aminokislin v presnem govejem mesu (Polak, 2003)

Mullen in sod. (2000) so spremljali vsebnost 17 prostih aminokislin med zorenjem mišice *longissimus dorsi* (slika 10), aminokisline so analizirali z aminokislinskim analizatorjem LC3000 (Eppendorf, Hamburg, Nemčija). Ugotovili so, da se vsebnost vseh prostih aminokislin v goveji mišici *longissimus dorsi* poveča tekom 15-dnevnega zorenja. Manjše spremembe v koncentraciji med zorenjem so ugotovili pri alaninu, treoninu, glutaminu in glicinu, medtem ko se je koncentracija cisteina najbolj občutno povečala. Med zorenjem so se povečale koncentracije nekaterih aminokislin za 2- do 6-krat: asparagina, fenilalanina, izolevcina, serina, prolina, arginina, valina in lizina. Za 7- do 15-krat pa so se povečale naslednje koncentracije aminokislin: metionina, tirozina in levcina.

Na splošno lahko rečemo, da se med zorenjem goveje mišice *longissimus dorsi* vsebnost večine prostih aminokislin povečuje. Koncentracija skupnih prostih aminokislin pa se med 15-dnevnim zorenjem poveča za okoli 100 % (Mullen in sod., 2000).



Slika 10: Vpliv časa zorenja na vsebnost prostih aminokislin, v osmih delih (A-H) mišice *longissimus dorsi* (Mullen in sod., 2000)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 NAMEN DELA

Namen raziskave je bil spremljati parametre kakovosti dveh govejih mišic *longissimus lumborum* (LL) in *triceps brachii* (TB) šestih živali (trije bikci in tri telice) v različnih stopnjah zrelosti (po zakolu in v treh različnih intervalih zorenja). Prav tako smo želeli določiti optimalen čas zorenja omenjenih mišic, ki bi zagotavljal primerno senzorično kakovost, in preveriti smiselnost sortiranja mesa, namenjenega za zorenje, glede na spol živali.

Želeli smo tudi ugotoviti, ali je postopek priprave vzorcev (EZ: faast podjetja Phenomenex ZDA) primeren za določanje prostih aminokislin in peptidov, ter uvesti in preveriti visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC) v kombinaciji z masnim detektorjem.

3.2 MATERIAL

Naši vzorci so bile mišice LL in TB treh telic in treh bikov lisaste pasme kakovostnega tržnega razreda R3. Tople mase trupov bikov so znašale 359 kg do 364 kg, tople mase trupov telic pa 234 kg do 284 kg. Država rojstva, reje in klanja je pri telicah Slovenija, medtem ko so bili biki rojeni na Madžarskem, vzrejeni in zaklani pa v Sloveniji. Klanje živali je potekalo v mesnopredelovalnem obratu MIP d.d. Nova Gorica. Postopki predklavnega obdobja, zakola in primarne obdelave trupov so potekali po ustaljeni tehnologiji.

Preglednica 3: Osnovni podatki o živalih

spol	datum rojstva	datum zakola	starost (mesece)	topla masa (kg)	kraj reje	pH ₂₄	T ₂₄ (°C)
bik	16. 02. 03	02. 02. 05	24	361	Vrhnika	5,71	10,8
bik	30. 04. 03	31. 01. 05	21	364	Šentjernež	5,81	13,0
bik	30. 04. 03	31. 01. 05	21	359	Šentjernež	5,50	13,6
telica	04. 03. 03	02. 02. 05	23	260	Cerkno	5,54	9,7
telica	10. 08. 02	02. 02. 05	30	234	Grgar	5,78	6,8
telica	15.03. 03	31. 01. 05	22	284	Majšperk	5,67	7,8

3.2.1 Anatomska lokacija mišic in razsek govedine

– *m. longissimus lumborum* oziroma dolga hrbtna mišica (LL)

Govejo polovico četrtinimo med 6. in 7. rebrom na prednjo in zadnjo četrt. Od zadnje četrti odrežemo zadnjo nogo med zadnjim ledvenim in prvim križnim vretencem. Preostali del zadnje četrti razsekamo na porabniške kose (hrbet, ledja, potrebušina in rebra). Ledja se odrežejo od hrbta med zadnjim prsnim in prvim ledvenim vretencem, obsegajo vsa ledvena vretenca s pripadajočo mišičnino (LL).

– *m. triceps brachii* oziroma triglava nadlahtna mišica (TB)

Govejo polovico četrtinimo med 6. in 7. rebrom na prednjo in zadnjo četrt. Od prednje četrti odrežemo po naravni mišični zvezi prednjo nogo, ki jo nato razrežemo v porabniške kose (prednji bočnik in pleče). Del plečeta je tudi debelo pleče (triglava nadlahtna mišica oziroma TB), ki je največji in najboljši kos plečeta (Fazarinc in Rajar, 2001).

3.3 NAČRT DELA

Vrednosti pH, izmerjene 24 ur *post mortem* v mišici *longissimus dorsi* med 6. in 7. prsnim vretencem so bile pri vseh poskusnih živalih v mejah od 5,5 do 5,8 (normalna kakovost mišičnine). Po hlajenju (24 ur *post mortem*) smo iz obeh polovic trupov (iz desne in leve polovice) izrezali mišice *longissimus lumborum* (LL, ledja ali šimbas, meso I. kategorije) in *triceps brachii* (TB, triglava nadlahtna mišica).

Leve in desne mišice smo razdelili na dva enaka dela in vsak del posebej vakuumsko zapakirali v termokrčljivo folijo (Cryovac) in ga zorili določeno število dni. Z naključnim izborom smo določili, kateri del mišice zori koliko časa; tako smo poskušali izločiti vpliv lokacije vzorca v mišici. Zorenje je potekalo pri stalni temperaturi 1 °C. Čas zorenja je bil 2, 7, 14 in 28 dni. Po končanem zorenju smo iz mišic odrezali zrezke debeline 3,5 cm, na katerih smo opravili instrumentalno analizo barve, po toplotni obdelavi pa izvedli senzorično analizo (barve, mehkobe, sočnosti, vonja in arome) ter instrumentalno analizo teksture. Preostale vzorce smo razrezali na drobne koščke in jih homogenizirali s pomočjo kuhinjskega sekljalnika do pastozne mase. Tako pripravljene vzorce smo zapakirali v polietilenske vrečke, jih tesno zaprli, ustrezno označili in shranili v zamrzovalno skrinjo pri $(-21 \pm 1) ^\circ\text{C}$, kjer so počakali na osnovno kemijsko analizo (voda, maščobe, pepel, beljakovine), merjenje vrednosti pH v ekstraktu ter določanje vsebnosti prostih aminokislin in peptidov. Vse analize smo opravili v dveh paralelnih določitvah. Osnovno kemijsko analizo smo opravili samo na vzorcih 2 dni po zakolu (nezoreni).

Toplotna obdelava vzorcev za senzorično analizo in instrumentalno analizo mehkobe je bila opravljena na zrezkih debeline 3,5 cm s pečenjem na dvoploščnem žaru (temperatura plošč 200 °C) do končne središčne temperature zrezkov 60 °C.

Rezultate smo statistično iz vrednotili in skušali ugotoviti vpliv zorenja na analizirane kakovostne parametre, na vsebnost prostih aminokislin in peptidov v govejih mišicah (LL in TB) šestih živali (tri je bikci in tri telice).

3.4 METODE DELA

3.4.1 Instrumentalna analiza

3.4.1.1 Barva

Na nezorenih in zorenih presnih rezinah vzorcev mišic smo instrumentalno izmerili barvo v sistemu CIE L^* , a^* , b^* s kromometrom Minolta CR 200b. Kromometer je bil predhodno umerjen na bel standard. Barvo smo merili v treh paralelkah na 3 cm debeli oksigenirani rezini (oksigenacija 1 uro v hladilniku pri temperaturi 3 °C).

3.4.1.2 Tekstura

Zrezke smo po toplotni obdelavi ohladili in po 24 urah oblikovali vzorce za instrumentalno merjenje reoloških lastnosti.

Instrumentalna analiza rezne trdnosti toplotno obdelanih vzorcev je bila opravljena z aparatom za mehanično testiranje TA.TX plus texture analyser (Stable Micro Systems) s kontaktnim nastavkom Warner Bratzler HDP/WBV. Hitrost rezila je znašala 0,0033 m/s; meritve so bile opravljene na vzorcih v obliki valjev premera 8 mm. Izmerjena je bila rezna trdnost, maksimalna sila, potrebna za prerez vzorca, podana v enotah Newton (N). Na vsaki mišici so bile opravljene 4 meritve.

3.4.2 Senzorična analiza

Senzorično ocenjevanje je opravil tri članski panel, ki so ga sestavljali izkušeni preiskuševalci katedre za tehnologijo mesa na Biotehniški fakulteti. Ocenjevanje so opravili v senzoričnem laboratoriju te katedre.

Senzorično ocenjevanje so izvedli s testom točkovanja lastnosti iz skupine deskriptivnih testov in to z nestrukturirano točkovno lestvico (od 1 do 7 točk).

Senzorično ocenjevanje pečenih vzorcev LL in TB je potekalo na toplih vzorcih, ki so bili šifrirani. Panel je izvednotil naslednje senzorične lastnosti:

– barva mesa (1 – 7 točk)

Barva presnih vzorcev je bila senzorično izvednotena na 3 cm debeli oksigenirani rezini (oksigenacija 1 uro v hladilniku pri temperaturi 3 °C).

7 točk: atraktivna svetlo rdeča barva oksigenirane površine mišičnine,

1 točka: neoksigenirana, temna barva.

– mehkoba (1 – 4 – 7 točk)

Ocenjena kot upor mesa na žvečenje.

7 točk: mehka tekstura,

4 točke: optimalna tekstura,

1 točka: trda tekstura.

– sočnost (1 – 7 točk)

Ocenjena je kot količina izcejenega soka med grizenjem vzorca v ustih.

7 točk: sočnost je odlično izražena,

1 točka: suhost, slaba sočnost.

– vonj (1 – 7 točk)

Vonj ocenjujemo z nosom, ko do njega dospejo hlapne snovi.

7 točk: polno izrazit vonj zrelega govejega mesa,

1 točka: neizrazit vonj, nezaželen vonj.

– aroma (1 – 7 točk)

Če meso položimo v usta in ga žvečimo, poteka sočasno več procesov, ki se kombinirajo v kompleksno zaznavo, imenovano aroma.

7 točk: polno izrazita aroma zrelega govejega mesa,

1 točka: neizrazita, prazna aroma.

3.4.3 Fizikalno-kemijske analize

3.4.3.1 Določanje vsebnosti skupnih mineralnih snovi

Po uradnem postopku opisanem v AOAC Official Method 920.153 Ash of Meat (AOAC 920.153, 1997).

3.4.3.2 Določanje vsebnosti vode s sušenjem

Po uradnem postopku opisanem v AOAC Official Method 950.46 Moisture in Meat (AOAC, 950.46, 1997).

3.4.3.3 Določanje vsebnosti maščobe po Weibullu in Stoldt

Po uradnem postopku opisanem v AOAC Official Method 991.36 Fat (Crude) in Meat and Meat Product (AOAC, 991.36, 1997).

3.4.3.4 Določanje vsebnosti beljakovin

Po uradnem postopku opisanem v AOAC Official Method 928.08 Nitrogen in Meat Kjeldahl Method (AOAC, 928.08, 1997).

3.4.3.5 Merjenje vrednosti pH v ekstraktu

Za merjenje vrednosti pH vzorcev v ekstraktu smo uporabljali stekleno gelsko elektrodo Sartorius PY-P10, priključeno na pH meter (Sartorius PB-20). Natančnost merjenja je

$\pm 0,01$ enote. Pred merjenjem smo pH meter umerili s pufri za umerjanje (pH 4,01, 5,00 in 7,01).

Pribor in reagenti:

- pH meter;
- lij, čaša;
- pufri za umerjanje pH metra ;
- destilirana voda.

Postopek:

5 g zmletega, homogeniziranega vzorca brez večjih delov mastnega in veznega tkiva smo prenesli v čašo in prelili s 50 ml destilirane vode. Vzorec smo nato 10 min mešali z magnetnim mešalom, nato pa ga filtrirali. V filtratu smo nato zmerili pH, tako da smo elektrodo potopili v filtrat in odčitali pH vrednost.

3.4.3.6 Določanje vsebnosti prostih aminokislin

Vsebnost prostih aminokislin v presnem zorenem mesu smo določili z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC) v kombinaciji z masnim detektorjem. Vzorce in standarde smo pred analizo z HPLC pripravili z kompletom EZ: faast For Free Physiological Amino Acid Analysis by LC – MS (Phenomenex, ZDA).

3.4.3.6.1 Priprava vzorcev

V časo smo odtehtali ($3 \pm 0,001$) g homogeniziranega mesa, dodali 30 ml destilirane vode in 200 μ l internega standarda (L-norlevcin, $c = 10$ mg/ml). Vse skupaj smo, nato homogenizirali z homogenizatorjem (Ultra-turrax T25 z nastavkom S25N-18G, 10000 obratov/min). Sledila je filtracija z modrim celulozno acetatnim filtrom Sartorius 391 ($\Phi = 110$ mm). Vzorci so tako bili pripravljeni za postopek EZ: faast.

