Utjecaj biljnih ekstrakata na parametre kakvoće ribljih burgera

Grbavac, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:922935

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

UTJECAJ BILJNIH EKSTRAKATA NA PARAMETRE KAKVOĆE RIBLJIH BURGERA

DIPLOMSKI RAD

MARIJANA GRBAVAC
Mat. br. 233

Split, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
ZAŠTITA OKOLIŠA

UTJECAJ BILJNIH EKSTRAKATA NA PARAMETRE KAKVOĆE RIBLJIH BURGERA

DIPLOMSKI RAD

MARIJANA GRBAVAC
Mat. br. 233

Split, rujan 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
ENVIRONMENTAL PROTECTION

EFFECT OF PLANT EXTRACTS ON THE QUALITY PARAMETERS OF FISH BURGERS

DIPLOMA THESIS

MARIJANA GRBAVAC
Parent number: 233

Split, September 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij kemijske tehnologije, smjer Zaštita okoliša

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Danijela Skroza
Pomoć pri izradi: Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat

UTJECAJ BILJNIH EKSTRAKATA NA PARAMETRE KAKVOĆE RIBLJIH BURGERA

Marijana Grbavac, 233

Sažetak:

Riba je izuzetno vrijedan izvor visokokvalitetnih bjelančevina i polinezasićenih masnih kiselina koje imaju blagotvorno djelovanje na ljudsko zdravlje. Upravo zbog svoje građe i kemijskog sastava, riba se ubraja u lako pokvarljive namirnice. Da bi se spriječilo kvarenje i poboljšala kvaliteta ribe i ribljih proizvoda upotrebljavaju se razni dodatci ili aditivi tijekom rukovanja, obrade i skladištenja. Za poboljšanje okusa proizvoda od ribe često se koristi začinsko bilje koje, osim što poboljšava okus proizvoda, oplemenjuje ga bioaktivnim spojevima koji mogu doprinijeti i poboljšanju njegovih kvalitativnih karakteristika.

U ovom radu ispitivan je utjecaj dodataka biljnih ekstrakata (češnjak+ružmarin, češnjak+klinčić) na kemijske, fizičke i mikrobiološke parametre kakvoće ribljih burgera tijekom pohrane na 4±2 °C. U svim ribljim burgerima zabilježen je porast hlapivih amina, pokazatelja oksidacije masti i broja ukupnih aerobnih bakterija, a svi parametri bili su niži u proizvodima s dodatkom ekstrakata. Grupe proizvoda s ekstraktima imali su bolje parametre od kontrolnog uzorka (bez dodataka), a smjesa češnjaka i klinčića pokazala se boljom za očuvanja parametara kakvoće od smjese češnjaka i ružmarina.

Ključne riječi: parametri kakvoće, TVB, TMA, TBA, biljni ekstrakti

Rad sadrži: 38 stranica, 32 slike, 31 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić – predsjednik Povjerenstva
2. Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat – član
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza – mentor

Datum obrane: 26. rujna 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Graduate study of chemical technology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19.

Mentor: Ph.D. Danijela Skroza, Assistant Professor
Technical assistance: Ph.D. Vida Šimat, Associate Professor

EFFECT OF PLANT EXTRACTS ON THE QUALITY PARAMETERS OF FISH BURGERS

Marijana Grbavac, 233

Abstract:

Fish is an extremely valuable source of high quality protein and polyunsaturated fatty acids that have a beneficial effect on human health. Due to its structure and chemical composition, fish is considered easily perishable food. Additives are used to delay spoilage and improve the quality of fish and fish products during handling, processing and storage. Spice herbs are often used to improve the taste of fish products, in addition they enriching the product with bioactive compounds that can contribute and improve quality characteristics.

In this thesis, the effect of plant extracts (garlic+rosemary, garlic+clove) on the chemical, physical and microbiological quality parameters of fish burgers during storage at 4±2 °C was investigated. Volatile amines, indicators of fat oxidation and the number of total aerobic bacteria increased in all fish burgers, wiht lower parameters in products with added extracts. Product groups with extracts had better quality parameters than the control sample (no additives), and the mixture of garlic and clove showed better preservative effecte from the mixture of garlic and rosemary.

Keywords: quality parameters, TVB, TMA, TBA, plant extracts

Thesis contains: 38 pages, 32 figures, 31 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assist.Prof. – chairperson
2. Ph. D. Vida Šimat, Assoc. Prof. – member
3. Ph. D. Danijela Skroza, Assist. Prof. – supervisor

Defence date: September 26th, 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Skroze i neposrednim vodstvom izv. prof. dr. sc. Vide Šimat, u razdoblju od svibnja do rujna 2019. godine. Dio istraživanja napravljen je u Laboratoriju medicinske mikrobiologije i parazitologije, Medicinskog fakulteta u Splitu.

Ovaj je rad sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Danijeli Skrozi na ukazanom povjerenju, pomoći i savjetima tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Ovaj rad rezultat je njenog strpljenja i podrške koju mi je pružala tijekom izrade rada.

Zahvalu upućujem članovima komisije izv. prof. dr. sc. Vidi Šimat i doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić koje su korisnim savjetima i sugestijama pridonijele da ovaj rad bude potpuniji.

Zahvaljujem se cijeloj svojoj obitelji na pruženoj ljubavi, potpori i razumijevanju tijekom svih ovih godina.

Također, zahvaljujem se prijateljima i kolegama na neizmjernoj podršci.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada je odrediti utjecaj dodataka biljnih ekstrakata na parametre kakvoće ribljih burgera korištenjem različitih kemijskih, fizičkih i mikrobioloških metoda.

SAŽETAK

Riba je izuzetno vrijedan izvor visokokvalitetnih bjelančevina i polinezasićenih masnih kiselina koje imaju blagotvorno djelovanje na ljudsko zdravlje. Upravo zbog svoje građe i kemijskog sastava, riba se ubraja u lako pokvarljive namirnice. Da bi se spriječilo kvarenje i poboljšala kvaliteta ribe i ribljih proizvoda upotrebljavaju se razni dodatci ili aditivi tijekom rukovanja, obrade i skladištenja. Za poboljšanje okusa proizvoda od ribe često se koristi začinsko bilje koje, osim što poboljšava okus proizvoda, oplemenjuje ga bioaktivnim spojevima koji mogu doprinijeti i poboljšanju njegovih kvalitativnih karakteristika.

U ovom radu ispitivan je utjecaj dodataka biljnih ekstrakata (češnjak+ružmarin, češnjak+klinčić) na kemijske, fizičke i mikrobiološke parametre kakvoće ribljih burgera tijekom pohrane na 4±2 °C. U svim ribljim burgerima zabilježen je porast hlapivih amina, pokazatelja oksidacije masti i broja ukupnih aerobnih bakterija, a svi parametri bili su niži u proizvodima s dodatkom ekstrakata. Grupe proizvoda s ekstraktima imali su bolje parametre od kontrolnog uzorka (bez dodataka), a smjesa češnjaka i klinčića pokazala se boljom za očuvanja parametara kakvoće od smjese češnjaka i ružmarina.

Ključne riječi: parametri kakvoće, TVB, TMA, TBA, biljni ekstrakti

SUMMARY

Fish is an extremely valuable source of high quality protein and polyunsaturated fatty acids that have a beneficial effect on human health. Due to its structure and chemical composition, fish is considered easily perishable food. Additives are used to delay spoilage and improve the quality of fish and fish products during handling, processing and storage. Spice herbs are often used to improve the taste of fish products, in addition they enriching the product with bioactive compounds that can contribute and improve quality characteristics.

In this thesis, the effect of plant extracts (garlic+rosemary, garlic+clove) on the chemical, physical and microbiological quality parameters of fish burgers during storage at 4±2 °C was investigated. Volatile amines, indicators of fat oxidation and the number of total aerobic bacteria increased in all fish burgers, wiht lower parameters in products with added extracts. Product groups with extracts had better quality parameters than the control sample (no additives), and the mixture of garlic and clove showed better preservative effecte from the mixture of garlic and rosemary.

Keywords: quality parameters, TVB, TMA, TBA, plant extracts

SADRŽAJ

UVOD 1
1.OPĆI DIO 2
1.1. Riba kao namirnica 2
1.2. Postmortalne promjene u ribi 4
1.3. Kvarenje ribe i promjene u ribi tijekom skladištenja 7
1.3.1. Hlapivi amini kao parametar za procjenu kemijske kvalitete . 9
1.3.1.1.TMA 9
1.3.1.2. TVB 10
1.4. Utjecaj dodataka na produljenje roka trajnosti 12
1.4.1. Bioaktivni fenolni spojevi 12
1.4.2. Ružmarin 14
1.4.3. Češnjak 14
1.4.4. Klinčić 15
2. EKSPERIMENTALNI DIO 17
2.1. Materijal 17
2.2. Reagensi 17
2.3. Metode 18
2.3.1. Određivanje pH vrijednosti ribljih burgera 18
2.3.2. Metoda određivanja udjela soli (NaCl) 18
2.3.3. Metode određivanja biokemijskih parametara kvalitete . . 19
2.3.3.1. Određivanje sekundarnog parametra oksidacije . . 19
2.3.3.2. Metode određivanja sadržaja TVB i TMA . . . 20
2.3.4. Metode određivanja ukupnog broja bakterija . . . 21

3. REZULTATI. 22
3.1. Rezultati određivanja pH vrijednosti 22
3.2. Rezultati određivanja udjela soli 23
3.3. Rezultati određivanja biokemijskih parametara kvalitete . . . 24
3.3.1. Rezultati određivanja TVB 24
3.3.2. Rezultati određivanja TMA 25
3.3.3. Rezultati određivanja TBA 27
3.4. Rezultati određivanja ukupnog broja bakterija 28
3.4.1. Rezultati određivanja ukupnog broja mezofila . . . 28
3.4.2. Rezultati određivanja ukupnog broja psihrofila . . . 30
4. RASPRAVA 32
5.ZAKLJUČCI 35
6.LITERATURA 36

UVOD

U mnogim dijelovima svijeta ribe imaju značajan udio u prehrani ljudi osiguravajući 16% bjelančevina životinjskog porijekla. Usprkos tome, na globalnoj razini godišnje se ulovi oko 100 milijuna tona ribe od čega se samo 70 milijuna tona koristi za ljudsku prehranu. Od te količine 27% se troši u svježem obliku dok se ostatak prerađuje korištenjem različitih tehnika konzerviranja hrane (npr. zamrzavanje, soljenje, sušenje, pušenje).[1]

Svježa riba se smatra jednim od najkvarljivijih prehrambenih proizvoda obzirom da tijekom rukovanja i skladištenja, brzo dolazi do promjene u njenoj kvaliteti što značajno ograničava rok trajanja proizvoda. Rok trajanja se definira kao vremensko razdoblje u kojem prehrambeni proizvod pod određenim uvjetima skladištenja ostaje siguran i prikladan za uporabu. Drugim riječima, u tom razdoblju treba zadržati specifična senzorska, kemijska, fizikalna, funkcionalna i mikrobiološka svojstva.[2] Kvaliteta ribe se smanjuje uslijed složenih procesa koji se u njoj javljaju pri čemu dolazi do fizikalnih, kemijskih i mikrobioloških oblika kvarenja. Enzimske i kemijske reakcije su obično odgovorne za početni gubitak svježine ribe, dok je mikrobna aktivnost odgovorna za očigledno kvarenje na osnovu čega se uspostavlja rok trajanja proizvoda.[3]

Potražnja potrošača za svježim namirnicama i namirnicama s produženim vijekom trajanja je sve veća što potiče brojna istraživanja koja su usmjerena na pronalazak novih i unaprjeđenje postojećih tehnologija prerade. Zahvaljujući tehnološkom napretku povećava se promet svježe ribe kao i ribljih proizvoda na svjetskom tržištu.[3]

Svrha ovog rada bila je ispitati parametre kakvoće ribljeg burgera tijekom pohrane na 4±2 °C te ih pokušati poboljšati dodatkom prirodnih ekstrakata.

1. OPĆI DIO

1.1. Riba kao namirnica

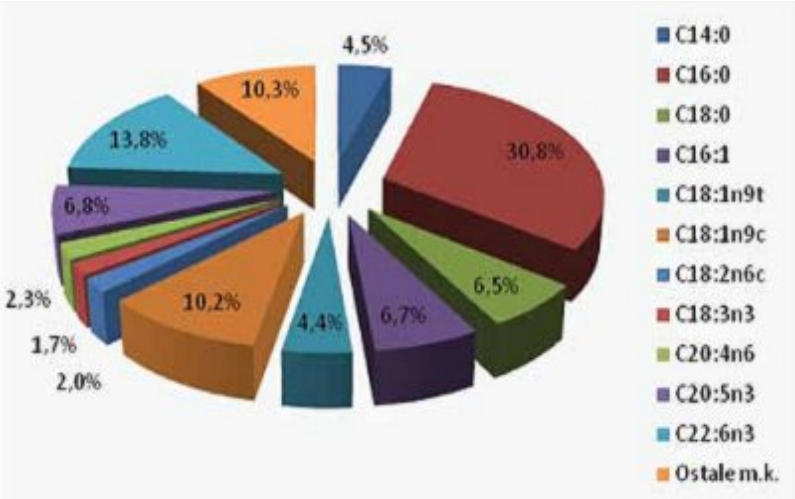
Riba predstavlja vrijedan izvor proteina i drugih hranjivih tvari za ljudsku prehranu. Uz višestruko nezasićene masnoće koje se smatraju najvrjednijim sastojcima ribljeg mesa, morska riba je bogat izvor minerala (kalcija, željeza, kalija, fosfora, selena) i vitamina (B3, B12 i D). Rezultati studija pokazuju da prisutnost dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina, osobito omega-3 polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), može spriječiti pojavu kardiovaskularnih bolesti. Prema Američkoj udruzi za srce (AHA – *engl. American Heart Association*) ribu bi trebalo konzumirati najmanje dva puta tjedno kako bi se očuvalo zdravlje i uočilo poboljšanje zdravlja srca.[4]

Kakvoća ribljeg mesa vrjednuje se prema količini masti i sastavu masnih kiselina, pa tako razlikujemo:[5]

- **nemasne** – do 3% masti, kao npr. oslić i bakalar;
- **srednje masne** – do 8% masti, poput trlje i inćuna;
- **masne** s količinom masti većom od 8% kao što su tuna, haringa i skuša.

Količina masti u mesu riba varira od 0,1 - 20% ili više. Također, masti u tijelu riba nisu ravnomjerno raspoređene pa se riba na osnovi raspodjele masti dijeli na **plavu** i **bijelu**. Udio masti u bijeloj ribi je nizak i mast je pohranjena uglavnom u jetri te djelomično u trbušnoj šupljini, dok plava riba pohranjuje masti u masnim stanicama po cijelom tijelu.[5,6]

Iako je meso ribe male energetske vrijednosti usporedno s mesom sisavaca koje se učestalije koristi u prehrani, njegovo nutritivno značenje je veliko i najvećim dijelom povezano s profilom masnih kiselina. Riblja se mast većim dijelom sastoji od PUFA, tekuće je konzistencije zbog čega se naziva ribljim uljem. Jedan od značajnih sastojaka ribljeg ulja su omega-3 PUFA (n-3). Posebno zanimanje za njih počelo je 1970. godine, nakon otkrića danskih liječnika da Eskimi na Grenlandu, unatoč relativno masnoj prehrani, rjeđe obolijevaju od kardiovaskularnih bolesti upravo zbog prehrane koja se temelji na hrani iz mora.[5,7]



Slika 1. Prosječni sastav najzastupljenijih masnih kiselina u mesu morskih riba Mediterana.[5]

Riblja mast je uglavnom sastavljena od dugolančanih (14-22 C atoma) te nezasićenih masnih kiselina (60-84%). To su uglavnom visoko nezasićene masne kiseline s 5 ili 6 dvostrukih veza (88%) što ih čini posebice podložnim oksidacijskim procesima i kvarenju.[5,6] Naravno, usporedbom različitih studija očekivane su varijacije, budući da i sastav masti i sadržaj lipida u mesu ribe ovise o sezoni ulova, veličini jedinki, spolnoj zrelosti i geografskoj lokaciji.[5,7] Od zasićenih masnih kiselina u mastima riba zastupljene su palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), miristinska (C14:0), a samo kod nekih vrsta riba u maloj koncentraciji i laurinska (C12:0).[5]

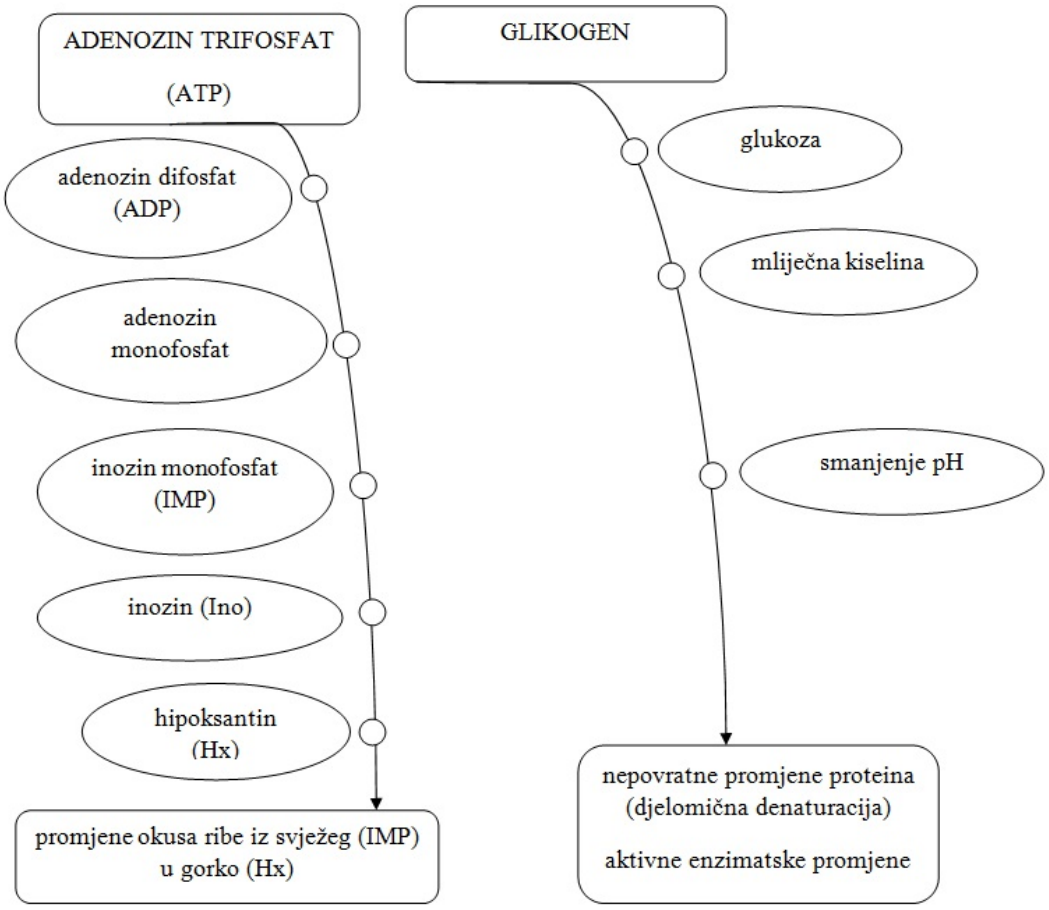
Mononezasićene masne kiseline koje su zastupljene u najvećem postotku u ribi su oleinska (C18:1) i palmitoleinska (C16:1). Osim njih, od mononezasićenih masnih kiselina prisutne su još i miristoleinska (C14:1), eikozaenska (C20:1) te eručna (C22:1n-9). Posljednje dvije masne kiseline se u najvećoj koncentraciji nalaze u mastima morskih riba. Od omega-6 masnih kiselina u lipidima riba, uz najznačajnije linolnu (C18:2n-6) te arahidonsku (C20:4n-6), analizom se mogu utvrditi i eikozadienska (C20:2n-6), eikozatrienska (C20:3n-6), dokozatetraenska (C22:4n-6) i dokozapentaenska (C22:5n-6). Najvažniji članovi omega-3 skupine su uz α-linolensku kiselinu (C18:3n-3), eikosapentaenoična (EPA, C20:5n-3) i dokozaheksaenoinska (DHA, C22:6n-3) masna kiselina. Osim njih, u lipidima riba od omega-3 masnih kiselina utvrđene su još stearidonska (C18:4n-3), eikosatrienoična (C20:3n-3) i eikosatetraenoična (C20:4n-3).[5]

1.2. Postmortalne promjene u ribi

Nakon smrti ribe, zaustavlja se opskrba tkiva kisikom i stvaraju se anaerobni uvjeti koji remete ravnotežu anaboličkih i kataboličkih procesa, bez obzira na to da li se odvijaju pod utjecajem tkivnih enzima, mikroorganizama ili kemijskih procesa. Karakter i dinamika, kao i brzina te priroda postmortalnih promjena u mišićima riba tijekom hladnog skladištenja razlikuju se između različitih vrsta pa čak i između jedinki iste vrste.[8]

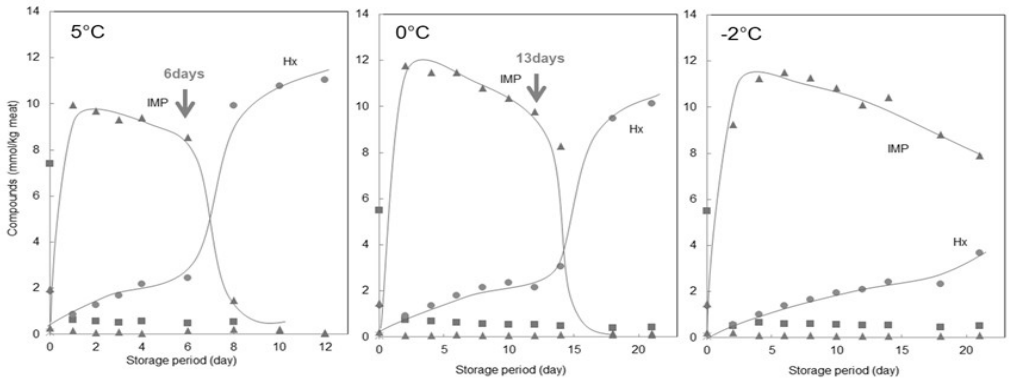
Postmortalne promjene ovise o kemijskom sastavu, početnoj mikroflori, stresu pri rukovanju, temperaturi skladištenja kao i načinu prerade i pakiranja ribe. Smatra se da postmortalne promjene u ribi započinju odmah nakon ulova izlučivanjem značajnih količina sluzi. Sluz na živim ribama je bistra i specifičnog mirisa, dok je postmortalna sluz neprozirna i sadrži albumine, lipide i fosfatide zbog čega je prikladan medij za rast mikroorganizama. Ipak, taj se proces odvija na površini riblje kože, a ne u dubljim slojevima ribljeg tkiva.[8,9]

Endogeni enzimi u mišićima ribe odgovorni su za početni gubitak svježine. Unutar ribe aktiviraju se mnogi anaerobni procesi, od kojih je najvažnija **glikoliza** (*Slika 2*). Glikoliza se nastavlja sve dok je glikogen prisutan u mišiću ili dok pH ne padne toliko nisko da smanjuje aktivnost glikolitičkih enzima. To je fermentacijski proces razgradnje glikogena (pohranjenih ugljikohidrata) pri kojem dolazi do nastanka mliječne kiseline koja rezultira smanjenje pH mišića.[8] Smanjenje pH vrijednosti može utjecati na strukturna svojstva bjelančevina i djelovanje enzima u mišićima ribe. Kao rezultat, javlja se niži kapacitet zadržavanja proteina u vodi, dolazi do omekšavanja ribljeg mesa, promjene boje i povećana učestalost stvaranja pukotina u filetima.[10] Nadalje, smanjenje pH vrijednosti mišića ribe aktivira enzime koji hidroliziraju fosfate. Najprije se razgrađuje kreatin fosfat, a potom i adenozintrifosfat (ATP). Razgradnja ATP-a nakon postmortalne smrti povezana je s nastankom spojeva vezanih s ATP-om i pojavom mrtvačke ukočenosti ili tzv. *rigor mortis* u mišićima riba. Određeni nukleotidni kataboliti kao što su inozin monofosfat (IMP) i hipoksantin (Hx) koriste se kao pokazatelji svježine i smatraju se odgovornima za poželjan okus svježe ribe i percipirani gorkasti okus pokvarene ribe (*Slika 2*).[8]



Slika 2. Postmortalne promjene u mišićima riba uslijed autolitičke razgradnje.[8]

Razgradnja ATP-a nakon smrti ribe katalizira se enzimima i to je temperaturno povezani proces, tako da napredak reakcije govori o povijesti skladištenja ribe s obzirom na vrijeme i temperaturu, ukazujući na stupanj njene svježine. Jedna od novijih studija provedena na filetima plosnatica pokazala je da se razgradnja može odgoditi skladištenjem ribe na niskim temperaturama, tako da se razgradnja na 5 °C dogodila nakon 6 dana; nakon 12 dana na 0 °C te na temperaturi od -2 °C bila je potisnuta (*Slika 3*).[8]



Slika 3. Razgradnja IMP-a i stvaranje Hx-a u filetu ribe list (*Solea vulgaris*) pohranjenom na tri temperature skladištenja.[8]

U živim bićima ATP je izvor energije koja je potrebna za mišićne kontrakcije i omogućuje elementarnim kontraktilnim proteinima mišića, aktinu i miozinu, ostati u disociranom (odvojenom) stanju. Kako se koncentracija ATP-a u mišiću smanjuje ispod 1-2 μmol/g, energija potrebna za razbijanje veza između niti aktina i miozina je nedovoljna pa ostaju ukršteni, formirajući kompleks aktin-miozin pri čemu mišić postaje sve krući i ulazi u mrtvačku ukočenost. Napredak i stopa mrtvačke ukočenosti varira između vrsta te na nju utječu mnogi čimbenici kao što su temperatura, rukovanje, veličina, fizičko i biološko stanje ribe.[10] Kod hladnovodnih riba visoke temperature skladištenja ubrzavaju početak mrtvačke ukočenosti, dok kod riba koje žive u toplijim morima isti učinak potaknut je razlikom između temperature okoline i temperature skladištenja.[8] Općenitije pravilo treba biti da što je veća navedena temperaturna razlika, jača je kontrakcija mišića i kraće vrijeme prije početka ukočenosti.[11]

S mikrobiološkog stajališta, riba u ovoj postmortalnoj fazi ima neutralnu do blago kiselu pH reakciju koja ne pogoduje bakterijskoj i enzimskoj aktivnosti pa bi se ova faza trebala produljiti primjenom niskih temperatura. Međutim, tehnološki značaj mrtvačke ukočenosti je od velike važnosti obzirom da obrada takve ribe rezultira niskim prinosom fileta, grubo rukovanje može uzrokovat nastanak pukotina i ukoliko se uklone s kosti prije smrti fileti imaju tendenciju skraćivanja.[8,10]

Povećanjem stupnja ukočenosti povećava se i pH ribljeg mesa, mišić se omekšava, a autolitičke promjene koje uključuju aktivnost proteolitičkih, lipolitičkih i amilolitičkih enzima se intenziviraju. Tijekom ove faze nastaju najjednostavnije komponente kao što su aminokiseline, slobodne masne kiseline, glicerin itd.[8]