Postopek priprave vzorcev (EZ: faast podjetja Phenomenex, ZDA) za analizo z HPLC je sestavljen iz več faz:

1. V 2 ml vialo smo dali 100 μ l vzorca in 100 μ l internega standarda s pH 2 (reagent 1).
2. Nato smo počasi povlekli tako pripravljeno zmes skozi tips, ki ima nameščen sorbent (poteče ekstrakcija s trdo fazo (SPE)).
3. SPE tips smo spirali z 200 μ l n-propanola kot spiralnim topilom (reagent 2).
4. Na SPE tipsu smo imeli aminokislino, ki smo jih sprali z 200 μ l topila za spiranje (n-propanol (reagent 3A) : NaOH (reagent 3B) = 3:2).
5. V eluat smo dodali 50 μ l derivatizacijskega reagenta v kloroformu (reagent 4).
6. Močno smo premešali na vortexu 5 s in pustili 1 min.
7. Dodali smo 100 μ l iso-oktana (reagent 5) in vse skupaj premešali in pustili stati 1 min.
8. Zgornjo organsko fazo smo prenesli v vijale in odparili topilo.
9. Nato smo dodali 100 μ l mobilne faze (A : B = 1 : 2) in tako so bili vzorci pripravljeni za analizo na LC-MS.

Priprava standardov

Paket EZ: faast vsebuje tri stekleničke standardov SD1, SD2 in SD3. SD1 vsebuje 27 aminokislin (glej preglednico 4) v 0,05 M HCl, koncentracija vsake je 200 nmol/ml. SD2 vsebuje 3 aminokislino (ASN, GLN, TRP), ki pa niso v kislem mediju, koncentracija vsake je 200 nmol/ml. SD3 vsebuje 6 aminokislin (APA, HYL, CTH, PHP, GPR, TPR) koncentracija vsake je 200 nmol/ml.

Preglednica 4: SD1 v 0,05 M HCL vsebuje naslednjih 27 aminokislin:

AAA	ABA	ALA	ARG	ASP	BAIB	C-C	CIT	GABA
LEU	LYS	MET	1MHIS	3MHIS	ORN	PHE	PRO	SAR
GLU	GLY	HIS	HYP	ILE	SER	THR	TYR	VAL

Za kalibriranje smo pripravili tri različne koncentracije teh standardov:

Koncentracija 1: 10 µl SD1 + 10 µl SD2 + 10 µl SD3 + 100 µl IS

Koncentracija 2: 50 µl SD1 + 50 µl SD2 + 50 µl SD3 + 100 µl IS

Koncentracija 3: 100 µl SD1 + 100 µl SD2 + 100 µl SD3 + 100 µl IS

Postopek priprave standardov (EZ: faast podjetja Phenomenex, ZDA) za analizo z HPLC je sestavljen iz več faz:

1. V 2 ml vialo smo dali 100 µl standardov koncentracije 1 ali 2 ali 3 in 100 µl internega standarda s pH 2 (reagent 1).
2. Nato smo počasi povlekli tako pripravljeno zmes skozi tips, ki ima nameščen sorbent (poteče ekstrakcija s trdo fazo (SPE)).
3. SPE tips smo spirali z 200 µl n-propanola kot spiralnim topilom (reagent 2).
4. Na SPE tipsu smo imeli amino kisline, ki smo jih sprali z 200 µl topila za spiranje (n-propanol (reagent 3A) : NaOH (reagent 3B) = 3 : 2).
5. V eluat smo dodali 50 µl derivatizacijskega reagenta v kloroformu (reagent 4).
6. Močno smo premešali na vortexu 5 s in pustili 1 min.
7. Dodali smo 100 µl iso-oktana (reagent 5) in vse skupaj premešali in pustili stati 1 min.
8. Zgornjo organsko fazo smo prenesli v vijale in odparili topilo.
9. Nato smo dodali 100 µl mobilne faze (A : B = 1 : 2) in tako so bili standardi pripravljeni za umerjanje LC-MS.

3.4.3.6.2 Kromatografski pogoji

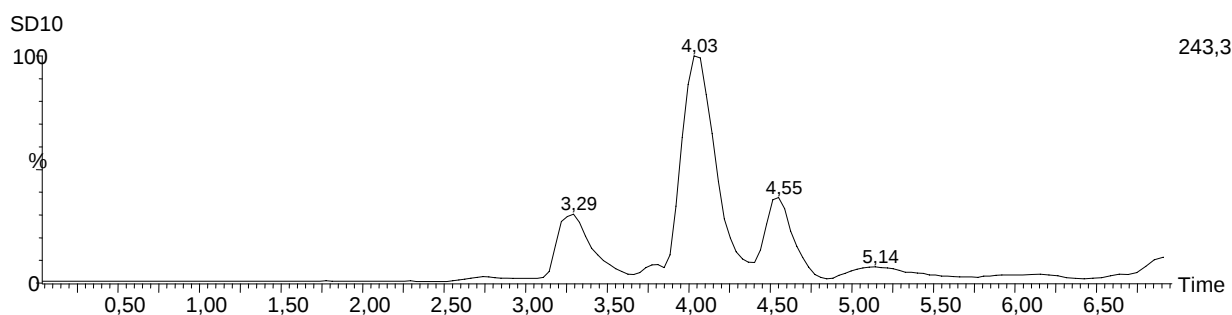
Oprema:

Sistem: Agilent 1100
Detektor: Micromass quatro micro™ API
Kolona: ID 250 x 2 mm

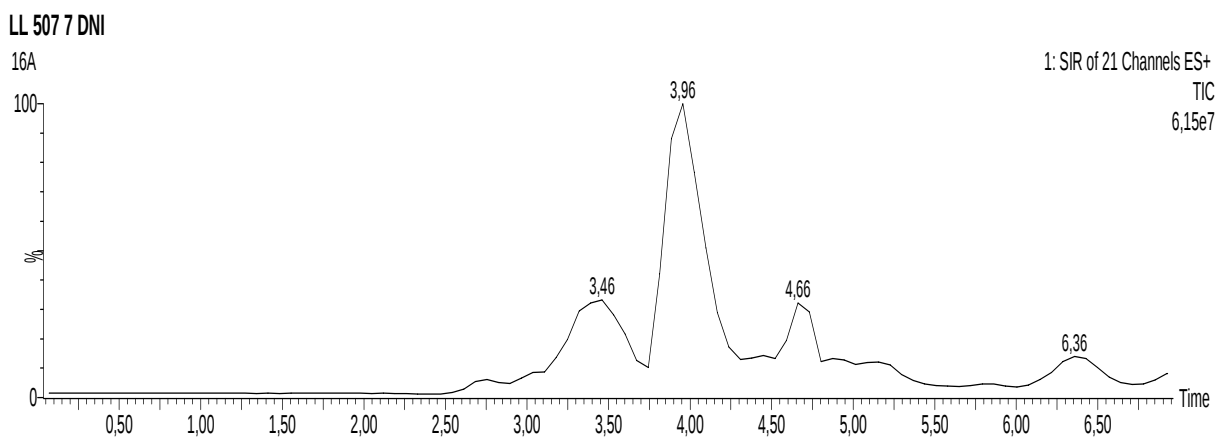
Delovni pogoji in reagenti:

Mobilna faza: mobilna faza A: 10 mM amonijev formiat v vodi
mobilna faza B: 10 mM amonijev formiat v metanolu
Gradient: 00,00 min 68 % B
11,00 min 83 % B
11,01 min 68 % B

13,00 min 68 % B
Pretok mobilne faze: 0,25 ml/min
Temperatura kolone: 35 °C
Volumen injiciranja: 5,0 µl



Slika 11: Kromatogram proste aminokisline asparagin (molska masa: 243 g/mol, elucijski čas: 4,03 minut) iz standardne mešanice aminokislin SD1



Slika 12: Kromatogram proste aminokisline asparagin (molska masa: 243 g/mol, elucijski čas: 3,96 minut) iz 7 dni zorenega vzorca mišice LL

3.4.3.6.3 Izračun

Koncentracijo aminokislin v vzorcu smo izračunali iz razmerja površin vrha aminokisline v vzorcu in internem standardu, L-norlevcin (Merck, 1.24560).

$$c \cdot (\mu\text{mol} / \text{g}) = \frac{A \times m_{is}}{A_{is} \times M \times m_{vz}}$$

c = koncentracija aminokisline v vzorcu
A = površina vrha aminokisline v vzorcu
m_{is} = masa dodanega internega standarda
A_{is} = površina vrha standarda v vzorcu
M = molska masa aminokisline
m_{vz} = masa vzorca

3.4.4 Statistična analiza

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS Software, Version 8.01, 1999). V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Osnovne statistične parametre smo izračunali s proceduro MEANS, s proceduro UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve. Pri obdelavi podatkov smo uporabili multivariantno metodo GLM (General Linear Model).

Statistični model 1 smo uporabili za obdelavo parametrov zorenih govejih mišic. V model smo vključili vpliv mišic, časa zorenja, spola in živali. Vsi podatki so predstavljeni kot ocenjene srednje vrednosti (LS-mean).

Statistični model 1:

$$y_{ijkl} = \mu + M_i + C_j + S_k + Z_l + e_{ijkl} \quad (\text{model 1})$$

y_{ijkl} = opazovana vrednost;
μ = povprečna vrednost;
M_i = vpliv i-te mišice; i = *longissimus lumborum* in *triceps brachii*;
C_j = vpliv j-tega časa zorenja; j = 2, 7, 14 in 28 dni;
S_k = vpliv k-tega spola živali; k = bik, telica;
Z_l = vpliv l-te živali; k=1-3;
e_{ijkl} = ostanek.

Pearsonovi korelacijski koeficienti med parametri zorenega mesa so izračunani z uporabo procedure CORR (SAS Software, Version 8.01, 1999).

4 REZULTATI

4.1 OSNOVNA KEMIJSKA SESTAVA

4.1.1 Ponovljivost metod

Ponovljivost med paralelkami smo določili tako, da smo vsebnost vode, maščob, beljakovin in pepela na istem, naključno izbranem vzorcu analizirali v šestih paralelkah (preglednica 5). Ponovljivost smo ovrednotili z določitvijo koeficienta variabilnosti (KV).

Preglednica 5: Ponovljivost med paralelkami pri določanju vsebnosti vode, maščob, beljakovin in pepela v presni goveji mišici LL

parameter (g/100 g)	paralelka						statistična parametra	
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	$\bar{x}$	KV (%)
beljakovine	22,83	23,48	23,13	23,64	23,55	23,80	23,52	1,0
maščobe	1,72	1,79	1,59	1,74	1,67	1,63	1,69	4,4
pepel	1,10	1,11	1,10	1,13	1,17	1,13	1,12	2,3
voda	73,92	74,64	73,48	74,09	75,24	73,97	74,22	0,8

$\bar{x}$ – povprečna vrednost, KV (%) – koeficient variabilnosti

Koeficienti variabilnosti niso presegali 5 %, zato smo se odločili, da je za nadaljnje analize dovolj delo v dveh paralelkah.

4.1.2 Osnovni statistični parametri

Rezultati analiz osnovne kemijske sestave (vode, maščob, beljakovin in pepela) so prikazani v preglednici 6. Iz teh rezultatov lahko ugotovimo, da smo izbrali homogen vzorec, saj so koeficienti variabilnosti nizki, višji so le pri maščobah. Tako je bila v goveji mišici LL povprečna vsebnost beljakovin 22,5 g/100 g, maščob 2,6 g/100 g, pepela 1,2 g/100 g in vode 73,9 g/100 g. Goveja mišica TB pa je v povprečju vsebovala beljakovin 22,1 g/100 g, maščob 2,9 g/100 g, pepela 1,3 g/100 g in vode 73,3 g/100 g.

Preglednica 6: Rezultati kemijske analize govejih mišic LL in TB z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

mišica	parameter (g/100 g)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
LL	beljakovine	6	22,52	21,91	23,26	0,54	2,41
	maščobe	6	2,64	2,26	3,35	0,47	17,67
	pepel	6	1,15	1,03	1,27	0,08	7,09
	voda	6	73,89	73,01	74,82	0,73	0,98
TB	beljakovine	6	22,09	21,27	23,16	0,64	2,92
	maščobe	6	2,87	1,78	3,51	0,82	28,55
	pepel	6	1,28	1,17	1,38	0,07	5,70
	voda	6	73,34	72,81	74,04	0,53	0,72

n – število obravnavanj, $\bar{x}$ – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti.

4.1.3 Vpliv mišice na kemijsko sestavo govedine

Vrsta mišice ima statistično zelo visoko značilen vpliv na vsebnost vode, na vsebnost maščob ima statistično visoko značilen vpliv, na vsebnost pepela in beljakovin pa vrsta mišice ne vpliva (preglednica 7). Goveje mišice TB vsebujejo značilno več vode in maščob kot mišice LL.

Preglednica 7: Vpliv mišice na kemijsko sestavo govedine (n=12)

parameter (g/100 g)	mišica (LSM)			
	LL	TB	SEM	znač.
voda	73,6 ^b	74,8 ^a	0,20	0,0026
pepel	1,21 ^a	1,24 ^a	0,03	0,4572
maščoba	2,76 ^b	3,25 ^a	0,16	0,0400
beljakovine	22,3 ^a	22,2 ^a	0,10	0,5128

n – število vzorcev; LSM – ocenjena srednja vrednost; SEM – standardna napaka ocene; znač.: $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

4.1.4 Vpliv spola živali na kemijsko sestavo govedine

Preglednica 8: Vpliv spola živali na kemijsko sestavo govedine (n=12)

parameter (g/100 g)	spol (LSM)			
	biki	telice	SEM	znač.
voda	74,7 ^a	73,7 ^b	0,20	0,0051
pepel	1,16 ^b	1,29 ^a	0,03	0,0023
maščoba	2,71 ^b	3,30 ^a	0,16	0,0166
beljakovine	22,4 ^a	22,1 ^a	0,10	0,0658

n – število vzorcev; LSM – ocenjena srednja vrednost; SEM – standardna napaka ocene; znač.: $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilna razlika; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilna razlika; $P \leq 0,05$ statistično značilna razlika; $P > 0,05$ statistično neznačilna razlika; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

Spol (preglednica 8) statistično zelo visoko značilno vpliva na vsebnost vode in pepela v mesu, na vsebnost maščob vpliva statistično visoko značilno, na vsebnost beljakovin pa spol ne vpliva. Torej, meso telic v primerjavi z mesom bikov vsebuje več pepela in maščob, posledično pa vsebuje manj vode in beljakovin.

4.2 VREDNOST pH IN VSEBNOST PROSTIH AMINOKISLIN

4.2.1 Ponovljivost metod

4.2.1.1 Vsebnost prostih aminokislin

Naključno izbran presen in nezoren vzorec smo šestkrat analizirali ter ugotovili, da se koeficienti variabilnosti gibajo od 0,5 % pri izolevcinu pa do 31,7 % pri γ -amino-n-butrični kislini (preglednica 9). Na osnovi rezultatov določanja ponovljivosti med paralelkami, lahko zaključimo, da je priprava vzorcev s kompletom EZ: faast For Free Physiological Amino Acid Analysis by LC – MS (Phenomenex, ZDA) primerna za določanje vsebnosti

prostih aminokislin in peptidov zorjenega mesa. Ponovljivost je bila slabša pri prostih aminokislinah in peptidih, ki so bili prisotni v vzorcu v majhnih količinah (do 10 nmol/g vzorca).

Preglednica 9: Ponovljivost med paralelkami določanja vsebnosti prostih aminokislin in peptidov v presni goveji mišici LL ($\mu\text{mol AK/g}$ vzorca)

aminokislina ali peptid ($\mu\text{mol/g}$)	paralelka						statistična parametra	
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	$\bar{x}$	KV (%)
MHIS	0,46	0,35	0,37	0,45	0,41	0,40	0,41	10,05
HYP	0,08	0,09	0,08	0,10	0,09	0,07	0,09	12,29
ASN	0,54	0,56	0,53	0,57	0,55	0,53	0,55	3,00
SER	0,24	0,24	0,23	0,22	0,23	0,25	0,24	4,55
CIT	0,35	0,26	0,28	0,34	0,26	0,28	0,29	13,31
GLN	5,01	5,33	5,31	5,09	5,26	5,23	5,20	2,45
ARG	1,26	1,01	1,10	1,15	1,07	1,25	1,14	8,82
HYL	0,03	0,04	0,05	0,03	0,04	0,03	0,04	22,68
PHP	0,24	0,30	0,23	0,29	0,31	0,24	0,27	13,37
MET	0,15	0,08	0,08	0,12	0,10	0,09	0,10	25,91
ORN	0,21	0,22	0,21	0,23	0,21	0,24	0,22	5,77
GABA	0,02	0,02	0,03	0,04	0,02	0,03	0,03	31,67
ALA	2,03	2,12	2,09	2,10	2,12	2,11	2,10	1,65
THR	0,05	0,04	0,04	0,03	0,02	0,02	0,04	37,64
GPR	0,10	0,08	0,08	0,09	0,10	0,09	0,09	11,90
GLY	0,07	0,07	0,08	0,07	0,06	0,08	0,07	10,73
TRP	0,29	0,27	0,26	0,27	0,28	0,29	0,28	4,48
GLU	1,38	0,87	1,28	1,34	1,21	0,95	1,17	17,98
VAL	0,41	0,28	0,34	0,36	0,29	0,40	0,35	15,52
TPR	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,04	0,03	31,20
HIS	9,98	9,59	9,67	9,85	9,75	9,81	9,78	1,40
ASP	0,31	0,22	0,25	0,27	0,22	0,30	0,26	14,50
LYS	3,88	3,24	3,56	3,48	3,75	3,65	3,59	6,14
PRO	0,64	0,68	0,64	0,65	0,68	0,65	0,66	3,10
TYR	6,25	6,02	6,25	6,09	6,15	6,17	6,15	1,45
C-C	0,22	0,17	0,17	0,22	0,19	0,18	0,19	13,11
PHE	0,90	0,84	0,85	0,84	0,89	0,90	0,87	3,35
LEU	0,94	0,80	0,81	0,85	0,91	0,94	0,88	7,25
ILE	5,33	5,39	5,34	5,38	5,37	5,39	5,37	0,50
AAA	0,09	0,06	0,08	0,06	0,09	0,07	0,08	17,99

$\bar{x}$ - povprečna vrednost, KV (%) - koeficient variabilnosti

4.2.2 Osnovni statistični parametri

Rezultati meritev fizikalnih in kemijskih parametrov zorenih govejih mišic LL in TB z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri so prikazani v preglednici 10.

Preglednica 10: Rezultati meritev fizikalnih in kemijskih parametrov zorenih govejih mišic LL in TB z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

parameter		n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
vrednost pH		96	5,75	5,37	6,33	0,19	3,37
aminokislina ($\mu\text{mol/g}$):							
ALA	alanin	96	2,90	1,08	25,03	2,44	84,01
ARG	arginin	96	1,98	0,18	5,80	1,32	66,38
ASN	asparagin	96	0,49	0,21	1,04	0,16	32,53
ASP	asparaginska kislina	96	0,42	0,17	1,05	0,16	39,24
C-C	cistin	96	0,43	0,02	1,30	0,28	64,69
GLN	glutamin	96	4,91	1,26	11,92	2,33	47,52
GLU	glutaminska kislina	96	2,40	0,49	11,02	1,51	62,66
GLY	glicin	96	0,12	0,04	0,25	0,04	37,55
HIS	histidin	96	18,31	9,59	29,47	5,30	28,93
HYP	4-hidroksiprolin	96	0,13	0,04	0,25	0,05	42,06
ILE	izolevcin	96	6,75	0,00	12,54	2,07	30,71
LEU	levcin	96	1,85	0,60	4,34	0,87	46,90
LYS	lizin	96	5,76	2,55	9,93	1,85	32,05
MET	metionin	96	0,27	0,04	0,60	0,13	46,48
PHE	fenilalanin	96	1,67	0,22	6,03	0,91	54,86
PRO	prolin	96	1,08	0,33	2,36	0,40	37,41
SER	serin	96	0,57	0,15	2,18	0,32	56,24
THR	treonin	96	0,12	0,03	0,26	0,05	40,52
TRP	triptofan	96	0,60	0,16	1,42	0,27	44,44
TYR	tirozin	96	10,74	0,11	21,80	4,80	44,69
VAL	valin	96	0,72	0,05	1,70	0,35	48,79
skupne proste AK		96	56,31	3,34	96,16	24,57	43,64
peptidi ($\mu\text{mol/g}$):							
AAA	α -aminoadipinska kislina	96	0,15	0,03	0,68	0,12	82,78
CIT	citrulin (dipeptid)	96	0,36	0,09	2,18	0,25	68,47
GABA	γ -amino-n-butrična kislina	96	0,05	0,01	0,23	0,05	87,03
GPR	glicin-prolin (dipeptid)	96	0,17	0,05	1,64	0,17	99,87
HLY	γ -Hidroksilizin	96	0,05	0,01	0,15	0,03	55,38
MHIS	Metil-histidin	96	0,47	0,05	1,26	0,22	46,84
ORN	ornitin (dipeptid)	96	0,43	0,05	1,61	0,27	62,20
PHP	prolin-hidroksiprolin (dipeptid)	96	0,65	0,13	2,80	0,57	87,38
TPR	tiaprolin	96	0,02	0,01	0,06	0,01	52,93

n – število obravnavanj; $\bar{x}$ – povprečna vrednost; min – minimalna vrednost; max – maksimalna vrednost; so – standardni odklon; KV (%) – koeficient variabilnosti.

4.2.3 Vpliv mišice

Preglednica 11: Vpliv mišice na vrednost pH in vsebnost prostih aminokislin v zoreni govedini (n=48)

parameter	mišica		SEM	značilnost vpliva (P-vrednost)
	LL	TB		
vrednost pH	5,76 ^a	5,74 ^a	0,02	0,4749
aminokislina (μmol/g):				
ALA	2,97 ^a	2,83 ^a	0,34	0,7704
ARG	1,92 ^a	2,05 ^a	0,13	0,4929
ASN	0,47 ^b	0,52 ^a	0,02	0,0210
ASP	0,43 ^a	0,40 ^a	0,02	0,2702
C-C	0,44 ^a	0,43 ^a	0,03	0,7382
GLN	4,67 ^a	5,14 ^a	0,26	0,2042
GLU	2,37 ^a	2,44 ^a	0,18	0,7813
GLY	0,12 ^a	0,12 ^a	0,01	0,8649
HIS	17,20 ^b	19,41 ^a	0,41	0,0003
HYP	0,13 ^a	0,13 ^a	0,01	0,6258
ILE	6,46 ^a	7,04 ^a	0,23	0,0735
LEU	1,94 ^a	1,75 ^a	0,07	0,0584
LYS	5,99 ^a	5,53 ^a	0,19	0,0886
MET	0,27 ^a	0,27 ^a	0,01	0,7075
PHE	1,71 ^a	1,62 ^a	0,09	0,4648
PRO	1,04 ^a	1,12 ^a	0,05	0,2827
SER	0,61 ^a	0,54 ^a	0,04	0,2152
THR	0,12 ^a	0,12 ^a	0,01	0,6231
TRP	0,61 ^a	0,60 ^a	0,02	0,8096
TYR	11,15 ^a	10,33 ^a	0,38	0,1262
VAL	0,79 ^a	0,65 ^b	0,04	0,0087
skupne proste AK	60,2 ^a	52,4 ^b	2,00	0,0485
peptidi (μmol/g):				
AAA	0,18 ^a	0,12 ^b	0,01	0,0002
CIT	0,40 ^a	0,32 ^a	0,03	0,0542
GABA	0,07 ^a	0,03 ^b	0,00	<0,0001
GPR	0,17 ^a	0,16 ^a	0,02	0,833
HLY	0,06 ^a	0,04 ^b	0,00	<0,0001
MHIS	0,48 ^a	0,46 ^a	0,02	0,4472
ORN	0,36 ^b	0,51 ^a	0,03	0,0018
PHP	0,86 ^a	0,45 ^b	0,04	<0,0001
TPR	0,02 ^a	0,02 ^b	0,00	<0,0001

n – število vzorcev; SEM – standardna napaka ocene; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

Vrsta mišice (LL ali TB) na pH vrednost zorenega mesa ne vpliva značilno (preglednica 11). Na vsebnost histidina ima vrsta mišice statistično zelo visoko značilen, na vsebnost valina statistično visoko značilen ter na vsebnost asparagina statistično značilen vpliv.

Mišica LL je vsebovala manj histidina in asparagina toda več valina v primerjavi z mišico TB. Na vsebnost vseh ostalih prostih aminokislin vrsta mišice ne vpliva značilno.

Na vsebnost peptidov, citrulina, glicin-prolina in metil-histidina vrsta mišice ne vpliva značilno, na ostale pa vpliva statistično zelo visoko značilno. Zorena mišica LL v primerjavi s zoreno mišico TB vsebuje več dipeptidov, izjema je le ornitin.

4.2.4 Vpliv spola

Spol živali ima na vrednost pH zorenega mesa statistično zelo visoko značilen vpliv. Zoreno meso telic ima večjo vrednost pH kot zoreno meso bikov (preglednica 12). Na vsebnost prostih aminokislin in peptidov (arginin, asparagin, glutamin, glutaminsko kislino, 4-hidroksiprolin, citrulin in γ -amino-n-butrično kislino) v zorenem mesu spol živali vpliva statistično zelo visoko značilno. Na vsebnost ornitina spol vpliva statistično visoko značilno, medtem ko na vse ostale proste aminokisline in peptide ne vpliva.