Do određene točke, produkti razgradnje bjelančevina i lipida nisu štetni, međutim, autolitička aktivnost i produkti nastali u ovoj fazi omekšavaju mišić i stvaraju povoljne uvjete za rast mikroorganizama. U novoj okolini, posebno ako je bogata ne-proteinskim spojevima koji sadrže dušik (amonijak, trimetilamin oksid), specifične bakterije kvarenja (SSO) razvijaju se u mesu ribe i proizvode neugodne mirise, neugodne okuse i kemijske reakcije povezane s kvarenjem. Tijekom tih promjena nastaju spojevi koji mogu biti toksični za ljude kao što su biogeni amini (histamin, putrescin, kadaverin, trimetilamin), hipoksantin, hlapivi amini (TVB, TMA), malondialdehid, itd.[8]

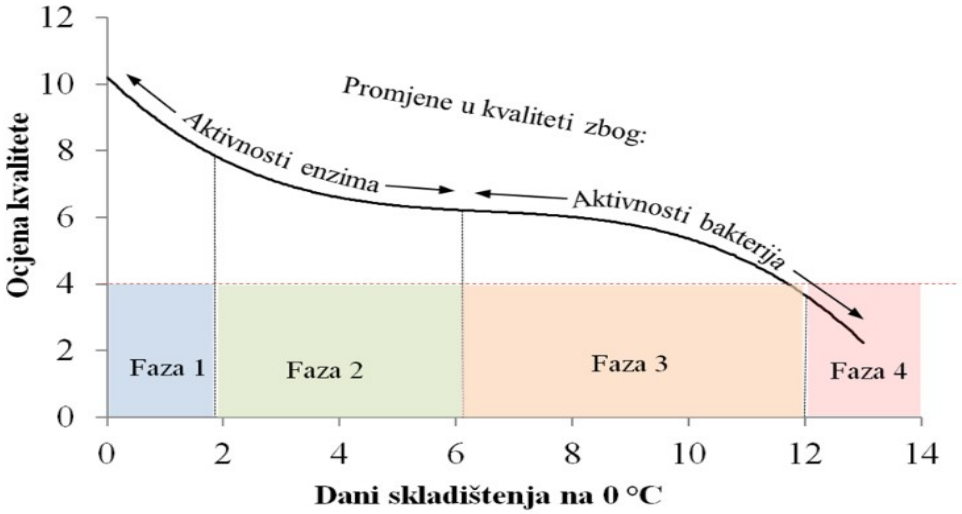
Kada se SSO povećaju na određenu razinu, njihovi proizvodi metabolizma mogu se otkriti i kvarenje se može kemijski identificirati. Kvarenje ribe također može biti nebakterijske prirode. Dvije glavne reakcije pogoršavanja kvalitete povezane su s oksidacijom lipida i hidrolizom, a obje rezultiraju proizvodnjom tvari koje imaju neugodne organoleptičke karakteristike.[8] Detekcijom metabolita koji nastaju zbog bakterijske ili enzimatske aktivnosti možemo ocijeniti stanje ribe.

1.3. Kvarenje ribe i promjene u ribi tijekom skladištenja

Kvarljiva namirnica, poput ribe, zahtijeva temperaturno reguliranje lanaca distribucije, konkretno na temperaturama približno temperaturi otapajućeg leda (hladni lanac), radi osiguranja prehrambene kvalitete, svježine i sigurnosti ribe za potrošače.[8] Neprekinuti hladni lanac se postiže kada se hrana transportira, obrađuje, skladišti i prodaje na temperaturi hladnog skladištenja unutar minimalne fluktuacije.[12]

Visoki sadržaj vode i slobodnih aminokiselina te nizak sadržaj vezivnog tkiva čine ribu kvarljivom robom i njena je kvaliteta ugrožena ukoliko temperatura pohrane, higijena tijekom rukovanja, skladištenja i prijevoza nije pod stalnim nadzorom. Gotovo 30% ulovljene ribe baca se zbog kvarenja. Kao najčešći način inhibicije biokemijskog i mikrobnog kvarenja primjenjuje se smanjenje temperature ribe ledom i mehaničko hlađenje. Ove tehnike primjenjuju se na svježe ulovljene proizvode ribarstva tijekom distribucije i plasmana na tržište kako bi se produljio njihov relativno kratak rok trajanja. Temperaturni režim je od primarne važnosti za vijek trajanja svježe ribe, ali metode pakiranja kao što su pakiranje u modificiranoj atmosferi (MAP) i vakuumsko pakiranje (VP) postaju sve popularnije tehnike čuvanja u distribuciji i plasmanu na tržište proizvoda ribarstva. U kombinaciji s hlađenjem, MAP i VP mogu produljiti rok trajanja ribe.[8]

Snižavanje temperature jedna je od mjera kontrole sigurnosti proizvoda. Ipak s vremenom, nutritivna kvaliteta ribe i njena svježina opadaju čak i na niskim temperaturama. Enzimi (odgovorni za gubitak svježine) i bakterije (odgovorne za kvarenje) su "šokirani" niskim temperaturama te će im trebati neko vrijeme da ponovno započnu svoju aktivnost. Tijekom tog razdoblja njihove „uspavanosti“ riba je iznimne nutritivne kvalitete, možemo reći ekstra kvalitete te ima ocjenu 10 (*Slika 4*). Takva kvaliteta ribe zadržava se do 48 h od ulova. Ukoliko se riba u tom razdoblju konzumira ili preradi može se sa sigurnošću utvrditi da se radi o visoko kvalitetnoj namirnici.[13]



Slika 4. Promjene u nutritivnoj kvaliteti ribe za vrijeme skladištenja na 0 °C.[13]

Nakon 48 h riba počinje gubiti na svježini, nije pokvarena, ali nije ni ekstra kvalitetna i tada govorimo o ribi dobre kvalitete (faza 2). Nakon ove faze slijedi faza 3 u kojoj imamo odstajalu ribu u kojoj su prisutni rani pokazatelji kvarenja. Na kraju, imamo fazu 4 kojoj pripada neispravna (pokvarena) riba. Rok trajanja ribe na niskim temperaturama razlikuje se od vrste do vrste, ali može se reći da je njegov raspon 8 - 14 dana.[13] Za procjenu kvalitete ribe tijekom skladištenja koriste se mnogi parametri koji obuhvaćaju promjene u mikrobnoj populaciji, kemijske promjene, uključujući produkte razgradnje ATP-a (kao što je INO, Hx), ukupni hlapivi dušik (TVB) i sadržaj trimetilamina (TMA) kao i promjene senzorskih svojstava.[3,14]

1.3.1. Hlapivi amini kao parametar za procjenu kemijske kvalitete

Hlapivi amini su karakteristične molekule odgovorne za riblji miris i aromu. Prisutne su u ribi nekoliko dana nakon ulova i zajedno sa senzorskim parametrima najčešći su kriterij za ocjenjivanje ribe. Brojni autori naglašavaju značaj i uporabu ovih kriterija kao pokazatelja svježine/ kvarenja morskih plodova.[10,15]

Skupina hlapivih amina obuhvaća: amonijak (NH_3), dimetilamin (DMA) i trimetilamin (TMA). DMA i TMA rezultat su degradacije trimetilamin oksida (TMAO). DMA uglavnom proizvode endogeni enzimi, a TMA bakterijski enzimi.[10]

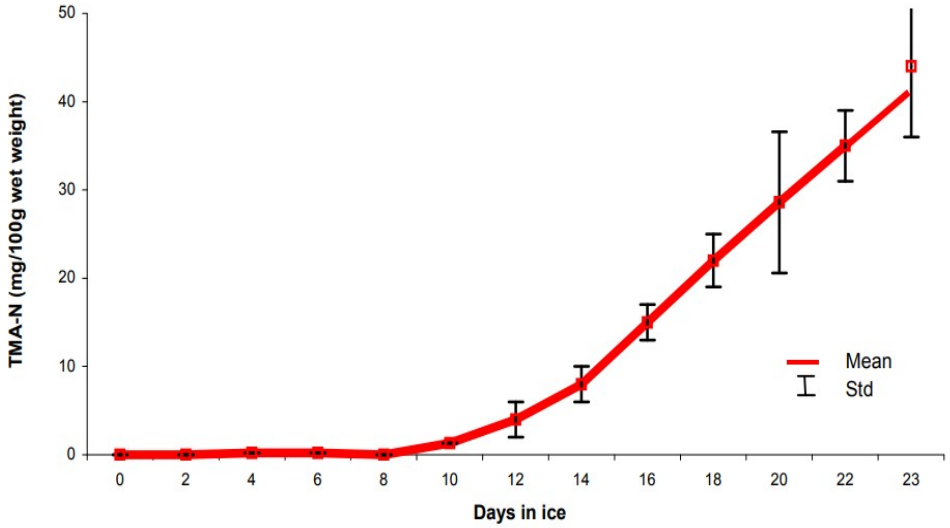
Ukupni hlapivi bazni dušik (TVB) se sastoje uglavnom od mješavine amonijaka, DMA, TMA, amina iz dekarboksilacije aminokiselina i drugih dušičnih spojeva koji postaju hlapivi nakon što postanu alkalni.[15]

1.3.1.1. TMA

TMA nastaje iz bakterijske redukcije TMAO. To je oštri hlapivi amin koji daje tipičan "riblji" miris pokvarenih plodova mora. Kod vrlo svježe ribe količina TMA je mala: blizu nule za tunu, oko 2 mg/100 g za svježi bakalar i prosječno 2 mg/100 g za neke vrste riba iz sjeveroistočnog Atlantika.[15]

Na slici 6 je prikazana promjena TMA tijekom skladištenja bakalara u ledu. TMA ostaje na početnoj razini, nižoj od 3 mg/100 g tijekom otprilike 10 dana do početka djelovanja mikroba. Nakon ove prve faze prividne stabilnosti, TMA se brzo povećava sve dok se riba ne pokvari. TMA se dobije od malog broja SSO koje nisu uvijek veliki udio ukupne bakterijske flore.[15]

U odnosu na metodu određivanja ukupnog broja bakterija, TMA analizama može se brže i preciznije odrediti stupanj pokvarenosti.[15] Glavni nedostatak TMA analize je što ne odražava ranije faze kvarenja i pouzdana je samo za određene vrste riba.[10,15] TMA je izvrstan pokazatelj kvarenja gadoidnih riba, koristan je kao brzi način objektivnog mjerenja kvalitete mnogih pridnenih riba posebno kod kasnije faze kvarenja, ali ne može se koristiti kao pokazatelj svježine (konstantna razina tijekom prvih dana skladištenja u ledu).[15]



Slika 5. Razvoj TMA u mišićima bakalara tijekom skladištenja u ledu.[15]

1.3.1.2. TVB

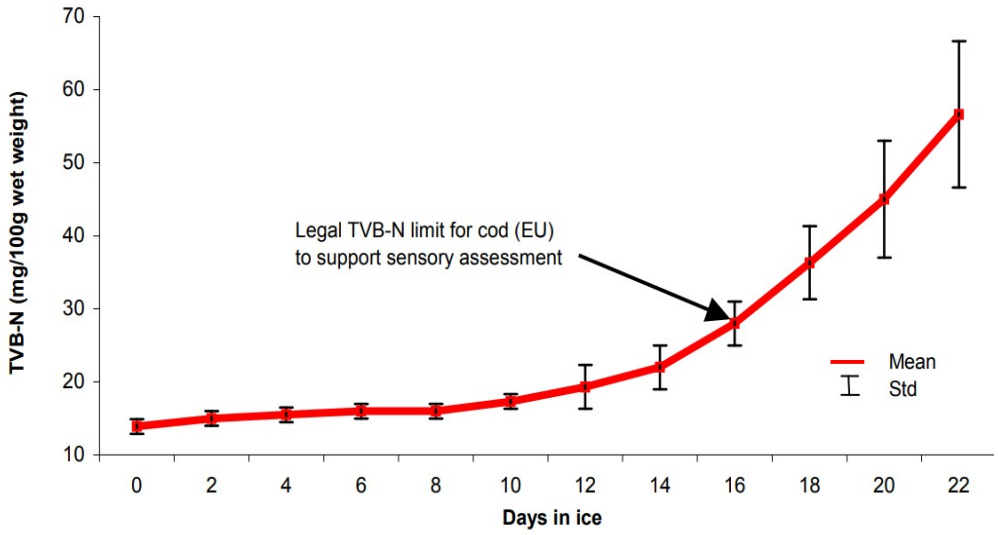
Ribe su poznate po brzom kvarenju čak i kada se čuvaju u hladnim uvjetima. Vijek trajanja za tipičnu pridnenu, bijelu obrađenu vrstu ribe je oko 7 dana u led, a nakon 14 dana riba je neupotrebljiva za konzumaciju. Ekvivalentni vijek trajanja plavih riba je još manji. Mjerenje svježine stoga je važan dio osiguranja kvalitete hladno skladištene ribe i iako se općenito smatra da su osjetilne metode najprikladnije, ulogu u mjerenju svježine mogu imati i ne-senzorske metode.[18]

TVB je jedan od najčešće korištenih parametara za ocjenu kvalitete ribe. Predstavlja zbroj amonijaka, DMA, TMA i drugih osnovnih hlapivih dušičnih spojeva. U svježe ulovljenoj ribi sadržaj TVB-a općenito je veći od 10 mg/100 g i ne prelazi 15 mg/100 g, osim za plavu ribu u kojoj ga može biti i do 30 mg/100 g (16 - 18 mg/100 g u sardini, 18 - 20 mg/100 g u skuši, oko 30 mg/100 g u tuni albacore).[15]

Tijekom prvih dana skladištenja sadržaj TVB-a lagano se povećava što se može odraziti na proizvodnju amina autolitičkim procesima (*Slika 7*). Ipak, u nekim eksperimentima na malim ribama, poput morske trave ili mola, tijekom prvog tjedna skladištenja u ledu, došlo je do smanjenja sadržaja TVB-a što može biti uslijed ispuštanja amonijaka ledom koji se topi. Nakon ranijih dana skladištenja u ledu, TVB sadržaj koje uglavnom proizvode bakterije kvarenja, se povećava.[15]

Analize TVB-a odražavaju samo faze naprednijeg kvarenja ribe i smatraju se nepouzdanima za procjenu svježine ribe u ranoj fazi skladištenja, budući se ovim analizama ne može odrediti način kvarenja (bakterijski ili autolitički).[10]

TMA i TVB ne mogu zamijeniti organonoleptički pregled jer je za većinu ribljih vrsta, njihov sadržaj u mesu relativno nizak tijekom skladištenja nakon čega populacija bakterija raste. U kasnijoj fazi kvarenja, kada je riba blizu odbacivanja, pronalaze se sve veće količine TMA i TVB. Iako se ova dva parametra ne mogu upotrijebiti kao univerzalni pokazatelji kvalitete za sve riblje vrste, još uvijek su najbolji kemijski pokazatelji koji se relativno jednostavno analiziraju i mogu pomoći pri određivanju kvarenja nekih vrsta riba.[15]



Slika 6. Razvoj TVB-a u mišićima bakalara tijekom skladištenja u ledu.[15]

1.4. Utjecaj dodataka na produljenje roka trajnosti

Proizvodi ribarstva, za razliku od druge hrane, vrlo su osjetljivi na mikrobiološko i kemijsko kvarenje zbog visoke razine vlage, hranjivih sastojaka i pH. Kvaliteta i rok trajanja ribe i ribljih proizvoda se često poboljšava korištenjem raznih dodataka ili aditiva tijekom rukovanja, prerade i skladištenja. Nekoliko antimikrobnih spojeva kao npr. nitriti, sulfiti, organske kiseline i antioksidansi kao što su butilirani hidroksianisol (BHA), butilirani hidroksitoluen (BHT) i tert-butil hidroksikinon (TBHQ) koriste se od davnina kako bi se odgodilo mikrobno kvarenje i oksidativne promjene u ribama. Obzirom da metaboliti ovih sintetskih konzervansa imaju potencijalne toksikološke učinke na ljudsko zdravlje, u posljednjem desetljeću istraživači su se usredotočili na pronalazak sigurnih, učinkovitih i prihvatljivih prirodnih konzervansa.[20]

Jedni od takvih su i biljni ekstrakti koji sadrže brojne bioaktivne spojeve. Prirodni proizvodi, bilo kao čisti spojevi ili kao biljni ekstrakti, zahvaljujući svojoj kemijskoj raznolikosti, osiguravaju neograničene mogućnosti za kontrolu mikrobnog rasta.[22] Biljni ekstrakti bogati polifenolima i flavonoidima lako se dobivaju iz prirodnih izvora poput začina, ljekovitog bilja, voća i povrća. Ekstrakti iz biljnih izvora uglavnom se smatraju sigurnim (GRAS) zbog tradicionalne uporabe te brojnih toksikoloških studija koje su potvrdile njihovu sigurnost.[20]

Antioksidativno i antimikrobno djelovanje biljnih ekstrakata je davno prepoznato, stoga ne čudi njihova primjena u prehrambenoj industriji. U industriji prerade ribe zamjena sintetskih antioksidansa biljnim ekstraktima postaje izazov i za istraživače i prerađivače.[20]

1.4.1. Bioaktivni fenolni spojevi

Fenoli se uglavnom izoliraju iz svježih ili osušenih dijelova biljaka poput lišća, korijena, stabljike, sjemenke i kore, a ekstrakcija otapalom je najčešće korišten postupak za pripremu ekstrakata iz biljnih materijala zbog jednostavne upotrebe, učinkovitosti i široke primjenjivosti. Za ekstrakcije fenola iz biljnih materijala koriste se razna otapala, uključujući metanol, etanol, aceton, etil acetat i njihove kombinacije te se obično isti nakon same ekstrakcije uklanjaju iz ekstrakta. Bioaktivnost dobivenog ekstrakata prepisuje se fitokemikalijama, posebno polifenolima čija koncentracija i raznolikosti ovisi o vrsti biljnog materijala i postupku ekstrakcije.[20]

Polifenoli su sekundarni biljni metaboliti koji sadrže jedan ili više aromatičnih prstenova s nekoliko hidroksilnih skupina, a najčešće ih dijelimo u četiri kategorije:[20]

- **flavonoidi,**
- **fenolne kiseline** i
- **lignani.**

Polifenolni spojevi prisutni u biljnim ekstraktima pokazuju potencijalna antioksidacijska svojstva zbog svoga redoks potencijala koji im omogućuje da djeluju kao donori vodika, reducirajuće tvari, kelatori metalnih iona i hvataći radikala. Aktivne hidroksilne skupine prisutne u molekularnoj strukturi polifenola su komponente koje mogu stupiti u interakciju sa slobodnim radikalima i inhibirati lipidnu oksidaciju. Također, polifenoli mogu pokazati jače djelovanje protiv superoksid radikala, peroksinitrita, kelata bakra i željeza te spriječiti nastajanje slobodnih radikala u reakcijama kataliziranim metalima. Prisutnost funkcionalne skupine "–OH" u strukturi i njen položaj u prstenu fenolne ili flavonoidne molekule određuje antioksidacijski kapacitet molekule.[20,21]

Osim antioksidacijskog potencijala, fenoli u biljkama pokazuju i antimikrobnu aktivnost, pa tako mogu biti smrtonosni za mikrobne stanice ili mogu inhibirati proizvodnju sekundarnih metabolita. Glavno mjesto interakcije fenolnih molekula s bakterijom je vanjska stanična membrana ili citoplazmatska membrana pri čemu nastaju oštećenja koja mogu rezultirati smrću bakterije.[20]

Na osnovu toga razlikujemo nekoliko mehanizama djelovanja fenolnih molekula na bakterijske stanice. Tako npr. do smrti bakterija može doći uslijed fizičkog poremećaja membrane koje za posljedicu ima gubitak makromolekula iz unutrašnjosti ili pak uslijed interakcije fenolnih molekula s proteinima pri čemu dolazi do deformacije u strukturi i funkcionalnosti membrane. Treći predloženi mehanizam djelovanja fenola na bakterijsku stanicu je ometanje funkcija membrane kao što su: transport elektrona, unos hranjivih tvari, sinteza proteina i nukleinskih kiselina te aktivnost enzima. Učinak fenolnih spojeva ovisi i o koncentraciji, pa tako kod malih koncentracija fenoli utječu na enzimsku aktivnost, dok kod visokih koncentracija uzrokuju denaturaciju proteina.[20]

1.4.2. Ružmarin

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis*) je biljna vrsta koja pripada obitelji Lamiaceae. Glavne komponente zastupljene u ekstraktima ružmarina su karnonska kiseline, karnozol i ružmarinska kiselina koja inhibira rast mikroorganizama. Uz antimikrobnu aktivnost, ekstrakt ružmarina pokazuje antioksidacijsku aktivnost i usporava oksidaciju lipida.[20]

Ružmarin u ljekovite svrhe se koristi još od davnina, najčešće za ublažavanje bolova u mišićima, poboljšavanje memorije, jačanje imunološkog sustava pa čak i za poticanje rasta kose. Svježi ružmarin sadrži veliku količinu vitamina (A, B6, C) te tiamin, folat, magnezij, kalcij, bakar, željezo i mangan. Obiluje antioksidansima i dijetalnim vlaknima.[26]



Slika 7. Ružmarin.[26]

1.4.3. Češnjak

Češnjak (*Allium sativum*) je biljka koja pripada porodici Alliaceae, a ime je dobio po spoju alicinu. Pripada među najstarije povrćarske kulture, a podrijetlom je s područja srednje Azije. Lukovice češnjaka sadrže: vodu, bjelančevine, masti, ugljikohidrate, vlakna, minerale (natrij, kalij, magnezij, kalcij, fosfor, sumpor, željezo) i velik broj vitamina (karoten, vitamin E, B1, B2, B3 i C). Češnjaku zdravstvenu vrijednost daje organosumporni spoj alicin koji nastaje iz alina djelovanjem enzima alinaze. Osim sumpornih spojeva češnjak sadrži i biološki aktivne fenole. Antioksidacijska aktivnost ovih spojeva pridonosi snižavanju krvnog tlaka i kolesterola u krvi, te sprječavanju kroničnih bolesti i raznih vrsta karcinoma.[27]

Češnjak se može naći u obliku kapsula i praha, kao dodatak prehrani i tako se razlikuje od konvencionalne hrane ili sastojaka hrane. Louis Pasteur bio je prvi koji je opisao antibakterijski učinak sokova od luka i češnjaka. Povrće iz porodice Allium-a, a posebno češnjak, pokazuje široku antibiotsku aktivnost protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Terapeutski učinak češnjaka moguć je zbog organskih sumpornih spojeva topljivih u ulju i vodi koji su ujedno odgovorni za tipičan miris i okus češnjaka. Tiosulfinati igraju važnu ulogu u antibiotskoj aktivnosti češnjaka.[28]



Slika 8. Češnjak.[27]

1.4.4. Klinčić

Klinčić (*Syzygium aromaticum*) je drvo iz porodice Myrtaceae i jedan je od najcjenjenijih začina koji se stoljećima koristi kao konzervans te u mnoge ljekovite svrhe. Porijeklom je iz Indonezije, ali danas se uzgaja u svim dijelovima svijeta. Ova biljka predstavlja jedan od najbogatijih izvora fenolnih spojeva kao što su eugenol, eugenol acetat i galna kiselina te ima veliki potencijal primjene u farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj i poljoprivrednoj industriji. Uz eugenol, kojem se pripisuje protuupalno djelovanje, klinčić sadrži velik broj minerala (kalcij, željezo, magnezij, fosfor, cink, bakar, mangan, selen), a bogat je izvor vitaminima (C, B6, E, K, folnom kiselinom, tiaminom, riboflavinom i niacinom). [29,30]

Antioksidativno i antimikrobno djelovanje klinčića veće je od brojnog voća, povrća i drugih začina te stoga zaslužuje posebnu pažnju.[29] Konzumiranje klinčića može pomoći kod niza bolesti, kao što su zubobolja i loše zadah, ubija jajašca parazita i loše bakterije, prirodni je afrodizijak, rastvara opasne krvne ugruške te inhibira razvoj raka dojke. Klinčić se također koristi i kao dodatak prehrani cijeli, mljeven ili u koncentriranom obliku kao ulje.[30]



Slika 9. Klinčić.[30]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijal

U eksperimentalnom dijelu diplomskog rada kao biljni materijal korišteni su liofilizirani vodeni ekstrakti začinskog bilja ružmarina, klinčića i češnjaka. Vodeni ekstrakti (15 g/100 mL) su pripravljeni korištenjem ultrazvučne kupelji (2 h, 60 °C). Po završetku ekstrakcije uzorci su filtrirani preko grubog filter papira te potom liofilizirani.

Za pripremu ribljeg burgera korišteni su fileti svježeg lubina iz uzgoja *(Dicentrarchus labrax)* i pišmolja *(Merlangius merlangus)* u omjeru 60:40. Filetirana riba (4 kg) je nakon ručnog filetiranja oprana u mješavini vode s ledom. Fileti su samljeveni pomoću uređaja za mljevenje mesa (Tritacarne 32/TN, Fimar, Rimini, Italija) i u smjesu je dodano 1% soli (NaCl-a). Smjesa je podijeljena na tri dijela od kojih se prvi koristio kao kontrola (čisto meso + sol), u drugi dio smjese je dodano 1,5% češnjaka i 0,5% ružmarina (smjesa A), dok je u treći dio smjese dodano 1,5% češnjaka i 0,5% klinčića (smjesa B). Od dobivenih smjesa pripravljeni su riblji burgeri korištenjem preše za pravljenje burgera (SAP, Italija) težine cca 170 g (promjer svakog burgera je 130 mm) koji su potom vakumirani (MultiVAC C500, Kansas City, SAD) i skladišteni u hladnoj sobi na temperaturi od 4±2 °C do analize.

2.2. Reagensi

- srebrov nitrat ($AgNO_3$), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- 2% kalijev bikromat ($K_2Cr_2O_7$), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- 2-tiobarbiturna kiselina (TBK_2), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- 7,5% trikloroctena kiselina (TCA), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- natrijev hidroksid (NaOH), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- borna kiselina (H_3BO_3), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- kloridna kiselina (HCl), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- 35% formaldehid (CH_2O), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- fosfatni pufer (Phosphate Buffered Saline, PBS), Biolife, Italija
- 98% trimetilamin-hidroklorid (TEP), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka

2.3. Metode

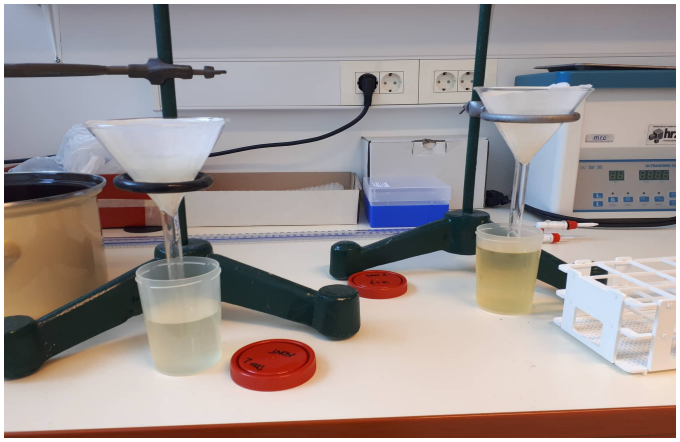
2.3.1. Određivanje pH vrijednosti ribljih burgera

Mjerenje pH vrijednosti vrlo je važno za praćenje kvalitete ribljeg mesa. Postupak se provodi tako da se dio mesa (10 g) odvaže i homogenizira s 100 mL destilirane vode. Potom se smjesa stavi na miješanje 30 min na sobnoj temperature i nakon toga se očita pH vrijednost pomoću pH-metra.