Preglednica 12: Vpliv spola živali na vrednost pH in vsebnost prostih aminokislin v zoreni govedini (n=48)

parameter	spol		SEM	značilnost vpliva (P-vrednost)
	biki	telice		
vrednost pH	5,71 ^b	5,79 ^a	0,02	0,0004
aminokislina (μmol/g):				
ALA	2,81 ^a	2,99 ^a	0,34	0,6983
ARG	2,27 ^a	1,70 ^b	0,13	0,0018
ASN	0,58 ^a	0,40 ^b	0,02	<0,0001
ASP	0,43 ^a	0,41 ^a	0,02	0,2947
C-C	0,41 ^a	0,45 ^a	0,03	0,3053
GLN	6,10 ^a	3,71 ^b	0,26	<0,0001
GLU	2,79 ^a	2,02 ^b	0,18	0,0030
GLY	0,12 ^a	0,11 ^a	0,01	0,0993
HIS	18,3 ^a	18,31 ^a	0,41	0,9939
HYP	0,14 ^a	0,11 ^b	0,01	0,0008
ILE	7,0 ^a	6,5 ^a	0,23	0,1214
LEU	1,87 ^a	1,82 ^a	0,07	0,5726
LYS	5,70 ^a	5,81 ^a	0,19	0,6798
MET	0,25 ^a	0,29 ^a	0,01	0,0637
PHE	1,75 ^a	1,59 ^a	0,09	0,2062
PRO	1,14 ^a	1,03 ^a	0,05	0,1018
SER	0,55 ^a	0,60 ^a	0,04	0,3231
THR	0,12 ^a	0,12 ^a	0,01	0,7474
TRP	0,60 ^a	0,61 ^a	0,02	0,8154
TYR	10,77 ^a	10,71 ^a	0,38	0,923
VAL	0,71 ^a	0,73 ^a	0,04	0,6878
skupne proste AK	57,2 ^a	55,4 ^a	2,70	0,649
peptidi (μmol/g):				
AAA	0,15 ^a	0,15 ^a	0,01	0,7265
CIT	0,31 ^b	0,41 ^a	0,03	0,0394
GABA	0,06 ^a	0,04 ^b	0,00	0,0033
GPR	0,17 ^a	0,16 ^a	0,02	0,6403
HLY	0,05 ^a	0,05 ^a	0,00	0,6247
MHIS	0,56 ^a	0,38 ^b	0,02	<0,0001
ORN	0,49 ^a	0,38 ^b	0,03	0,0162
PHP	0,64 ^a	0,67 ^a	0,04	0,5986
TPR	0,02 ^a	0,02 ^a	0,00	0,2383

n – število vzorcev; SEM – standardna napaka ocene; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

4.2.5 Vpliv časa zorenja

Preglednica 13: Vpliv časa zorenja na vrednost pH in vsebnost prostih aminokislin v goveji mišici LL (n=24)

parameter	zorenje (dni)				SEM	značilnost vpliva (P-vrednost)
	2	7	14	28		
vrednost pH	5,67 ^b	5,78 ^{ab}	5,87 ^a	5,72 ^b	0,03	0,0063
aminokislina (μmol/g):						
ALA	1,62 ^b	2,63 ^{ab}	2,87 ^{ab}	4,76 ^a	0,68	<0,0001
ARG	0,81 ^c	1,13 ^c	2,21 ^b	3,54 ^a	0,25	<0,0001
ASN	0,39 ^b	0,41 ^b	0,54 ^a	0,52 ^a	0,03	0,0115
ASP	0,25 ^c	0,33 ^c	0,48 ^b	0,66 ^a	0,03	<0,0001
C-C	0,19 ^c	0,28 ^c	0,55 ^b	0,74 ^a	0,05	<0,0001
GLN	4,14 ^a	4,53 ^a	4,94 ^a	5,08 ^a	0,52	0,6728
GLU	1,51 ^c	1,65 ^c	2,83 ^b	3,49 ^a	0,36	<0,0001
GLY	0,11 ^a	0,12 ^a	0,13 ^a	0,12 ^a	0,01	0,5469
HIS	12,59 ^d	15,21 ^c	18,78 ^b	22,22 ^a	0,83	<0,0001
HYP	0,09 ^c	0,11 ^{bc}	0,12 ^b	0,18 ^a	0,01	<0,0001
ILE	5,08 ^b	5,67 ^b	6,80 ^a	8,29 ^a	0,46	0,0022
LEU	1,26 ^c	1,29 ^c	2,20 ^b	3,03 ^a	0,14	<0,0001
LYS	4,82 ^c	4,80 ^c	6,21 ^b	8,12 ^a	0,38	<0,0001
MET	0,15 ^c	0,20 ^c	0,30 ^b	0,42 ^a	0,02	<0,0001
PHE	1,14 ^c	1,28 ^c	1,70 ^b	2,74 ^a	0,17	<0,0001
PRO	0,81 ^b	0,82 ^b	1,23 ^a	1,32 ^a	0,10	0,0007
SER	0,34 ^c	0,39 ^{bc}	0,63 ^b	1,06 ^a	0,07	<0,0001
THR	0,08 ^b	0,10 ^b	0,14 ^a	0,14 ^a	0,01	<0,0001
TRP	0,37 ^c	0,46 ^c	0,61 ^b	0,98 ^a	0,05	<0,0001
TYR	6,41 ^c	7,72 ^c	12,68 ^b	17,81 ^a	0,76	<0,0001
VAL	0,54 ^c	0,51 ^c	0,93 ^b	1,17 ^a	0,07	<0,0001
skupne proste AK	40,5 ^c	46,7 ^c	67,0 ^b	86,5 ^a	5,5	<0,0001
peptidi (μmol/g):						
AAA	0,08 ^c	0,12 ^{bc}	0,19 ^b	0,34 ^a	0,02	<0,0001
CIT	0,28 ^b	0,29 ^b	0,42 ^{ab}	0,63 ^a	0,06	0,0176
GABA	0,03 ^c	0,06 ^{bc}	0,08 ^{ab}	0,12 ^a	0,01	0,0006
GPR	0,09 ^b	0,09 ^b	0,17 ^{ab}	0,33 ^a	0,04	0,0200
HLY	0,04 ^c	0,04 ^{bc}	0,06 ^b	0,09 ^a	0,01	<0,0001
MHIS	0,31 ^b	0,39 ^b	0,56 ^a	0,67 ^a	0,05	<0,0001
ORN	0,30 ^b	0,36 ^b	0,34 ^b	0,45 ^a	0,06	0,0055
PHP	0,42 ^b	0,54 ^b	0,57 ^b	1,91 ^a	0,08	<0,0001
TPR	0,01 ^c	0,01 ^c	0,03 ^b	0,04 ^a	0,00	<0,0001

n – število vzorcev; SEM – standardna napaka ocene; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

Preglednica 14: Vpliv časa zorenja na vrednost pH in vsebnost prostih aminokislin v goveji mišici TB (n=24)

parameter	zorenje (dni)				SEM	značilnost vpliva (P-vrednost)
	2	7	14	28		
vrednost pH	5,64 ^c	5,76 ^{ab}	5,81 ^a	5,75 ^b	0,03	<0,0001
aminokislina (μmol/g):						
ALA	1,95 ^c	2,52 ^c	3,44 ^b	3,41 ^a	0,68	<0,0001
ARG	1,26 ^c	1,38 ^{bc}	2,14 ^b	3,40 ^a	0,25	<0,0001
ASN	0,46 ^a	0,50 ^a	0,53 ^a	0,60 ^a	0,03	0,1709
ASP	0,33 ^c	0,33 ^c	0,42 ^b	0,54 ^a	0,03	<0,0001
C-C	0,16 ^c	0,32 ^b	0,47 ^b	0,77 ^a	0,05	<0,0001
GLN	3,50 ^b	4,13 ^b	6,57 ^a	6,36 ^a	0,52	0,0013
GLU	1,95 ^b	1,60 ^b	2,45 ^{ab}	3,76 ^a	0,36	0,0156
GLY	0,13 ^b	0,09 ^a	0,13 ^a	0,13 ^a	0,01	0,0251
HIS	14,92 ^c	16,06 ^c	20,62 ^b	26,04 ^a	0,83	<0,0001
HYP	0,10 ^b	0,13 ^b	0,11 ^b	0,17 ^a	0,01	0,0055
ILE	5,25 ^c	6,75 ^b	7,16 ^b	9,01 ^a	0,46	<0,0001
LEU	1,12 ^c	1,19 ^c	1,83 ^b	2,86 ^a	0,14	<0,0001
LYS	4,56 ^c	4,47 ^c	5,78 ^b	7,30 ^a	0,38	<0,0001
MET	0,17 ^b	0,20 ^b	0,34 ^a	0,38 ^a	0,02	<0,0001
PHE	0,92 ^c	1,09 ^{bc}	1,58 ^b	2,90 ^a	0,17	<0,0001
PRO	0,96 ^b	0,95 ^b	1,11 ^b	1,45 ^a	0,10	0,0007
SER	0,46 ^{bc}	0,42 ^c	0,56 ^b	0,74 ^a	0,07	<0,0001
THR	0,09 ^c	0,10 ^{bc}	0,13 ^{ab}	0,16 ^a	0,01	0,0004
TRP	0,41 ^c	0,42 ^c	0,68 ^b	0,88 ^a	0,05	<0,0001
TYR	6,34 ^c	7,88 ^c	11,48 ^b	15,61 ^a	0,76	<0,0001
VAL	0,48 ^c	0,48 ^c	0,65 ^b	1,01 ^a	0,07	<0,0001
skupne proste AK	39,5 ^b	39,9 ^b	63,8 ^a	66,5 ^a	5,5	0,0054
peptidi (μmol/g):						
AAA	0,07 ^b	0,06 ^b	0,10 ^b	0,23 ^a	0,02	<0,0001
CIT	0,25 ^c	0,29 ^{bc}	0,34 ^{ab}	0,40 ^a	0,06	0,0018
GABA	0,02 ^b	0,03 ^b	0,03 ^b	0,06 ^a	0,01	0,0002
GPR	0,10 ^c	0,13 ^c	0,19 ^b	0,24 ^a	0,04	<0,0001
HLY	0,02 ^c	0,04 ^{bc}	0,04 ^b	0,06 ^a	0,01	<0,0001
MHIS	0,35 ^b	0,40 ^b	0,48 ^{ab}	0,59 ^a	0,05	0,0293
ORN	0,31 ^b	0,46 ^b	0,80 ^b	0,45 ^a	0,06	0,0015
PHP	0,31 ^b	0,33 ^b	0,39 ^b	0,76 ^a	0,08	<0,0001
TPR	0,01 ^c	0,02 ^{bc}	0,02 ^b	0,02 ^a	0,00	<0,0001

n – število vzorcev; SEM – standardna napaka ocene; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

Čas zorenja statistično značilno vpliva na vrednost pH obeh mišic, LL in TB (preglednici 13 in 14). Vrednost pH se je med zorenjem povečevala, proti koncu zorenja pa je vrednost pH padla.

Čas zorenja statistično značilno vpliva na vsebnost skoraj vseh prostih aminokislin in dipeptidov, tako v LL kot TB mišici. Statistično ne vpliva samo na vsebnost glutamina in glicina v mišici LL. Vsebnost glutamina je bila okrog 4,67 $\mu\text{mol/g}$ in vsebnost glicina okrog 0,12 $\mu\text{mol/g}$ (preglednica 13). Vsebnost skupnih prostih aminokislin se je med 28-dnevnim zorenjem povečala iz 40,5 $\mu\text{mol/g}$ na 86,5 $\mu\text{mol/g}$.

Čas zorenja mišice TB ne vpliva samo na vsebnost asparagina, ki ga je v povprečju 0,52 $\mu\text{mol/g}$, na ostale proste aminokisline pa vpliva značilno (preglednica 14). Vsebnost skupnih prostih aminokislin se je med 28-dnevnim zorenjem povečala iz 39,5 $\mu\text{mol/g}$ na 66,5 $\mu\text{mol/g}$.

4.3 INSTRUMENTALNO IZMERJENI PARAMETRI BARVE IN TEKSTURE

4.3.1 Osnovni statistični parametri

V preglednici 15 so zbrani rezultati meritev barve in reoloških lastnosti – rezne trdnosti različno zorene goveje mišice LL in TB. Z izjemo vrednosti L^* so vsi parametri dokaj variabilni, kar je posledica predvsem vpliva vrste mišice, spola živali, zorenja pa tudi vpliv posamezne živali ni zanemarljiv (P-vrednosti niso prikazane).

Preglednica 15: Rezultati instrumentalno izmerjenih parametrov barve in teksture zorenih govejih mišic LL in TB z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

instrumentalna analiza	parameter	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
barva	vrednost L^*	144	39,6	31,7	43,7	2,5	6,3
	vrednost a^*	144	21,8	13,1	28,0	3,2	14,7
	vrednost b^*	144	11,2	4,8	17,1	2,3	20,8
tekstura	rezna trdnost (N)	192	40,5	16,8	83,1	13,3	32,8

n – število obravnavanj; $\bar{x}$ – povprečna vrednost; min – minimalna vrednost; max – maksimalna vrednost; so – standardni odklon; KV (%) – koeficient variabilnosti.

4.3.2 Vpliv mišice

Vrsta mišice statistično zelo visoko značilno vpliva na instrumentalno izmerjeno barvo in teksturo le-teh. Mišica TB je v primerjavi z LL bolj rdeča (višja vrednost a^*) in rumena (višja vrednost b^*) ter mehkejša (preglednica 16).

Preglednica 16: Vpliv mišice na instrumentalno izmerjene parametre barve in teksture zorene govedine (n=48)

instrumentalna analiza	parameter	mišica		SEM	značilnost vpliva (P-vrednost)
		LL	TB		
barve	vrednost L^*	39,6 ^a	39,7 ^a	0,2	0,7398
	vrednost a^*	20,3 ^b	23,2 ^a	0,2	<0,0001
	vrednost b^*	10,5 ^b	11,9 ^a	0,2	<0,0001
teksture	rezna trdnost (N)	44,5 ^a	36,4 ^b	1,1	<0,0001

n – število vzorcev; SEM – standardna napaka ocene; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

4.3.3 Vpliv spola

Spol živali statistično zelo visoko značilno vpliva na instrumentalno izmerjeno barvo mesa, na instrumentalno izmerjeno teksturo mesa pa ne. Meso bikov je svetlejše, bolj rdeče in rumeno v primerjavi z mesom telic (preglednica 17).

Preglednica 17: Vpliv spola živali na instrumentalno zmerjene parametre barve in teksture zorene govedine (n=48)

instrumentalna analiza	parameter	spol		SEM	značilnost vpliva (P-vrednost)
		biki	telice		
barve	vrednost L [*]	40,8 ^a	38,5 ^b	0,2	<0,0001
	vrednost a [*]	22,6 ^a	20,9 ^b	0,2	<0,0001
	vrednost b [*]	11,8 ^a	10,5 ^b	0,2	<0,0001
teksture	rezna trdnost (N)	40,1 ^a	40,8 ^a	1,1	0,6629

n – število vzorcev; SEM – standardna napaka ocene; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

4.3.4 Vpliv zorenja

Iz preglednice 18 je razvidno, da zorenje na instrumentalno izmerjene parametre barve vpliva statistično zelo visoko značilno. Obe mišici sta med zorenjem postajali svetlejši, bolj rdeči in rumeni. Zorenje statistično zelo visoko značilno vpliva tudi na rezno trdnost toplotno obdelanih mišic LL in TB. Rezna trdnost se s časom zmanjšuje, kar pomeni da se mišici mehčata. Najbolj se je zmehčala mišica LL (za 40 %), medtem ko se je mišica TB zmehčala za 22 %. Rezna trdnost se je pri mišici LL pomembno znižala po 14-ih dneh zorenja, pri mišici TB pa se je rezna trdnost pomembno znižala po 28-ih dneh zorenja.

Preglednica 18: Vpliv časa zorenja na na instrumentalno izmerjene parametre barve in teksture zorene govedine (n=48)

mišica	instrumentalna analiza	parameter	zorenje (dni)				SEM	značilnost vpliva (P-vrednost)
			2	7	14	28		
LL	barve	vrednost L [*]	37,9 ^c	39,5 ^{ab}	40,4 ^a	40,6 ^a	0,5	0,0087
		vrednost a [*]	17,8 ^b	20,3 ^a	20,9 ^a	22,1 ^a	0,5	0,0002
		vrednost b [*]	8,8 ^b	10,7 ^a	10,8 ^a	11,6 ^a	0,4	0,0021
	teksture	rezna trdnost (N)	56,9 ^a	50,0 ^b	37,4 ^c	33,7 ^c	2,1	<0,0001
TB	barve	vrednost L [*]	38,2 ^b	39,7 ^a	40,0 ^a	40,8 ^a	0,5	0,0008
		vrednost a [*]	21,1 ^d	22,1 ^c	24,3 ^b	25,4 ^a	0,5	<0,0001
		vrednost b [*]	9,9 ^c	11,5 ^b	12,7 ^a	13,4 ^a	0,4	<0,0001
	teksture	rezna trdnost (N)	38,4 ^a	39,0 ^a	38,7 ^a	29,8 ^b	2,1	0,0010

n – število vzorcev; SEM – standardna napaka ocene; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

4.4 SENZORIČNE LASTNOSTI

4.4.1 Osnovni statistični parametri

Med senzoričnimi lastnostmi toplotno obdelanega mesa je za potrošnika brez dvoma najpomembnejša mehkoba, zato smo jo tudi v našem poskusu izbrali kot poglavitno merilo senzorične kakovosti po različnih obdobjih zorenja. Rezultati senzoričnega ocenjevanja so podani v preglednici 19.

Preglednica 19: Rezultati ocenjevanja senzoričnih lastnosti zorenih govejih mišic LL in TB z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

parameter	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
barva (1-7 točke)	144	4,3	2,0	6,5	1,0	24,0
mehkoba (1-4-7 točke)	144	4,0	1,0	6,5	1,5	37,4
sočnost (1-7 točke)	144	5,7	4,5	6,5	0,4	7,7
vonj (1-7 točke)	144	5,5	4,5	6,5	0,5	8,7
aroma (1-7 točke)	144	5,5	4,5	6,5	0,5	9,3

n – število obravnavanj; $\bar{x}$ – povprečna vrednost; min – minimalna vrednost; max – maksimalna vrednost; so – standardni odklon; KV (%) – koeficient variabilnosti.

Največji variabilnosti sta pri senzorični oceni mehkobe in barve (37,4 % in 24 %), pri ostalih senzoričnih lastnostih je okoli 10 %.

4.4.2 Vpliv mišice

Vrsta mišice statistično visoko značilo vpliva na mehkobo, vonj in aromo zorenega mesa (preglednica 20). Zorena mišica TB je bila mehkejša v primerjavi z LL, imela pa je tudi izrazitejši vonj in aromo zrelega govejega mesa. V barvi sta se mišici značilno razlikovali, medtem ko se v sočnosti nista.

Preglednica 20: Vpliv mišice na senzorične lastnosti zorene govedine (n=48)

parameter	mišica		SEM	značilnost vpliva (P-vrednost)
	LL	TB		
barva (1-7 točke)	4,2 ^a	4,4 ^a	0,1	0,0650
mehkoba (1-4-7 točke)	3,8 ^b	4,2 ^a	0,1	0,0052
sočnost (1-7 točke)	5,7 ^a	5,8 ^a	0,1	0,5770
vonj (1-7 točke)	5,4 ^b	5,5 ^a	0,0	0,0023
aroma (1-7 točke)	5,4 ^b	5,6 ^a	0,0	<0,0001

n – število vzorcev; SEM – standardna napaka ocene; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

4.4.3 Vpliv spola

Spol (preglednica 21) statistično zelo visoko značilno vpliva na barvo in mehkobo, na ostale senzorične lastnosti pa ne. Zoreno meso bikov ima bolj intenzivno barvo v primerjavi s mesom telic, meso telic pa je mehkejšo od mesa bikov.

Preglednica 21: Vpliv spola živali na senzorične lastnosti zorene govedine (n=48)

lastnost	spol		SEM	značilnost vpliva (P-vrednost)
	biki	telice		
barva (1-7 točke)	4,5 ^a	4,1 ^b	0,1	0,0012
mehkoba (1-4-7 točke)	3,8 ^b	4,2 ^a	0,1	0,0092
socnost (1-7 točke)	5,8 ^a	5,7 ^a	0,1	0,5770
vonj (1-7 točke)	5,4 ^a	5,5 ^a	0,0	0,3019
aroma (1-7 točke)	5,5 ^a	5,4 ^a	0,0	0,4214

n – število vzorcev; SEM – standardna napaka ocene; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

4.4.4 Vpliv zorenja

Iz preglednice 24 je razvidno, da zorenje statistično zelo visoko značilno vpliva na vse senzorično ocenjene lastnosti, razen na sočnost.

Preglednica 22: Vpliv časa zorenja na senzorične lastnosti zorene govedine (n=48)

lastnost / mišica	zorenje (dni)				SEM	značilnost vpliva (P-vrednost)
	2	7	14	28		
LL						
barva (1-7 točke)	4,0 ^c	3,4 ^b	4,1 ^b	5,2 ^a	0,2	<0,0001
mehkoba (1-4-7 točke)	1,7 ^d	3,5 ^c	4,7 ^b	5,4 ^a	0,2	<0,0001
sočnost (1-7 točke)	5,7 ^a	5,6 ^a	5,9 ^a	5,7 ^a	0,1	0,4242
vonj (1-7 točke)	4,9 ^c	5,1 ^c	5,6 ^b	5,9 ^a	0,1	<0,0001
aroma (1-7 točke)	5,0 ^c	5,4 ^c	5,8 ^b	6,1 ^a	0,1	<0,0001
TB						
barva (1-7 točke)	3,9 ^c	3,9 ^c	4,4 ^b	5,3 ^a	0,2	<0,0001
mehkoba (1-4-7 točke)	3,2 ^c	4,2 ^b	4,0 ^b	5,4 ^a	0,2	<0,0001
sočnost (1-7 točke)	5,8 ^a	5,6 ^a	5,8 ^a	5,9 ^a	0,1	0,3756
vonj (1-7 točke)	4,9 ^d	5,3 ^c	5,7 ^b	6,1 ^a	0,1	<0,0001
aroma (1-7 točke)	5,0 ^d	5,4 ^c	5,8 ^b	6,1 ^a	0,1	<0,0001

n – število vzorcev; SEM – standardna napaka ocene; $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; $P \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; $P \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; $P > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

Iz preglednice lahko opazimo, da se barva med 4-tedenskim zorenjem izboljša za 1,2 točke pri LL, pri TB pa za 1,4 točke. Barva postane bistveno bolj svetla in izrazita. Med zorenjem se močno izboljša mehkoba mišice LL, za 3,7 točke. Medtem ko se mehkoba

mišice TB izboljša le za 2,2 točki. Mehkoba se je pri mišici LL pomembno izboljšala po 14-ih dneh zorenja, pri mišici TB pa po 28-ih dneh zorenja. Po koncu zorenja sta obe mišici enako mehki (5,4 točke). Sočnost se pri obeh mišicah z zorenjem ne spreminja. Vonj in aroma pa se z zorenjem izboljšata, prva opaznejša sprememba je že po 7-ih dneh, vendar se z nadaljnjim zorenjem še izboljšujeta.

4.5 KORELACIJSKA ANALIZA

Preglednica 23: Pearsonovi korelacijski koeficienti med senzorično ocenjenim vonjem in aromo pečene govedine ter prostimi aminokislinami

parameter	vonj	aroma
ALA	0,43 ^{***}	0,41 ^{***}
ARG	0,68 ^{***}	0,68 ^{***}
ASN	0,35 [*]	0,40 ^{***}
ASP	0,69 ^{***}	0,68 ^{***}
C-C	0,75 ^{***}	0,69 ^{***}
GLN	0,34 [*]	0,33 [*]
GLU	0,64 ^{***}	0,63 ^{***}
GLY	0,15	0,11
HIS	0,76 ^{***}	0,71 ^{***}
HYP	0,47 ^{***}	0,51 ^{***}
ILE	0,71 ^{***}	0,74 ^{***}
LEU	0,78 ^{***}	0,76 ^{***}
LYS	0,66 ^{***}	0,65 ^{***}
MET	0,83 ^{***}	0,82 ^{***}
PHE	0,73 ^{***}	0,71 ^{***}
PRO	0,51 ^{***}	0,51 ^{***}
SER	0,57 ^{***}	0,54 ^{***}
THR	0,60 ^{***}	0,62 ^{***}
TRP	0,79 ^{***}	0,76 ^{***}
TYR	0,86 ^{***}	0,84 ^{***}
VAL	0,71 ^{***}	0,70 ^{***}
skupne proste AK	0,67 ^{***}	0,66 ^{***}
AAA	0,54 ^{***}	0,52 ^{***}
CIT	0,35 [*]	0,33 [*]
GABA	0,42 ^{***}	0,40 ^{***}
GPR	0,52 ^{***}	0,51 ^{***}
HYL	0,58 ^{***}	0,51 ^{***}
MHIS	0,45 ^{***}	0,44 ^{***}
ORN	0,31	0,34
PHP	0,52 ^{***}	0,47 ^{***}
TPR	0,52 ^{***}	0,50 ^{***}

*** $P \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilno; ** $P \leq 0,01$ statistično visoko značilno; * $P \leq 0,05$ statistično značilno.

Iz preglednice 23 je razvidno, da se predvsem s povišanjem vsebnosti prostih aminokislin izboljšata tako vonj kot aroma pečene govedine, kar za dipeptide ne moremo trditi (korelacijski koeficienti pod 0,50). Na izboljšanje vonja vplivajo naslednje proste aminokisline: histidin, levcin, metionin, triptofan in tirozin. Na izboljšanje arome pa vplivajo naslednje proste aminokisline: levcin, metionin, triptofan in tirozin.