2.3.2. Metoda određivanja udjela soli (NaCl)

Udio soli u uzorcima ribljih burgera određen je metodom po Mohru. Ova metoda se koristi za određivanje koncentracije kloridnih iona u različitim uzorcima vode (npr. slatka voda, morska voda, voda na ušću, itd.). Koncentracija kloridnih iona u otopini određuje se titracijom sa srebrovim nitratom ($AgNO_3$).

U odmjernoj tikvici od 100 mL odvaže se 2 g ribljeg uzorka i doda 75 mL destilirane vode te kuha u kupelji na 90 °C 15-20 minuta. Uzorci se potom ohlade, nadopune do oznake i filtriraju. Ako je uzorak kiseo, neutralizira se sa NaOH. U 25 mL alikvota doda se 4-5 kapi 5%-tnog kalijeva bikromata i titrira sa 0,1 M otopinom srebrova nitrata do prijelaza iz žute boje u narančastu boju.



Slika 10. Filtracija uzoraka.

Udio soli u uzorcima ribljih burgera računaju se prema izrazu:

$$\textbf{Udio NaCl (\%)} = V(AgNO_3) \times f(AgNO_3) \times 0{,}00585 \times 4 \times 100/m$$

Gdje je:

V - utrošak otopine $AgNO_3$ korištene za titraciju (mL)

f - faktor otopine $AgNO_3$ korištene za titraciju (1)

m - odvaga uzorka (g)

2.3.3. Metode određivanja biokemijskih parametara kvalitete

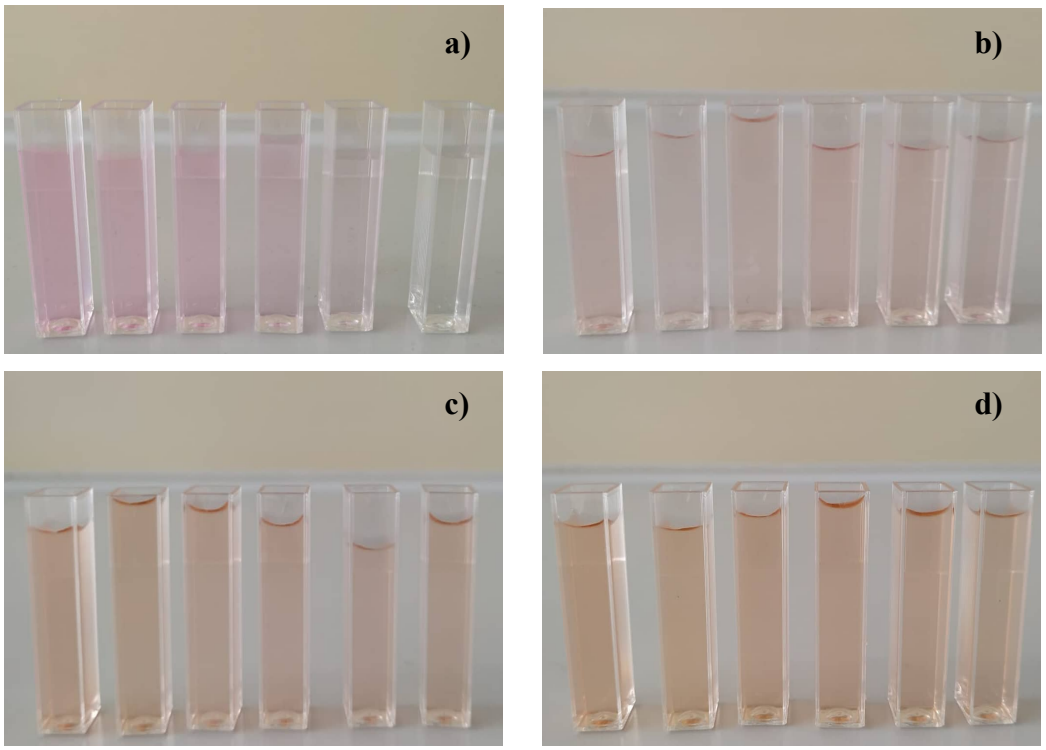
2.3.3.1. Određivanje sekundarnog parametra oksidacije

U svrhu određivanja stupnja razvoja oksidacijskih procesa u hrani najčešće se koristi tiobarbiturni test (TBA) kojim se određuju sekundarni produkti lipidne oksidacije, od kojih je najvažniji malonaldehid (MDA), produkt oksidacije nezasićenih masnih kiselina. Ovaj test se zasniva na reakciji MDA s 2-tiobarbiturnom kiselinom (TBK_2) pri čemu nastaje ružičasto obojeni kompleks MDA-TBK_2 koji ima apsorpcijski maksimum pri 532-535 nm.

Sekundarni produkti oksidacije u mesu ribljih burgera određeni su sva tri uzorka na način da su se parametri TBA pratili svakih 2 dana tijekom desetodnevnog perioda skladištenja na 4 ± 2 °C.

Postupak se sastoji od homogenizacije 20 g uzorka mesa s 7,5%-tnom otopinom trikloroctene kiseline (40 mL TCA) uz pomoć štapnog miksera. Uzorak se ostavi stajati 30 min, nakon čega se filtrira. Po 5 mL filtrata se pipetira u falkon epruvete, u svaku se doda po 5 mL 0,02 M otopine TBK, epruvete se zatvore i urone u vodenu kupelj na 100 °C tijekom 40 min. Nakon toga se uzorci ohlade i alikvoti prenesu u kivete te im se očita absorbancija pri 538 nm. Za slijepu probu umjesto filtrata koristila se destilirana voda.

Rezultati se izražavaju preko baždarnog pravca za standardne otopine TEP-a u μM MDA/100 g.



Slika 11. Pripremljeni uzorci (a) TEP standarda; (b) kontrole; (c) smjese A i (d) smjese B za određivanje TBA vrijednosti.

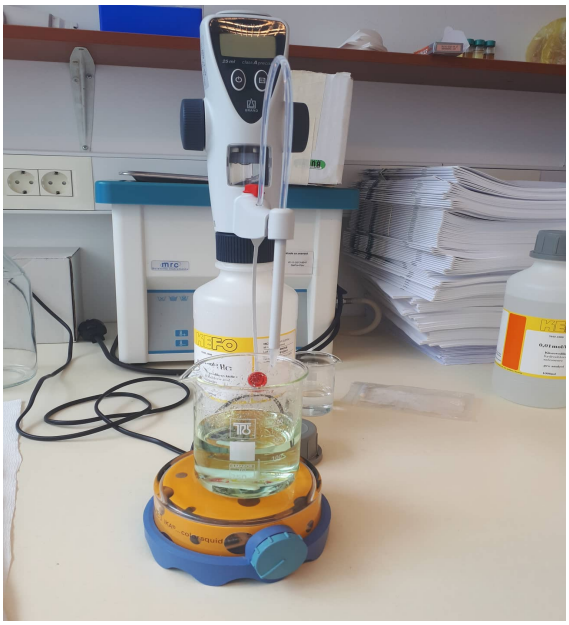
2.3.3.2. Metode određivanja sadržaja TVB i TMA

TVB i TMA određivani su iz ribljeg burgera, dobivenog homogenizacijom 100 g uzorka s 200 mL 7,5% TCA. Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani na 3700 okr/ min tijekom 7 minuta, a supernatant je potom profiltriran kroz Whatman No.1 filter papir kako bi se uklonili svi dijelovi tkiva ili prisutne masti. 25 mL filtrata destilirano je uz dodatak 5 mL NaOH otopine (10 g/L) u automatskoj jedinici za destilaciju (Kjeldahl Distillation Unit model B-324, Büchi, Švicarska). Destilat je hvatan u otopinu borne kiseline (4 g/L) s 0,04 mL indikatora (metilcrveno i bromkrezol zelena) do volumena od 50 mL i titriran standardiziranom otopinom kloridne kiseline (0,01 mol//L) do krajnje točke titracije pri pH 5,00±0,1 koristeći automatski titrator opremljen miješalicom i pH elektrodom (Methrom 702 SET/MET titrino). Analize su rađene u triplikatu, a rezultati su izračunati iz volumena utrošene standardne kiseline, te izraženi kao srednja vrijednost mg TVB/100g mesa ribe. Slijepa proba provedena je korištenjem 25 mL trikloroctene kiseline.

Kako bi se istim postupkom odredio sadržaj TMA u uzorcima, u tubu destilatora prije destilacije dodano je 20 mL 35% otopine formaldehida kako bi se blokirali primarni i sekundarni amini.[31] Kalibracijska krivulja rađena je na temelju 5 točaka dobivenih analizom standardne otopine trimetilamin-hidroklorida.



Slika 12. Automatska jedinica za destilaciju.



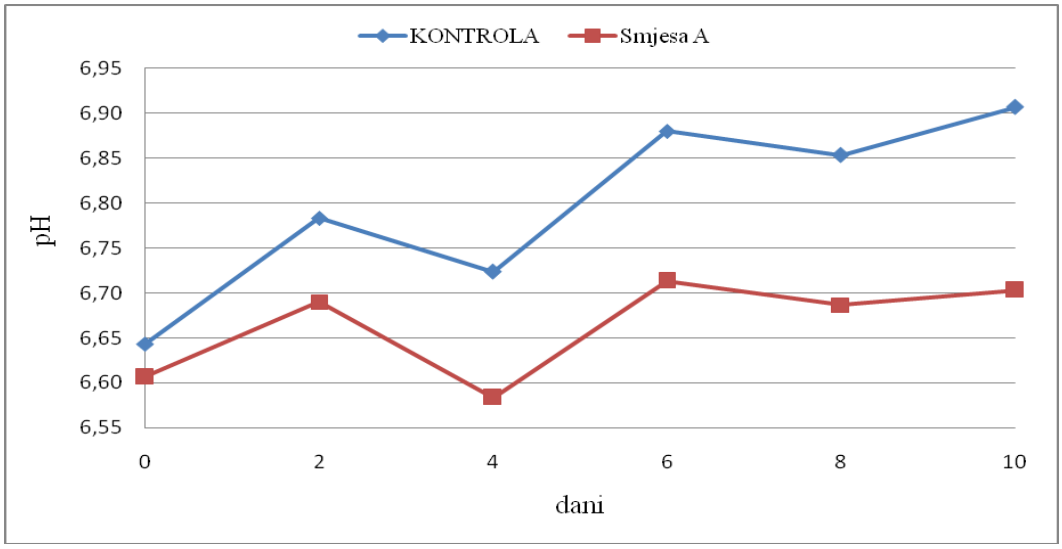
Slika 13. Automatski titrator.

2.3.4. Metode određivanja ukupnog broja bakterija

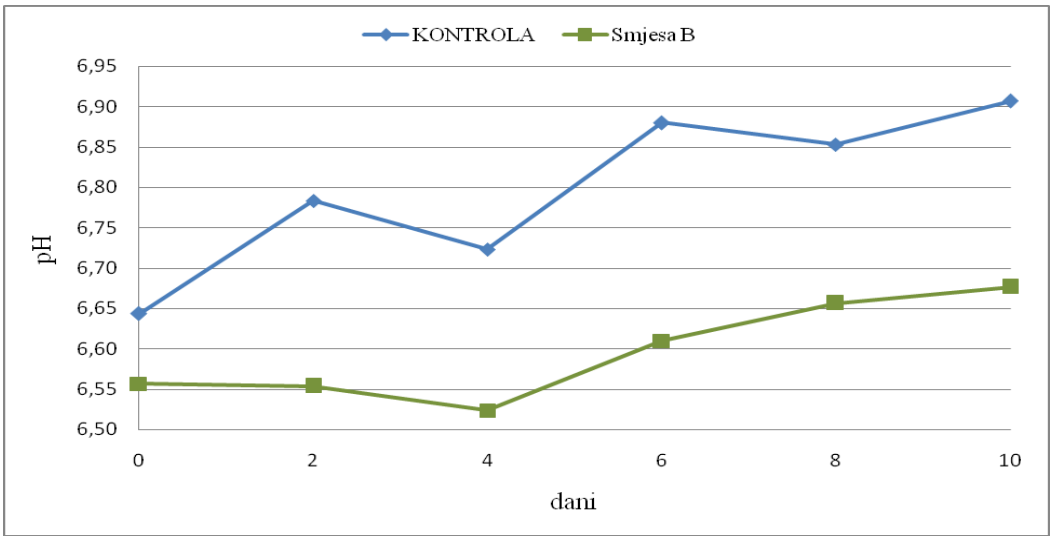
Ukupan broj mezofilnih i psihrofilnih bakterija određen je metodom razlijevanja. Odvaganih 25 g uzorka ribljeg burgera prebaci se u Stomacher vrećice u koje se doda 225 mL peptona pri sterilnim uvjetima i sadržaj se homogenizira (D). Nakon homogenizacije dio filtrata se prebaci u sterilnu čašicu i koristi za pripremu decimalnih razrijeđenja (D 10^{-1} –10^{-4}). Na ovaj način određivan je broj aerobnih mezofilnih bakterija (AMB) i aerobnih psihrofilnih bakterija (APB) na plate count agaru (PCA). Prethodno pripravljen i sterilizirani agar ohlađen na temperaturu od 45-55 °C prelijeva se preko 1 mL određenog decimalnog razrijeđenja (10^{-1}–10^{-4}) uzorka u sterilnoj Petrijevoj zdjelici. Laganim kružnim pokretima sadržaj se u Petrijevoj zdjelici promiješa i ostavi na sobnoj temperaturi da se skruti. Za određivanje AMB Petrijeve zdjelice se inkubiraju 24-48 h pri 30 °C, dok se za određivanje APB stavljaju u hladnjak na +7 °C tijekom 10 dana. APB i AMB prepoznaju se kao kolonije bijele boje koje se prebrojavaju pomoću brojača kolonija.