Preglednica 24: Pearsonovi korelacijski koeficienti med senzorično ocenjeno barvo presne in mehko pečene govedine ter instrumentalno izmerjenimi parametri barve in teksture.

parameter	barva	mehkoba
vrednost L [*]	0,63 ^{***}	
vrednost a [*]	0,63 ^{***}	
vrednost b [*]	0,65 ^{***}	
rezna trdnost		-0,65 ^{***}

Pearsonovi korelacijski koeficienti med senzorično ocenjeno barvo presne in mehko pečene govedine ter instrumentalno izmerjenimi parametri barve in teksture, kažejo na to, da so rezultati dobljeni pri senzorični analizi primerljivi z instrumentalno izmerjenimi parametri (preglednica 24). Višje kot so L^{*} a^{*} b^{*} vrednosti barve, višjo oceno dobi vzorec pri senzoričnem ocenjevanju. Boljša kot je senzorično ocenjena mehkoča, manjša sila je potrebna za prerezanje vzorca.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Med zorenjem v mišičnini poteka eden od najpomembnejših biokemičnih procesov t.j. encimska razgradnja beljakovin mišičnih vlaken ali proteoliza. Proteoliza je svojevrstno nadaljevanje delovanja mišičnih proteolitičnih encimov še v času življenja živali. Najnovejše raziskave potrjujejo omejen obseg proteolize v mesu. Poteka le na nekaterih specifičnih točkah. Zaradi tega razpadejo določeni kompleksi v mišični strukturi, kar izboljša mehkobo (razpad črte Z, izguba troponina T, I in težke miozinske verige, povečanje koncentracije proteinov molske mase od 28 do 34 kD). K mehkobi mesa prispevajo tudi komponente vezivnega tkiva, predvsem zaradi možnih finih poškodb pravilne in kompleksne strukture (Cassens, 1994). Nekatere biokemijske spremembe, ki se dogajajo v mesu med zorenjem, so bile vključene v našo raziskavo.

Raziskava je bila zasnovana na:

- določanju osnovne kemijske sestave govejih mišic LL in TB (vsebnost vode, maščob, beljakovin in pepela);
- določanju prostih aminokislin in peptidov z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC) v kombinaciji z masnim detektorjem;
- merjenju vrednosti pH v ekstraktu;
- senzoričnem ocenjevanju barve, mehkobe, sočnosti, vonja in arome v vseh obdobjih zorenja toplotno pripravljenega mesa;
- merjenju barve presne mišice z aparatom Minolta v CIE L^* , a^* , b^* sistemu po predhodni oksigenaciji (1 h pri 3 °C) v vseh obdobjih zorenja ter
- merjenju teksture (merjenje rezne trdnosti z aparatom Texture analyser) na do središčne temperature 58 °C toplotno obdelanih in ohlajenih vzorcih.

Osnovna kemijska sestava

Ugotovili smo, da goveja mišica LL v povprečju vsebuje 22,5 g/100g beljakovin, 2,6 g/100g maščob, 1,2 g/100g pepela in 73,9 g/100g vode. Goveja mišica TB pa v povprečju vsebuje 22,1 g/100g beljakovin, 2,9 g/100g maščob, 1,3 g/100g pepela in 73,3 g/100g vode. Meso telic v primerjavi s mesom bikov vsebuje več pepela in maščob ter manj vode in beljakovin. Osnovna kemijska sestava je bila narejena na presnem mesu, saj se sestava med zorenjem ne spremeni (Jeretina, 2004). Pred analizo smo odstranili vso vidno maščobo in dele vezivnega tkiva, tako da rezultati prikazujejo osnovno kemijsko sestavo pustega govejega mesa. Rezultati se ujemajo z ugotovitvami Absca (2005), ki je ugotovil, da mišica LL (govedo lisaste pasme slovenskega porekla) v povprečju vsebuje 73,8 g/100g vode, 22,3 g/100g beljakovin, 2,8 g/100g maščob in 1,2 g/100g pepela ter Marina (2000), ki je ugotovil da mišica TB (govedo lisaste pasme slovenskega porekla) v povprečju vsebuje 75,3 g/100g vode, 21,0 g/100g beljakovin, 4,2 g/100g maščob in 1,2 g/100g pepela.

Aminokislinska sestava

Koncentracija prostih aminokislin se z zorenjem govejega mesa povečuje. Te spremembe so posledica delovanja različnih endogenih proteinaz, oligopeptidaz in aminopeptidaz. V začetni fazi delujejo predvsem kalpaini, ki imajo pH optimum v nevtralnem območju

(Feidt in sod., 1998). Po znižanju pH in avtolizi lizosomov pa začnejo delovati predvsem katepsini in druge aminopeptidaze. Posledica delovanja proteolitičnih encimov je povečanje vsebnosti prostih aminokislin. Količina aminokislin in njihova sestava sta odvisni od pogojev, katerim je meso podvrženo, vendar se vsebnost prostih aminokislin povečuje predvsem v začetni stopnji zorenja (prvih 10 dni) pri 4 °C. Tudi razgradnja kolagena se začne po desetem dnevu zorenja, ko se poveča vsebnost hidroksiprolina (Hypro) (Feidt in sod., 1996). Vsebnost vseh prostih aminokislin razen glutamina linearno narašča s časom zorenja, na začetku je vsebnost vseh prostih aminokislin 19,75 µmol/g po dveh tednih zorenja naraste na 29,94 µmol/g, po štirih tednih zorenja pri 1 °C pa doseže 38,46 µmol/g (Polak, 2003).

Naši rezultati se delno ujemajo s literaturo. Vsebnost prostih aminokislin se je pri mišici LL med zorenjem povečala iz 40,5 µmol/g na 86,5 µmol/g. Spreminjala se nista le vsebnosti glutamina in glicina. Vsebnost glutamina je bila okrog 4,67 µmol/g mišice, vsebnost glicina pa okrog 0,12 µmol/g mišice. Pri mišici TB se je med zorenjem vsebnost prostih aminokislin povečala iz 39,5 µmol/g na 66,5 µmol/g. Spreminjala se ni samo vsebnost asparagina, mišica ga je ves čas zorenja vsebovala okrog 0,52 µmol/g.

Zorena mišica LL je vsebovala manj histidina in asparagina toda več valina v primerjavi s zoreno mišico TB. Na vsebnost vseh ostalih prostih aminokislin vrsta mišice ne vpliva. Zorena mišica LL je v primerjavi s zoreno mišico TB vsebovala več peptidov.

Polak (2003) je določal vsebnost prostih aminokislin presnih vzorcev govejih mišic LL z ionsko izmenjevalno tekočinsko kromatografijo. Koeficienti variabilnosti so bili v vseh primerih pod 10 %, razen pri cisteinu, kjer je bil enak 10 %. Nizki koeficienti variabilnosti so kazali na dobro ponovljivost metode. Mi smo naključno izbran presen in nezoren vzorec šestkrat analizirali, ter ugotovili, da se koeficienti variabilnosti gibajo od 0,5 % pri izolevcinu, do 31,7 % pri GABA (preglednica 9). Ponovljivost je bila slabša pri prostih aminokislinah in peptidih, ki so bili prisotni v vzorcu v majhnih količinah (do 10 nmol/g vzorca), le-teh pa Polak (2003) večinoma ni določal, razen glicina in treonina.

Na osnovi rezultatov določanja ponovljivosti med paralelkami lahko zaključimo, da je priprava vzorcev z kompletom EZ: faast For Free Physiological Amino Acid Analysis by LC – MS (Phenomenex, ZDA) primerna za določanje vsebnosti prostih aminokislin in peptidov zorenega mesa. Ponovljivost je slabša le pri prostih aminokislinah in peptidih, ki so prisotni v vzorcu v majhnih količinah (do 10 nmol/g vzorca).

vrednost pH

Vrednost pH v živih mišicah je rahlo alkalna (7,3 - 7,5), takoj po zakolu se začne zniževati in mišičnina se približno v enem dnevu med hlajenjem zmerno zakisa, in sicer zaradi kopičenja mlečne kisline, nastale z encimsko razgradnjo glikogena. To zakisanje je zaželeno, saj zavira bakterijski kvar mesa, ustvarja pravšnje razmere za razvoj normalne kakovosti mišičnine in za zorenje ter prispeva k normalnemu temeljnemu okusu mesa (Bučar, 1997).

Ugotovili smo, da se je vrednost pH med zorenjem v obeh mišicah povečevala, proti koncu zorenja pa se je vrednost pH znižala. Mišica LL je imela po dveh dneh zorenja pH 5,67, po

sedmih dneh 5,78, po štirinajstih dneh 5,87, po štirih tednih pa se je vrednost pH rahlo znižala, na 5,72. pH vrednost mišice TB se je tekom zorenja podobno spreminjala. Mišica je imela po dveh dneh zorenja pH 5,64, po sedmih dneh 5,76, po štirinajstih dneh 5,81, po štirih tednih pa se je pH vrednost rahlo znižala na 5,75. Meritve se ujemajo z ugotovitvijo Jeretinove (2004), ki ugotavlja, da se z zorenjem vrednost pH mišice LL spreminja, z začetne vrednosti 5,71 naraste na 5,80 in se nato z nadaljnjim zorenjem nekoliko zniža, na vrednost 5,78.

Senzorična ocena

Barva, mehkoba, vonj in aroma se med 28-dnevnim zorenjem mišic LL in TB značilno izboljšajo, sočnost ostane nespremenjena. Med zorenjem se mehkoba pri mišici LL najbolj spremeni, mehkoba se izboljša za 3,7 točke. Medtem, ko se mehkoba pri TB izboljša le za 2,2 točki. Mehkoba se je pri mišici LL, pomembno povečala po 14 dneh zorenja, pri mišici TB pa po 28 dneh zorenja. Po koncu zorenja sta obe mišici enako mehki (5,4 točke).

Zoreno govejo mišico LL je ocenjeval tudi Cifuni in sod. (2004). Dobili so podobne rezultate, saj se sočnost med zorenjem (od 8 do 15 dni) ni spremenila (6,3 točke), mehkoba se je povečala (iz 6,0 na 6,5 točke) in tudi aroma se je izboljšala (iz 5,6 na 6,0 točke). To predvsem posledica proteolitičnih encimov, ki razgradijo beljakovine do peptidov in aminokislin. Zaradi lipolitičnih encimov se med zorenjem izboljšujeta vonj in aroma mesa, medtem ko sočnost ostaja enaka.

Barva mesa

Instrumentalno izmerjena barva mesa se s časom zorenja spreminja: mišici sta postali svetlejši (višja vrednost L^*), bolj rdeči (višja vrednost a^*) in bolj rumeni (višja vrednost b^*).

Boakye in Mittal (1996) sta opazovala barvo 16 dni zorenega govejega mesa (*longissimus lumborum*). Ugotovila sta, da se vrednost L^* zvišala iz 29,0 na 34,6, vrednost a^* se je povečala iz 16,2 na 17,2 in vrednost b^* iz 9,5 na 11,3. Če te rezultate primerjamo z našimi, vidimo, da se tako kot pri našem poskusu povečujejo vsi parametri barve.

Mišica TB je bila v primerjavi s LL bolj rdeča (višja vrednost a^* za 2,9) in rumena (višja vrednost b^* za 1,4), svetlost je bila enaka (vrednost L^*) (preglednica 16).

Absec (2005) je ugotovil, da je barva mišice LL telic svetlejša, bolj rdeča in rumena, kot pri bikih, ne glede na obdobje zorenja. Naše ugotovitve za mišici LL in TB so v nasprotju, kar je Absec (2005) ugotovil za mišico LL.

Zoreno meso (mišici LL in TB) bikov je svetlejša, bolj rdeča in rumena v primerjavi z zorenim mesom telic (preglednica 18).

Rezna trdnost

Stopnjo mehkobe pečenega govejega mesa smo določili tudi z merjenjem rezne trdnosti. Rezna trdnost se med zorenjem zmanjšuje, Jeremiah in Gibson (2003) sta prišla do podobnih rezultatov v zorjeni govedini. Rezna trdnost se je najbolj zmanjšala pri mišici LL za 40 % (na 33,7 N), medtem ko se je pri mišici TB zmanjšala le za 22 % (na 29,8 N). Rezna trdnost se je pri mišici LL, pomembno znižala po 14-ih dneh zorenja (iz 56,9 N na

37,4 N), pri mišici TB pa se je rezna trdnost pomembno znižala po 28-ih dneh zorenja (iz 38,4 N na 29,8 N). Torej za zagotovitev optimalne mehkobe mišice LL, zadostuje dva tedna zorenja, medtem, ko je potrebno mišico TB zoriti dlje (4 tedne).

Odbiranje za zorenje mišic LL in TB samo bikov ali samo telic ni smiselno, saj ima spol živali neznačilen vpliv na instrumentalno izmerjeno teksturo mesa.

5.2 SKLEPI

Iz navedenih rezultatov in komentarjev naloge bi lahko podali naslednje sklepe:

- Nezorena goveja mišica LL je v povprečju vsebovala 22,5 g/100g beljakovin, 2,6 g/100g maščob, 1,15 g/100g pepela in 73,9 g/100g vode. Goveja mišica TB pa je v povprečju vsebovala 22,1 g/100g beljakovin, 2,9 g/100g maščob, 1,28 g/100g pepela in 73,3 g/100g vode.
- Povprečna vrednost pH govejih mišic LL in TB je bila 2 dni *post mortem* 5,67 in se med 28-dnevnim zorenjem ni statistično značilno povečala.
- Uporabljena HPLC metoda za določanje vsebnosti prostih aminokislin in peptidov je dala zadovoljive rezultate (KV od 0,5 % pri izolevcinu, do 31,7 % pri γ -mino-n-butrični kislini).
- Vsebnost vseh prostih aminokislin in peptidov se je v presnem govejem mesu med zorenjem povečala (izjema so asparagin pri LL ter glutamin in glicin pri TB).
- Vsebnost skupnih prostih aminokislin v goveji mišici LL 2 dni *post mortem* je bila 40,5 $\mu\text{mol/g}$, po 14-dnevnem zorenju se je povečala na 67 $\mu\text{mol/g}$ oziroma na 86,5 $\mu\text{mol/g}$ po 28-dnevnem zorenju. Tudi vsebnost nekaterih dipeptidov se je med 28-dnevnim zorenjem močno povečala (npr. α -aminoadipinska kislina in prolin-hidroksiprolin za 4-krat).
- Vsebnost skupnih prostih aminokislin v goveji mišici TB 2 dni *post mortem* je bila 39,5 $\mu\text{mol/g}$, med 7-im in 14-im dnem se je povečala na 63,8 $\mu\text{mol/g}$, nato ostala nespremenjena. Tudi vsebnost nekaterih dipeptidov se je med 28-dnevnim zorenjem močno povečala (cca 3-krat).
- Vsebnost prostih aminokislin v mišici LL je bila 60,2 $\mu\text{mol/g}$, značilno večja kot v mišici TB 52,4 $\mu\text{mol/g}$; LL je vsebovala značilno večjo vsebnost valina kot mišica TB.
- Spol ni vplival na vsebnost skupnih prostih aminokislin, kljub temu je bilo v zorenem mesu bikov značilno več prostega arginina, asparagina, glutamina, glutaminske kisline in hidroksiprolina ter nekaterih peptidov kot v mesu telic.
- Rezna trdnost toplotno obdelanih vzorcev se med zorenjem zmanjševala. Rezna trdnost je bila pri mišici LL 2 dni *post mortem* 56,9 N in se je v 14-ih dneh zorenja zmanjšala za 40 %, pri mišici TB pa 38,4 N in se je po 28-ih dneh zmanjšala za 33 %. Razlike v rezni trdnosti med mišicama so bile značilne, razlike med mesom bikov in telic pa neznailne.
- V 28-ih dneh zorenja je barva mišic postala svetlejša (višja vrednost L^*), bolj rdeča (višja vrednost a^*) in bolj rumena (višja vrednost b^*). Barva mesa bikov je bila po eno urni oksigenaciji pri 3 °C svetlejša in intenzivnejša barve (značilno višje L^* , a^* in b^* vrednosti) kot meso telic. Mišica TB je imela intenzivnejšo barvo (značilno višji a^* in b^* vrednosti) kot mišica LL, kar potrjuje tudi senzorična ocena barve.

- Barva, mehkoba, vonj in aroma so se med 28-dnevnim zorenjem značilno izboljšali, sočnost je ostala nespremenjena.
- Mehkoba goveje mišice LL 2 dni *post mortem* je bila slaba (1,7 točke) in se je med 14-im in 28-im dnevom zorenja izboljšala na sprejemljivo mehkobo (5 točk). Mehkoba mišice TB se je iz 3,2 točke izboljšala na 5,4 točke šele po 28-tih dneh zorenja. V povprečju je bilo meso bikov mehkejše kot meso telic ter mišica LL mehkejša kot mišica TB.
- Vonj in aroma goveje mišice LL 2 dni *post mortem* sta bili primerni (4,9 oz. 5,0 točke) in se v 14-ih dneh zorenja značilno izboljšata (5,6 oz. 5,8 točk), najboljša pa sta bila po 28-ih dneh. Enako velja za mišico TB. Meso bikov in telic se v vonju in aromi ni razlikovalo, v povprečju pa je bila mišica TB značilno boljšega vonja in okusa kot mišica LL.
- Med zorenjem so potekle na mehkobi pri mišici LL največje spremembe, mehkoba se je izboljšala za 3,7 točke. Medtem, ko se mehkoba pri TB izboljšala le za 2,2 točki. Mehkoba se je pri mišici LL, pomembno zvišala po 14 dneh zorenja, pri mišici TB pa po 28 dneh zorenja. Po koncu zorenja sta obe mišici bili enako mehki (5,4 točke).
- Najtesnejša povezava med vonjem in aromo govejega mesa je bila z vsebnostjo prostih aminokislin ($R^2 > 0,75$), kot so histidin, levcin, metionin, triptofan in tirozin. Povezava s peptidi je bila ohlapna.
- Za zagotovitev celotne senzorične kakovosti mišice LL je zadostovalo dva tedna zorenja, medtem, ko je bilo potrebno mišico TB zoriti dlje (4 tedne).
- Razlike v opazovanih kakovostnih parametrih mesa bikov in telic so bile sicer opažene in v nekaterih primerih tudi značilne (barva), vendar so za razmere v proizvodnji premajhne, tako da menimo, da sortiranje po spolu ni smiselno.

6 POVZETEK

Namen naloge je bil spremljati parametre kakovosti in vsebnost posameznih prostih aminokislin ter peptidov dveh govejih mišic (*m. longissimus lumborum* – LL in *m. triceps brachii* – TB) šestih živali (trije bikci in tri telice) v različnih stopnjah zrelosti (po zakolu in v treh različnih intervalih zorenja) ter na njihovi podlagi ugotoviti optimalen čas zorenja in primernost obeh mišic za zorenje. Želeli smo tudi ugotoviti ali je postopek priprave vzorcev (EZ: faast podjetja Phenomenex ZDA) primeren za določanje prostih aminokislin, ter uvesti in preveriti visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC) v kombinaciji z masnim detektorjem. Naše hipoteze so bile, da se bo koncentracija vseh posameznih prostih aminokislin, razen glutamina, povečevala; da se bodo zaradi proteolize izboljšale senzorične lastnosti, kot so mehkoba mesa, sočnost in aroma; da bo mišica LL primernejša za zorenje kot mišica TB, ter da optimalni čas zorenja za obe mišici ne bo enak.

Naši vzorci so bile mišice LL in TB treh telic in treh bikov lisaste pasme kakovostnega tržnega razreda R3. Tople mase trupov bikov so znašale 359 kg do 364 kg, tople mase trupov telic pa 234 kg do 284 kg. Postopki predklavnega obdobja, zakola in primarne obdelave trupov so potekali po ustaljeni tehnologiji. Po normalnem hlajenju 24 ur *post mortem* smo izrezali mišice iz obeh polovic trupov, izmerili temperaturo in pH. Leve in desne mišice smo razdelili na dva enaka dela in vsak del posebej vakuumsko zapakirali v termokrčljivo folijo (Cryovac) in ga zorili določeno število dni. Z naključnim izborom smo določili, kateri del mišice zori koliko časa; tako smo poskušali izločiti vpliv lokacije vzorca v mišici. Zorenje je potekalo pri stalni temperaturi 1 °C. Vzorce smo zorili 2, 7, 14 in 28 dni. Po končanem zorenju smo iz mišic odrezali zrezke debeline 3,5 cm, na katerih smo opravili instrumentalno analizo barve, po toplotni obdelavi (na dvoploščnem žaru, temperatura plošč 200 °C, do končne središčne temperature zrezkov 55-60 °C) pa izvedli senzorično analizo (barve, mehkobe, sočnosti, vonja in arome) ter instrumentalno analizo teksture. Preostale vzorce smo razrezali na drobne koščke in jih homogenizirali s pomočjo kuhinjskega sekljalnika do pastozne mase. Tako pripravljene vzorce smo zapakirali v polietilenske vrečke in zmrznili pri $(-21 \pm 1) ^\circ\text{C}$ do analize osnovne kemijske sestave (voda, maščobe, pepel, beljakovine), merjenja vrednosti pH v ekstraktu ter določanja vsebnosti prostih aminokislin in peptidov. Vse analize smo opravili v paralelni določitvi. Osnovno kemijsko analizo smo opravili samo na vzorcih 2 dni po zakolu (nezoreni).

Za analizo osnovne kemijske sestave (beljakovine, voda pepel, maščobe) smo uporabili analitske metode, ki jih predpisuje AOAC. Proste aminokisline in peptide smo določali z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC) v kombinaciji z masnim detektorjem, vzorce pa smo predhodno pripravili po metodi EZ: faast podjetja Phenomenex iz ZDA. Za instrumentalno analizo barve mišice smo uporabili aparat Minolta v CIE in L^* , a^* , b^* sistem, za merjenje teksture pa smo uporabili aparat Texture analyser. Rezultate smo statistično obdelali s računalniškim programom SAS.

Nezorena goveja mišica LL v povprečju vsebuje 22,5 g/100g beljakovin, 2,6 g/100g maščob, 1,15 g/100g pepela in 73,9 g/100g vode. Goveja mišica TB pa v povprečju vsebuje 22,1 g/100g beljakovin, 2,9 g/100g maščob, 1,28 g/100g pepela in 73,3 g/100g vode.

Povprečna vrednost pH govejih mišic LL in TB je 2 dni *post mortem* 5,67 in se med 28-dnevnim zorenjem ni statistično značilno povečala.

Uporabljena HPLC metoda za določanje vsebnosti prostih aminokislin in peptidov je dala zadovoljive rezultate (KV od 0,5 % pri izolevcinu pa do 31,7 % pri γ -amino-n-butrični kislini).

Z zorenjem v presnem govejem mesu narašča vsebnost vseh prostih aminokislin (izjema so asparagin pri LL ter glutamin in glicin pri TB) in peptidov. Povprečna vrednost skupnih prostih aminokislin v goveji mišici LL 2 dni *post mortem* je 40,5 $\mu\text{mol/g}$, ki se po 14-dnevnem zorenju poveča na 67 $\mu\text{mol/g}$ in na 86,5 $\mu\text{mol/g}$ po 28-dnevnem zorenju. Tudi vsebnost nekaterih dipeptidov se med 28-dnevnim zorenjem močno poveča (npr. α -aminoadipinska kislina in prolin-hidroksiprolin za 4-krat). Povprečna vrednost skupnih prostih aminokislin v goveji mišici TB 2 dni *post mortem* je 39,5 $\mu\text{mol/g}$, ki se med 7-im in 14-im dnevom poveča na 63,8 $\mu\text{mol/g}$, nato ostane nespremenjena. Tudi vsebnost nekaterih dipeptidov se med 28-dnevnim zorenjem močno poveča (za 3-krat ali manj). Vsebnost prostih aminokislin v mišici LL je 60,2 $\mu\text{mol/g}$ ter je značilno večja kot v mišici TB, kjer je prostih aminokislin 52,4 $\mu\text{mol/g}$; LL vsebuje značilno višjo vsebnost valina kot mišica TB. Spol ne vpliva na vsebnost skupnih prostih aminokislin, kljub temu je v zorenem mesu bikov značilno več arginina, asparagina, glutamina, glutaminske kisline in hidroksiprolina ter nekaterih peptidov kot v mesu telic.

Rezna trdnost toplotno obdelanih vzorcev se med zorenjem zmanjšuje. Rezna trdnost je pri mišici LL 2 dni *post mortem* 56,9 N in se je v 14-ih dneh zorenja zmanjšala za 40 %, pri mišici TB pa 38,4 N in se je po 28-ih dneh za 33 %. Razlike v rezni trdnosti med mišicama so značilne, razlike med mesom bikov in telic so neznačilne.

V 28-ih dneh barva mišic postane svetlejša (višja vrednost L^*), bolj rdeča (višja vrednost a^*) in bolj rumena (višja vrednost b^*). Barva mesa bikov je po eno urni oksigenaciji pri 3 °C svetlejša in intenzivnejša barve (značilno višje L^* , a^* , b^* vrednosti) kot meso telic. Mišica TB izkazuje intenzivnejšo barvo (značilno višji a^* in b^* vrednosti) kot mišica LL, kar potrjuje tudi senzorična ocena barve.

Barva, mehkoba, vonj in aroma se med 28-dnevnim zorenjem značilno izboljšajo, sočnost ostane nespremenjena. Mehkoba goveje mišice LL 2 dni *post mortem* je slaba (1,7 točke) in se med 14-im in 28-im dnevom zorenja izboljša na sprejemljivo mehkobo (5 točk). Mehkoba mišice TB se iz 3,2 točke izboljša na 5,4 točke šele po 28-tih dneh zorenja. V povprečju je meso bikov mehkejša kot meso telic ter mišica LL mehkejša kot mišica TB. Vonj in aroma goveje mišice LL 2 dni *post mortem* sta primerna (4,9 oz. 5,0 točke) in se v 14-ih dneh značilno izboljšata (5,6 oz. 5,8 točk), najboljša pa sta po 28-ih dneh. Enako velja za mišico TB. Meso bikov in telic se v vonju in aromi ne razlikuje, v povprečju pa je mišica TB značilno boljšega vonja in okusa kot mišica LL. Med zorenjem potečejo na mehki pri mišici LL največje spremembe, mehkoba se izboljša za 3,7 točke. Medtem, ko se mehkoba pri TB izboljša le za 2,2 točki. Mehkoba se je pri mišici LL, pomembno zvišala po 14 dneh zorenja, pri mišici TB pa po 28 dneh zorenja. Po koncu zorenja sta obe mišici enako mehki (5,4 točke).

Najtesnejša povezava med vonjem in aromo govejega mesa je z vsebnostjo prostih aminokislin ($R^2 > 0,75$), kot so histidin, levcin, metionin, triptofan in tirozin. Povezava s peptidi je ohlapna.

Za zagotovitev celotne senzorične kakovosti mišice LL zadostuje dva tedna zorenja, medtem, ko je potrebno mišico TB zoriti dlje (4 tedne).