3. REZULTATI

3.1. Rezultati određivanja pH vrijednosti

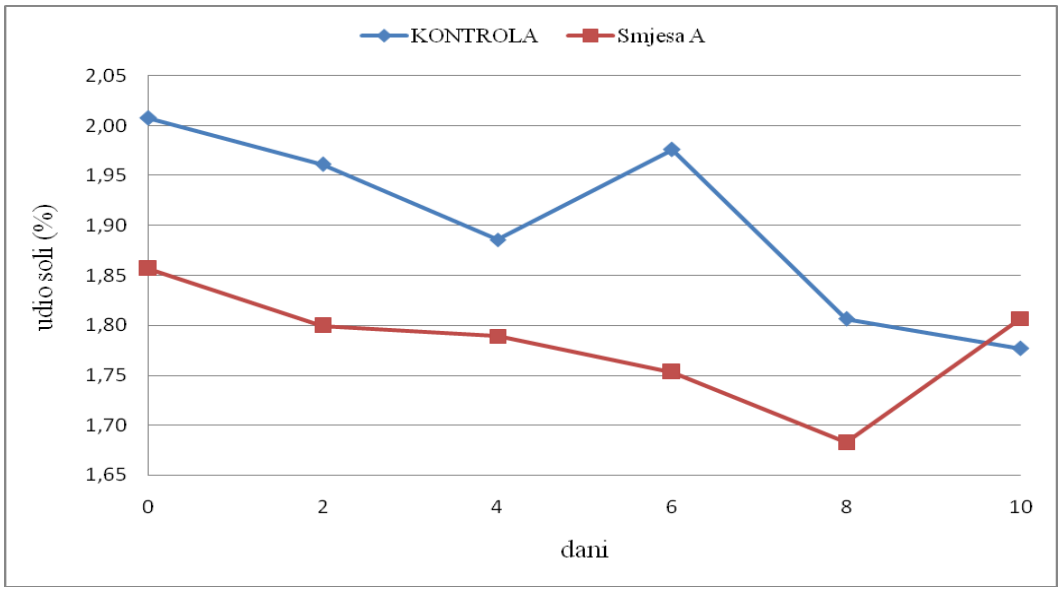


Slika 14. Usporedni grafički prikaz promjene pH vrijednosti kontrolnog uzorka i smjese A tijekom skladištenja.

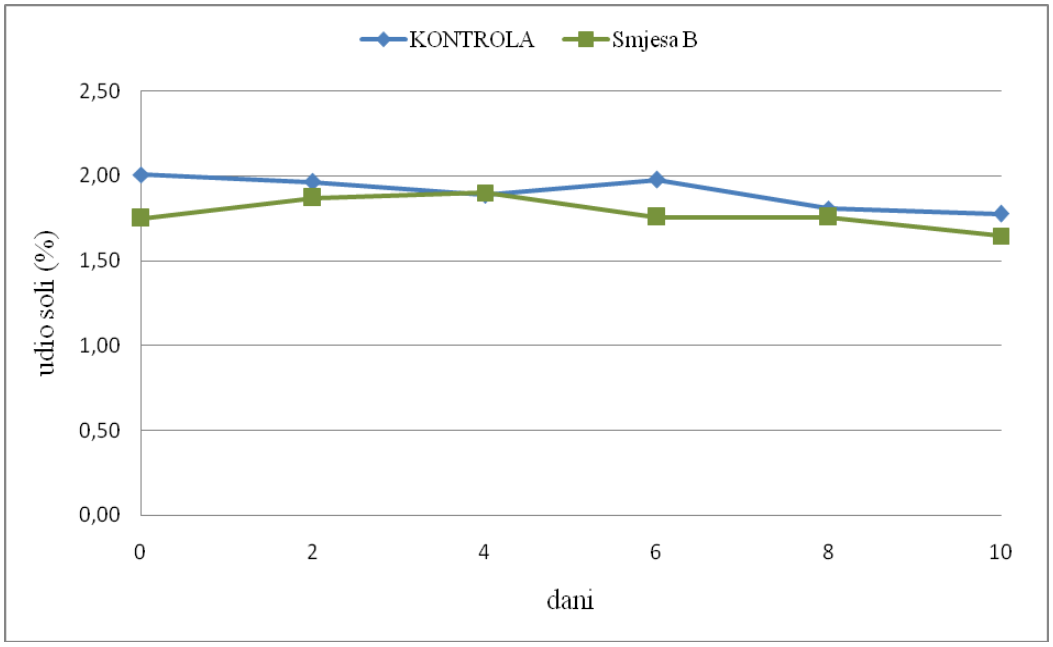


Slika 15. Usporedni grafički prikaz promjene pH vrijednosti kontrolnog uzorka i smjese B tijekom skladištenja.

3.2. Rezultati određivanja udjela soli



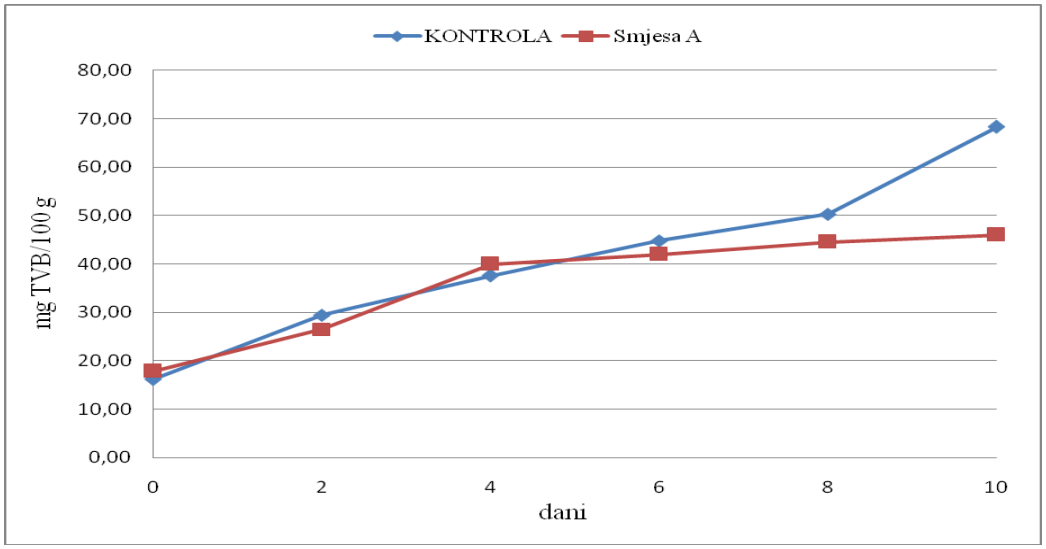
Slika 16. Usporedni prikaz promjene udjela soli kontrolnog uzorka i smjese A tijekom skladištenja.



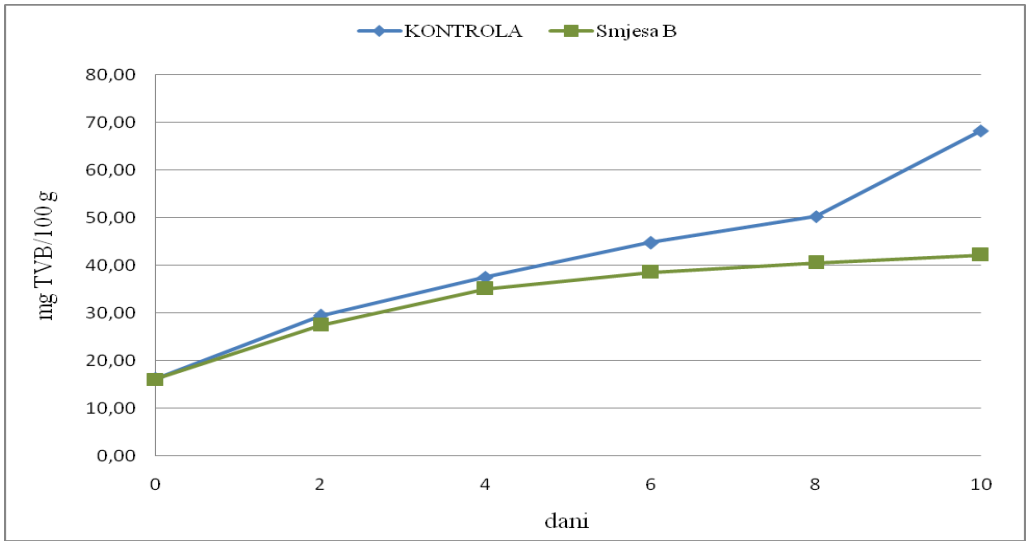
Slika 17. Usporedni prikaz promjene udjela soli kontrolnog uzorka i smjese B tijekom skladištenja.

3.3. Rezultati određivanja biokemijskih parametara kvalitete

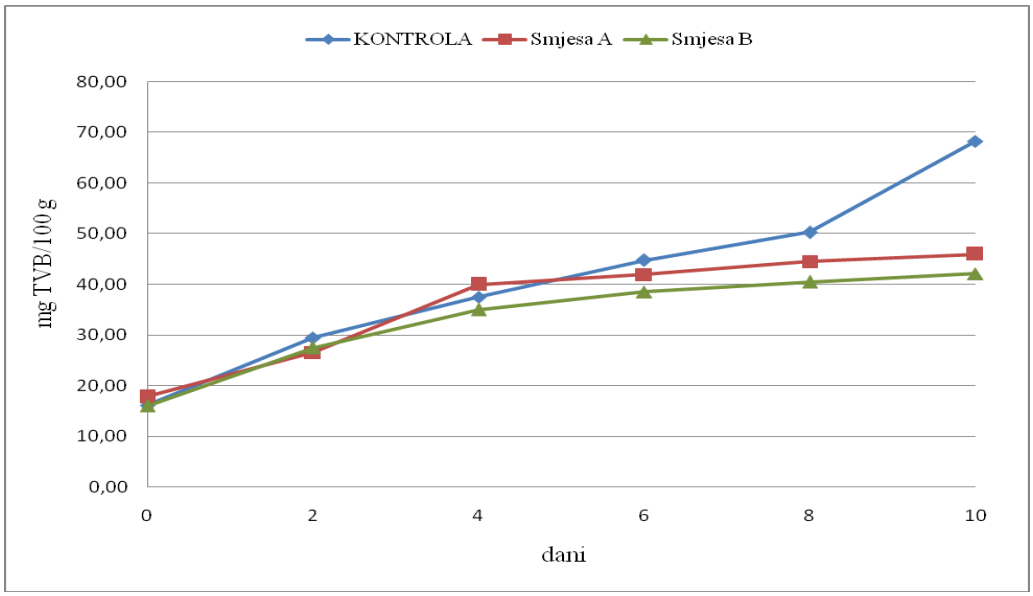
3.3.1. Rezultati određivanja TVB



Slika 18. Prikaz promjene količine TVB u kontrolnom uzorku i smjesi A tijekom skladištenja.

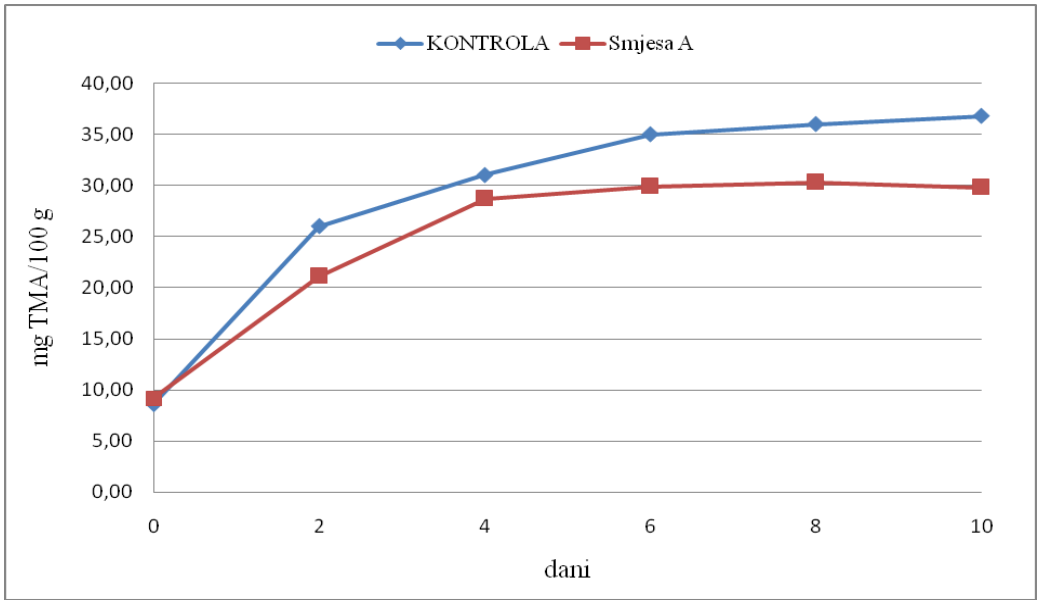


Slika 19. Prikaz promjene količine TVB u kontrolnom uzorku i smjesi B tijekom skladištenja.

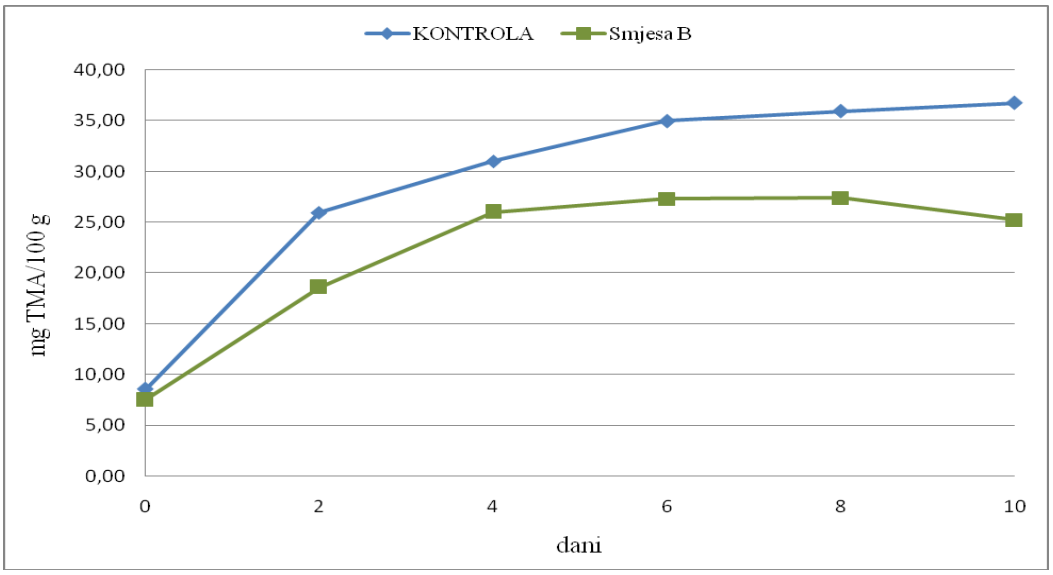


Slika 20. Usporedni prikaz promjene količine TVB u analiziranim uzorcima ribljih burgera.

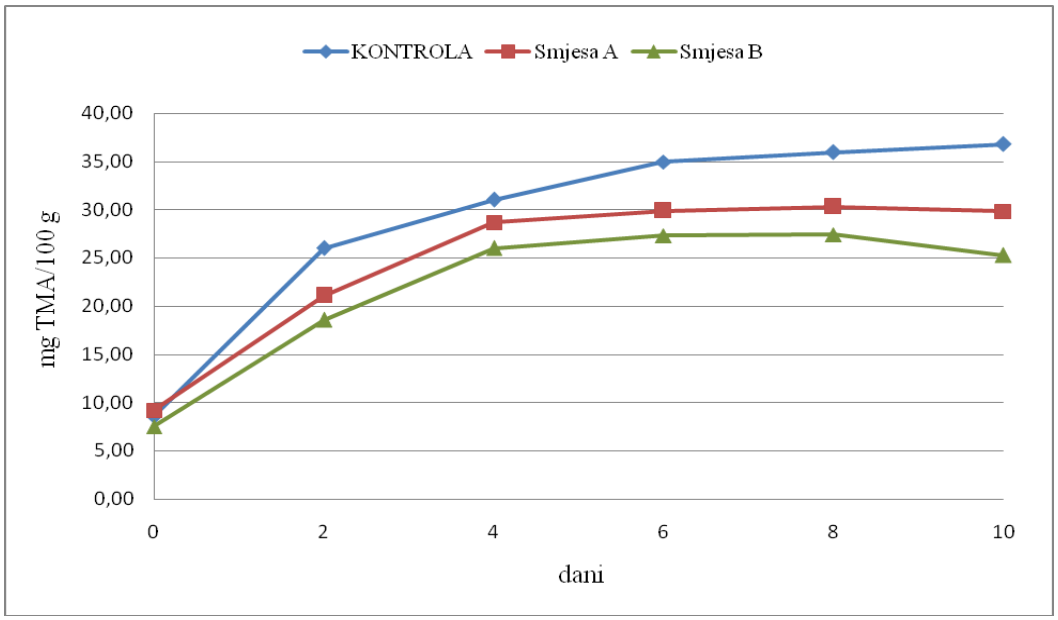
3.3.2. Rezultati određivanja TMA



Slika 21. Prikaz promjene količine TMA u kontrolnom uzorku i smjesi A tijekom skladištenja.

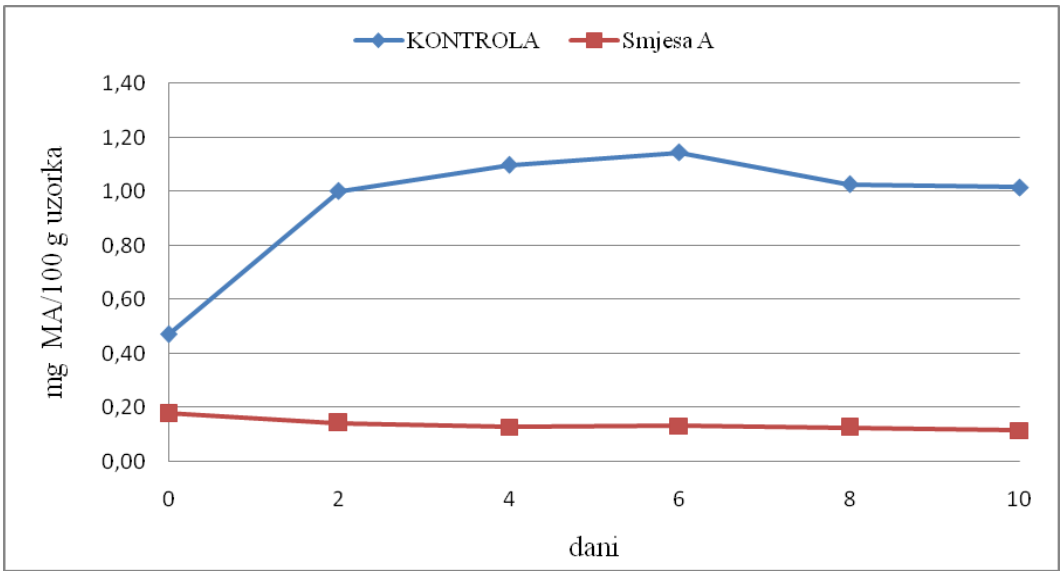


Slika 22. Prikaz promjene količine TMA u kontrolnom uzorku i smjesi B tijekom skladištenja.

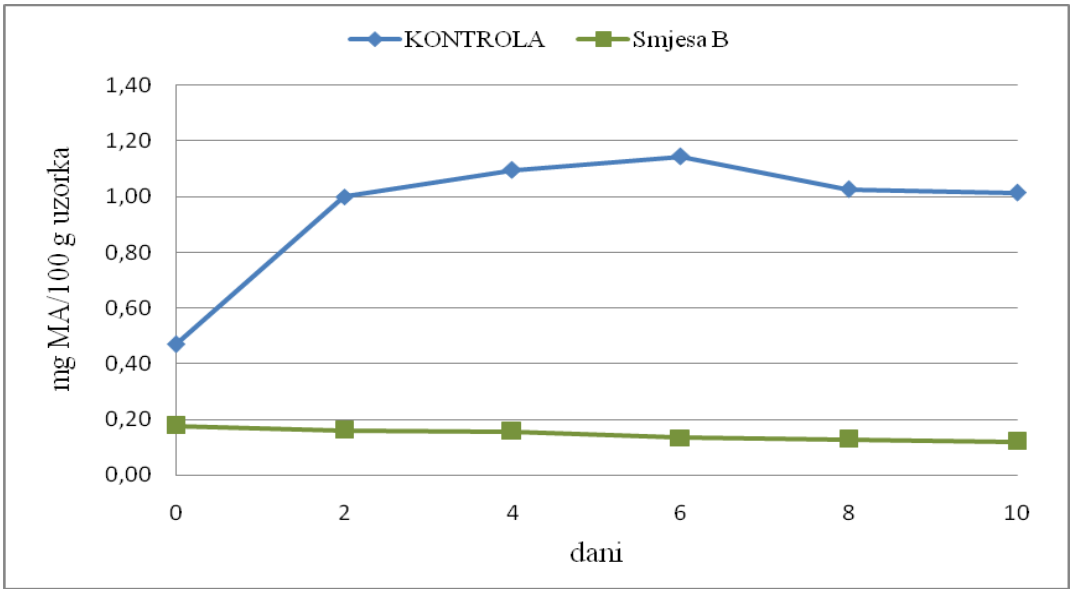


Slika 23. Usporedni prikaz promjene količine TMA u analiziranim uzorcima ribljih burgera.

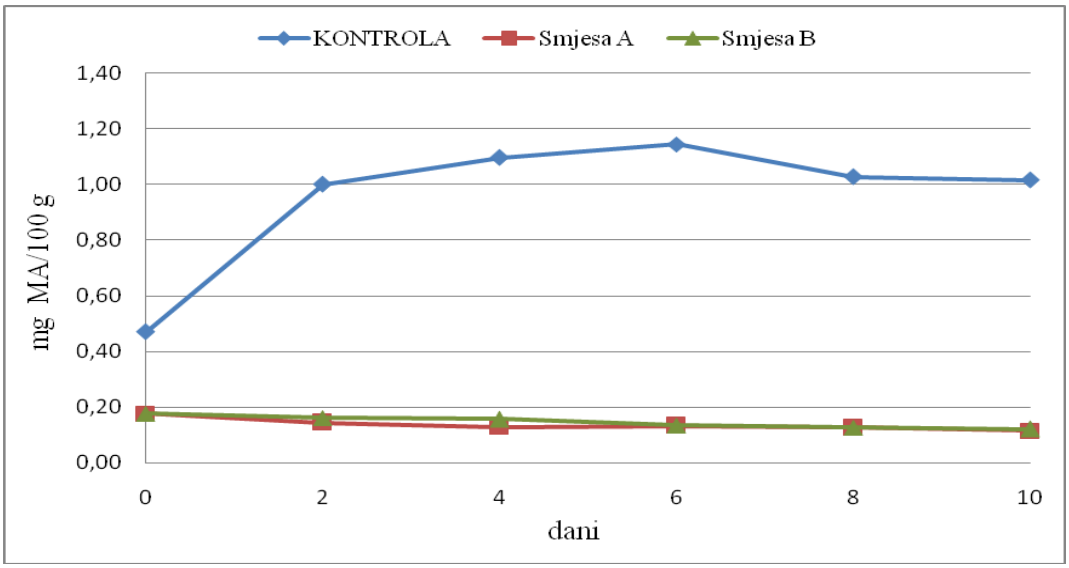
3.3.3. Rezultati određivanja TBA



Slika 24. Oksidacijska stabilnost u kontrolnom uzorku i smjesi A tijekom skladištenja.



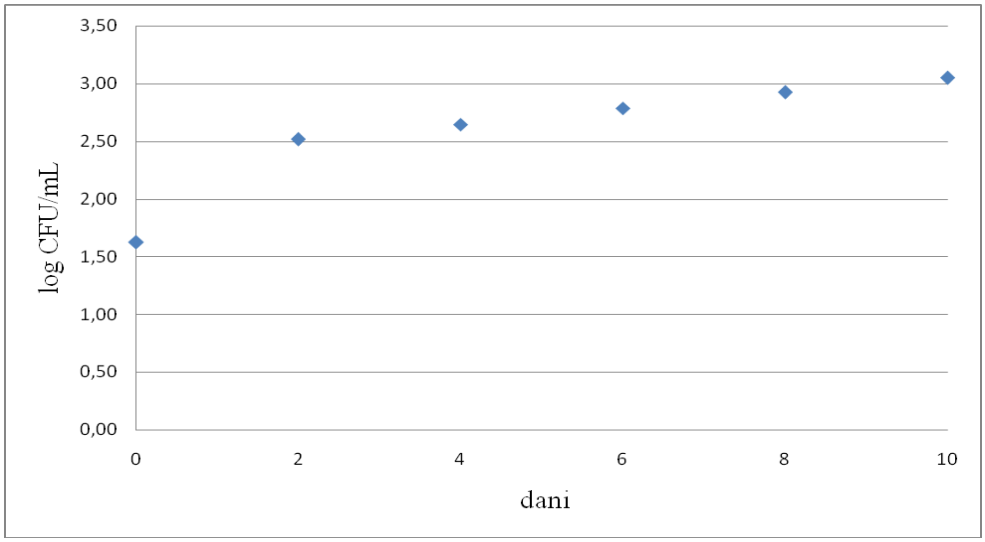
Slika 25. Oksidacijska stabilnost u kontrolnom uzorku i smjesi B tijekom skladištenja.



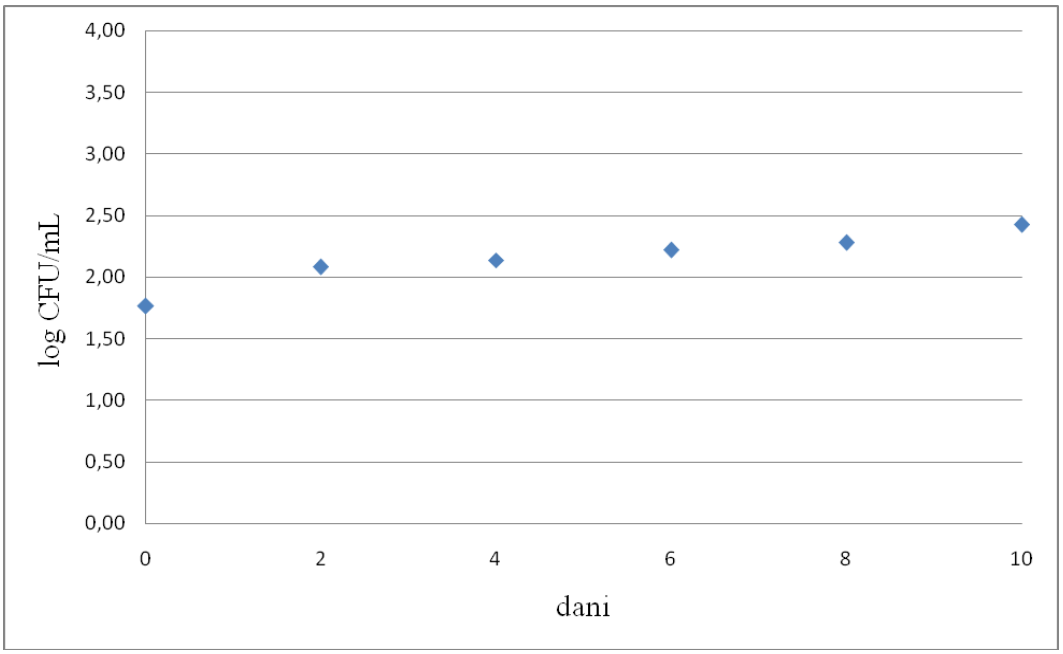
Slika 26. Usporedni prikaz oksidacijske stabilnosti u analiziranim uzorcima ribljih burgera.