Razlike v opazovanih kakovostnih parametrih mesa bikov in telic so sicer opažene in v nekaterih primerih tudi značilne (barva), vendar so za razmere v proizvodnji premajhne, tako da menimo, da sortiranje po spolu ni smiselno.

7 VIRI

- Ahn D.H., Shimada K., Takahashi K. 2003. Relationship between weakening of Z-disks and liberation of phospholipids during *post mortem* aging of pork and beef. *Journal of Food Science*, 68, 1: 94-98
- Belitz H.D., Grosch W. 1999. Food chemistry. 2nd ed. Berlin, Springer-Verlag: 10, 548-548
- Boakye K., Mittal G.S. 1996. Changes in colour of beef *m. longissimus dorsi* muscle during ageing. *Meat Science*, 42, 3: 347-354
- Bučar F. 1997. Meso, poznavanje in priprava. Ljubljana, Kmečki glas: 266 str.
- Bučar F., Žlender B., Dorđević V. 1989. Tehnologija mesa (izbrana poglavja). Interno gradivo za študente živilske tehnologije in živinoreje. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: loč. pog.
- Calkins C. R., Killinger K. M. 2003. Meat: Structure. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol 6. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). 2nd ed. Oxford, Academic Press: 3760-3766
- Campero M.I., Sesuss I., Honikel K.O. 1992. Flavor compounds of beef broth as affected by cooking temperature. *Journal of Food Science*, 57: 1285-1290
- Campo G., Gallego B., Berregi I., Casado J.A. 1998. Creatinine, creatine and protein in cooced meat products. *Food Chemistry*, 63, 2: 187-190
- Caput P. 1996. Govedarstvo. Zagreb, Celeber: 56-62
- Cassens R.G., Demeyer D., Eikelenboom G., Honikel K.O., Johansson G., Nielsen T., Renerre M., Richardson I., Sakata R. 1995. Recommendation of reference method for assesment of meat color. V: 41st Annual International Congress of Meat science and Tehnology, San Antonio, Texas, USA., August 20-25, 1995. Proceedings: vol.2. Chicago, American Meat Science Association: 410-411
- Čepin S., Čepon M., Šalehar A., Holcman A., Kompan D., Pohar P. 1997. Trendi prireje in porabe mesa v svetu in pri nas. V: Meso v prehrani in zdravje. Posvet posvečen 50. obletnici Biotehniške fakultete. Radenci, 20. in 21. november 1997. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Odelek za živilstvo: 29-39
- Davies A. S. 2004. Muscle structure and contraction. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol.2. 1st ed. Jensen W., Devine C., Dikeman M. (eds.). Oxford, Elsevier: 882-901
- Doornenbal E., Murray A.C. 1981. Effects of age, breed, sex and muscle on certain mineral concentrations in cattle. *Journal of Food Science*, 47: 55-58
- Dransfield E. 1992. Modelling *post mortem* tenderization. 3. Role of calpain-I in conditioning. *Meat Science*, 31, 1: 85-94
- Dransfield E. 1993. Modelling *post mortem* tenderization. 4. Role of calpains and calpastatin in conditioning. *Meat Science*, 34, 2: 217-234.
- Dransfield E. 1998. Inactivation of μ -calpain by EDTA. V: Meat consumption and culture: 44th International Congress of Meat Science and Tehnology, august 30th-september 4th, 1998, Vol. 1 Barcelona, Spain, Institute for Food and Agriculural Research and

- Technology; Eurocarne, National Institute for Agricultural and Food Research and Tehnology: 734-735
- Dransfield E. 1999. Meat tenderness - The μ -calpain hypothesis. V: Meat joins countries around the world: 45th International Congress of Meat Science and Tehnology, august 1st-6th, 1999, Jokohama, Japan. Tokyo, Japan Society for Meat Science and Tehnology: 220-228
- Faustman C., Cassens R.G. 1990. The biochemical basis for discoloration in fresh met: a review. Journal of Muscle foods, 1,3: 217-243
- Feidt C., Brun-Bellut J., Dransfield E. 1998. Liberation of peptides during meat storage and their interaction with proteinase activity. Meat Science, 49, 2: 223-231
- Feidt C., Petit A., BruasReignier F., BrunBellut J. 1996. Release of free amino-acids during ageing in bovine meat. Meat Science, 44, 1-2: 19-25
- Ferčej J., Šobar B., Skušek F. 1989. Govedoreja. Ljubljana, Kmečki glas: 78-92
- Gašperlin L. 1998. Barva presnih in termično obdelanih govejih mišic *m. longissimus dorsi* in *m. psoas major* normalne in TČS (temne, čvrste in suhe) kakovosti. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-3
- Geesink G.H., Goll D.E. 1995. Measurement of calpain activity in *post mortem* muscle extracts underestimates levels of μ -calpain. V: 41st Annual International Congress of Meat Science and Technology, San Antonio, Texas, U.S.A. August 20-25, 1995. Chicago, American Meat Science Association, National Live Stock and Meat Board: 547-549
- Hamm R. 1975 Muskelfarbstoff und Fleischfarbe. Fleischwirtschaft, 55, 10: 1415-1418
- Harris R.C., Soderlund K., Hultman E. 1992. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. Clinical Science, 83, 3: 367-374
- Honikel K.O. 2004. Conversion of muscle to meat : Cold and heat shortening. V: Encyclopedia of meat sciences. Vol 1. 1st ed. Jensen W., Devine C., Dikeman M. (eds.). Oxford, Elsevier: 318-323
- Jaime I., Beltran J.A., Cena P., Lopezlorenzo P., Roncales P. 1992. Tenderization of lamb meat-effect of rapid *post mortem* temperature drop on muscle conditioning and aging. Meat Science, 32, 4: 357-366
- Jeacocke R.E. 1993. The concentrations of free magnesium and free calcium-ions both increase in skeletal-muscle fibers entering *rigor mortis*. Meat Science, 35, 1: 27-45
- Koohmaraie M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. Meat Science, 43, S: S193-S201
- Kurebayashi N., Harkins A.B., Baylor S.M. 1993. Use of fura red as an intracellular calcium indicator in frog skeletal-muscle fibers. Biophysical Journal, 64, 6: 1934-1960
- Lawrie R.A. 1979. Meat science. 3rd ed. Oxford, London, Pergamon Press: 300-314
- Livingstone D.J., Brown W.D. 1981. The chemistry of myoglobin and its reactions. Food Technology, 35, 5: 244-252

- Lupton J. R., Cross H. R. 1994. The contributions of meat, poultry and fish to the health and well being of man. V: Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products. Pearson A. M., Dutson T. R. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 24-28
- Marin K. 2000. Kemijska sestava govejega mesa slovenskega porekla. Diplomsko naloga, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39-39
- Mesa J.L., Ruit J.R., Gonzales-Gross M.M., Sainz A.G., Garzon M.J.C. 2002. Oral creatine supplementation and skeletal muscle metabolism in physical exercise. *Sports Medicine*, 32, 14: 903-944.
- Mullen A.M., Stoeva S., Laib K., Gruebler G., Voelter W., Troy D.J. 2000. Preliminary analysis of amino acids at various locations along the M. *Longissimus dorsi* in aged beef. *Food Chemistry*, 69: 461-465.
- Murachi T. 1989. Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin. *Biochemistry International*, 18, 2: 263-294.
- Murphy R. A. 1998. Contractile mechanism of muscle cells-muscle. V: Physiology. 4th ed. Berne R. M., Levy N. M. (eds.). St. Louis, Missouri, Mosby, Inc.: 270-281.
- Nelson D.L., Cox M.M. 2000. Lehninger principles of biochemistry. 3rd ed., New York, Worth Publishers, Inc.: 243-292.
- Ouali A. 1990. Meat tenderisation: possible causes and mechanisms. A review. *Journal of Muscle Foods*, 39, 1: 129-165
- Penny I.F. 1980. The enzymology of conditioning. V: Developments in meat Science-1. Lawrie R.A. (ed.). London, Applied Science Publishers Ltd: 115-143.
- Persky A.M., Brazeau G.A. 2001. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacological Reviews*, 53,2: 161-176.
- Plestenjak A. 1995. Vsebnost hidroksiprolina in kakovost mesnih izdelkov. V: 1. simpozij živilske kemije 2. posvetovanje o praktični uporabi evropskih predpisov za živila z mednarodno udeležbo. Bled 23., 24., 25. maj 1995. Ljubljana, Slovensko kemijsko društvo, Sekcija za živilsko kemijo: 66-72.
- Pogačar J., Jeretina J., Štepec M., Skok V., Potočnik K., Podgoršek P., Perpar T., Janžekovič S., Šonaja F., Čeh J. 1998. Biki lisaste pasme za osemenje v Sloveniji: za leto 1998/1999. Ljubljana, Govedorejska služba Slovenije, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije: 60-60
- Polak T. 2003. Heterociklični aromatski amini v zoreni termično obdelani goveji dolgi hrbtni mišici. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 64-64
- Potthast K. 1987. Fleischfarbe, Farbstabilität und Umrotung. *Fleischwirtschaft*, 67,1: 50-50
- Požar M. 1999. Izdelava postopka za zmanjšanje vsebnosti holesterola v jajčnem rumenjaku in njegova karakterizacija. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 7-15
- Rahelić S. 1978. Osnove tehnologije mesa. Zagreb, Školska knjiga: 54-57

- Saladin K. 2002. Anatomy and physiology: The unity of form and function. 3rd ed. Boston, McGraw-Hill Science/Engineering/Math: 1216 str.
- SAS Softwear. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc.: softwear
- Sasaki T., Kikuchi T., Yumoto M., Yoshimura N., Murachi T. 1984. Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 12489-12494
- Takahashi K. 1996. Structural wakening of skeletal muscle tissue during *post-mortem* ageing of meat: the non-enzymatic mechanism of meat tenderization. *Meat Science*, 43: 67-80
- Takahashi K. 1999. Tenderization mechanism of meat during *post mortem* aging: The calcium theory of meat tenderization. *Animal Science Journal*, 70: 1-11
- Takahashi K., Fukazawa T., Yasui T. 1967. Morfology of miofibrilar fragments and reversible contraction of sarcomeres in chicken pectoral muscle. *Journal of Food Science*, 32: 409-413
- Takahashi K., Hattori A. 1989. α -aktinin is a component of the Z-filament, a structural backbone of skeletal muscle Z-disks. *Journal of Biochemistry*, 105: 529-536
- Takahashi K., Hattori A., Kuroyanagi H. 1995. Relationship between the translocation of paratropomyosin and the restoration of rigor-shortened sarcomeres during *post mortem* aging of meat- a molecular mechanism of meat tenderization. *Meat Science*, 40, 3: 413-424
- Takahashi K., Hattori A., Tatsumi R., Takai K. 1992. Calcium-induced splitting of connectin filaments into beta-connectin and a 1,200-KDa subfragment. *Journal of Biochemistry*, 111, 6: 778-782
- Tatsumi R., Hattori A., Takahashi K. 1993. Substructure of nebulin filaments- localization and characterization of subfragments produced by 0,1 mM CaCl_2 . *Journal of Biochemistry*, 113, 6: 797-804
- Tatsumi R., Takahashi K. 1992. Calcium-induced fragmentation of skeletal-muscle nebulin filaments. *Journal of Biochemistry*, 112, 6: 775-779
- Tatsumi R., Takahashi K. 2003. Structural changes in titin and nebulin filaments specific to calcium ion sat 0,1 mM: Factors of meat tenderization during *post mortem* aging. *Journal of Food Science*, 68, 3: 756-760.
- Taylor R. G. 2004. Connective tissue structure, function and influence on meat quality. V: *Encyclopedia of meat sciences*. Vol. 1. 1st ed. Jensen W., Devine C., Dikeman M. (eds.). Oxford, Elsevier: 306-314
- Thomson B.C., Dobbie P.M., Singh K., Speck P.A. 1996. Post mortem kinetics of meat Tenderness and the components of the calpaine system in bull skeletal muscle. *Meat Science*, 44, 3: 151-157
- Valin C., Ouali A. 1992. Proteolytic muscle enzymes and *post mortem* meat tenderisation. V: *New technologies for meat and meat products*. Smulders, F. J. M., Toldra F., Flores J., Prieto M., (eds.). Utrecht, ECCEAMST; Audet Tijdschriften: 163-179

Zamora F., Debiton E., Lepetit J., Lebert A., Dransfield E., Ouali A. 1996. Predicting variability of ageing and toughness in beef M. *Longissimus lumborum* et thoracis. Meat Science, 43, 3-4: 321-333

8 ZAHVALA

Za strokovno pomoč, statistično obdelavo podatkov ter za pregled in oblikovanje diplomske naloge, se zahvaljujem mentorici doc. dr. Lei Gašperlin.

Za strokovno pomoč in pregled diplomske naloge se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Tereziji Golob.

Hvala dr. Tomažu Polaku za strokovno pomoč pri pisanju diplomske naloge ter za strokovne nasvete pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge.

Ivici Hočevnar in Barbari Slemenik se zahvaljujem za pomoč in nasvete pri iskanju in urejanju literature.

Hvala staršem in bratu, ki so me vsa ta leta študija podpirali in verjeli vame.