3.4. Rezultati određivanja ukupnog broja bakterija

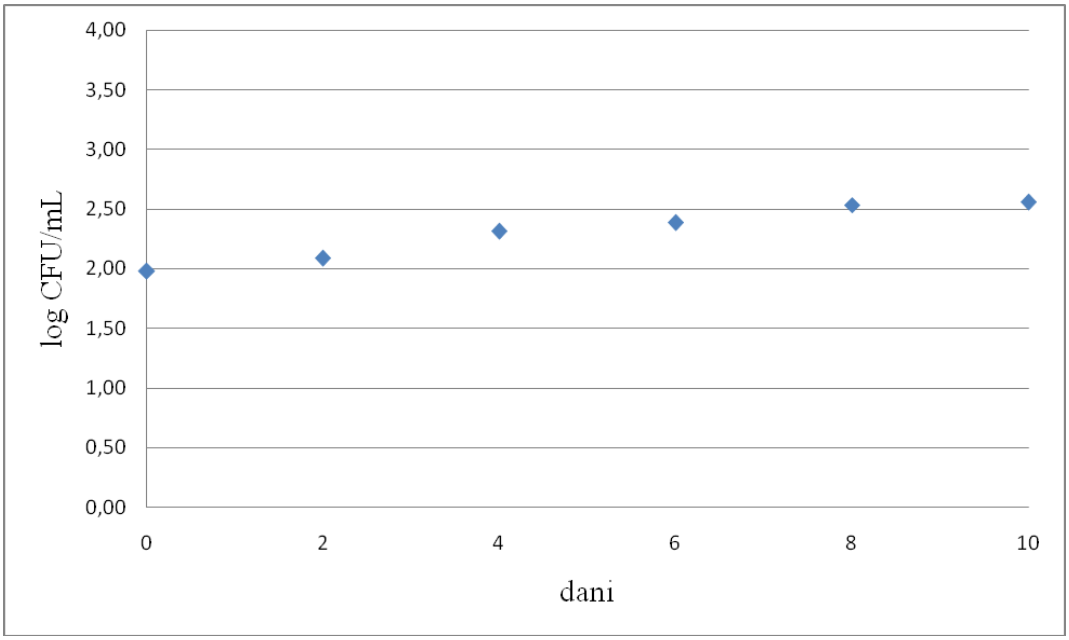
3.4.1. Rezultati određivanja ukupnog broja mezofila



Slika 27. Grafički prikaz promjene ukupnog broja mezofila u kontrolnom uzorku tijekom skladištenja.

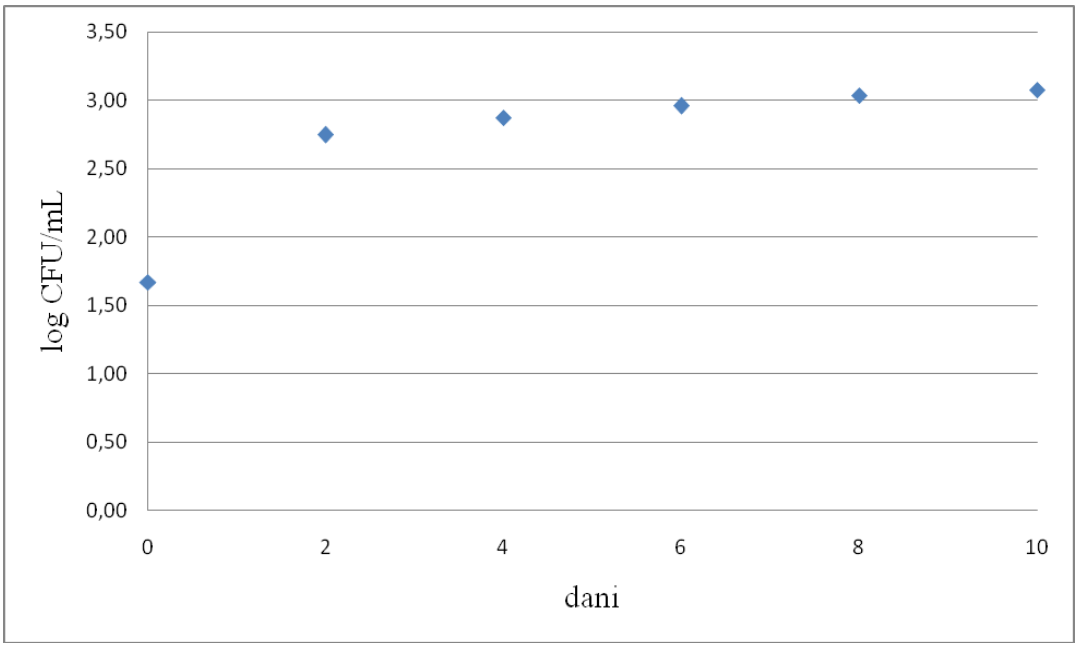


Slika 28. Grafički prikaz promjene ukupnog broja mezofila u smjesi A tijekom skladištenja.

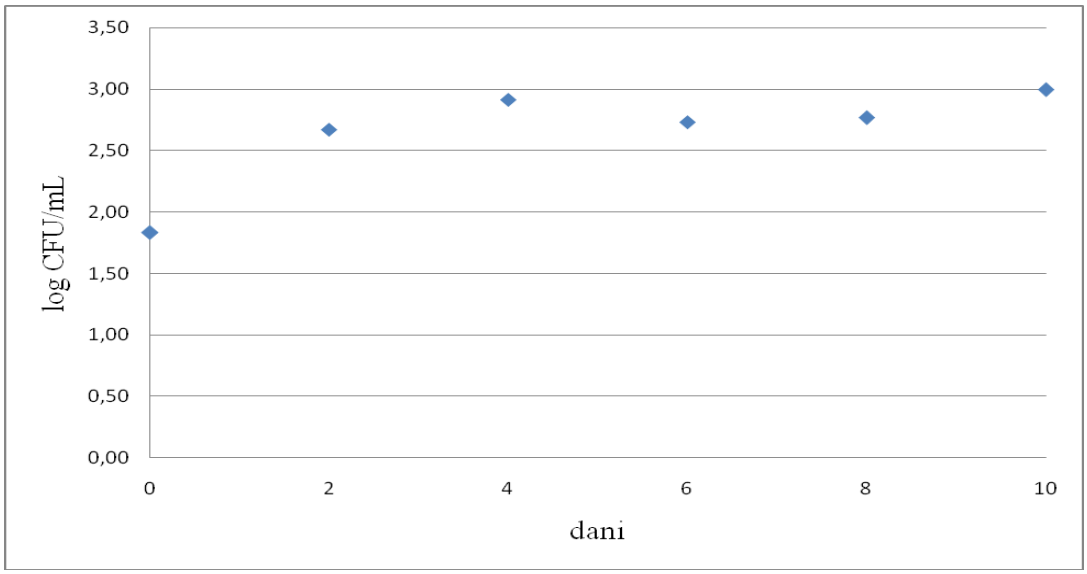


Slika 29. Grafički prikaz promjene ukupnog broja mezofila u smjesi B tijekom skladištenja.

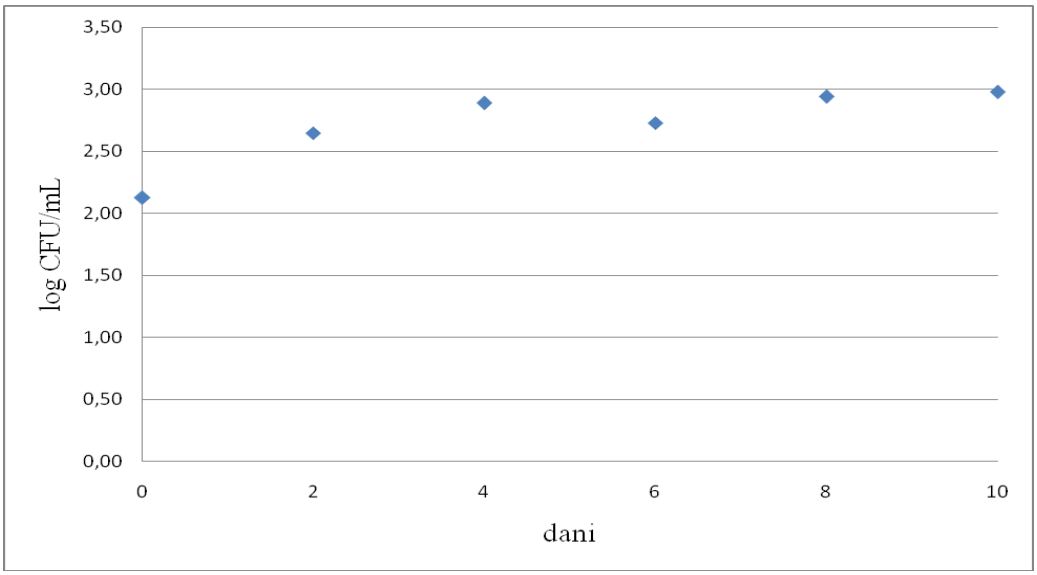
3.4.2. Rezultati određivanja ukupnog broja psihrofila



Slika 30. Grafički prikaz promjene ukupnog broja psihrofila u kontrolnom uzorku tijekom skladištenja.



Slika 31. Grafički prikaz promjene ukupnog broja psihrofila u smjesi A tijekom skladištenja.



Slika 32. Grafički prikaz promjene ukupnog broja psihrofila u smjesi B tijekom skladištenja.

4. RASPRAVA

Interes potrošača za svježom i neprerađenom ribom i/ili ribljim proizvodima svakim danom sve više raste. Obzirom da je riba lako kvarljiva namirnica, jedan od načina "prirodnog" poboljšanja kvalitete i produljenja roka trajnosti je korištenje prirodnih dodataka odnosno biljnih ekstrakata.

U svrhu ispitivanja utjecaja biljnih ekstrakata na parametre kakvoće ribljih burgera u ovom radu su korištena tri različita biljna ekstrakta, ekstrakti ružmarina, klinčića i češnjaka. Preliminarna ispitivanja antioksidacijske aktivnosti i antimikrobnog potencijala navedenih začinskih biljaka pokazala su izuzetno dobra biološka svojstva ovih ekstrakata. Kako bi pojačali njihovu aktivnost dodali smo ih u riblje burgere u vidu smjesa: smjesa A – češnjak+ružmarin i smjesa B – češnjak+klinčić. Utjecaj ekstrakata na parametre kakvoće ispitao se korištenjem različitih kemijskih, fizičkih i mikrobioloških metoda, a dobiveni rezultati su prikazani na *slikama 14-32*.

Promjene pH vrijednosti ribljih burgera tijekom čuvanja (10 dana) prikazani su na *slikama 14* i *15* na kojima se može uočiti da je kontrolni uzorak imao nešto veće pH vrijednosti u odnosu na riblje burgere s dodanim ekstraktima. Kod sve tri testirane smjese ribljih burgera početna pH vrijednost je iznosila 6,6, dok je nakon 10 dana pH vrijednost porasla kod kontrolnog uzorka na 7,0, a kod smjesa A i B iznosila je 6,7.

Jako male promijene uočavaju se i u sadržaju soli (S*lika 16* i *17*). Udio soli u kontrolnom uzorku tijekom skladištenja pokazuje lagani pad od 0,2% (sa 2,01% na 1,78%), dok je kod burgera koji sadrže smjese A i smjese B taj pad nešto manje uočljiv. Početna vrijednost udjela soli za smjesu B je iznosila 1,75%, a nakon 10-tog dana 1,65%. U odnosu na kontrolni uzorak i smjesu A, u smjesi B je bio najniži udio soli od 1,75% na početku skladištenja, a nakon 10 dana iznosio je 1,56%.

Za ocjenu kakvoće ribe ili ribljih proizvoda vrlo važni su biokemijski parametri kvalitete. Kao najčešći parametri određuju se TVB i TMA. Rezultati određivanja TVB i TMA vrijednosti u ispitivanim ribljim burgerima (*Slika 20* i *23*) ukazuju na visoki udio hlapivih amina. No važno je istaknuti da su dodaci smjesa biljnih ekstrakata u riblje burgere imale manji nastanak ovih spojeva u odnosu na kontrolni uzorak.

Grafičkim prikazom usporedbe promjene količine TVB kontrolnog uzorka i smjese A tijekom skladištenja (*Slika 21*) vidljivo je da je kontrolni uzorak na početku imao 16,18 mg TVB/100 g, te da njegov sadržaj s vremenom eksponencijalno raste sve dok ne dosegne vrijednost od 68,32 mg TVB/100 g nakon 10-tog dana. Udio TVB-a u smjesama A i B također eksponencijalno raste no u nešto manjoj mjeri, odnosno u smjesi A i B taj je udio bio nakon 10 dana 0,7-0,6 puta niži u odnosu na kontrolni uzorak. Na *slikama 21-23* također uočavamo eksponencijalnu promjenu u sadržaju TMA. Važno je istaknuti da u prvim danima skladištenja bilježimo nagli rast sadržaja TMA (slično kao i kod TVB) koji nakon 4 dana minimalno raste tijekom daljnjeg skladištenja. Početne TMA vrijednosti svih uzoraka su se kretale oko 8-9 mg TMA/100 g dok su te vrijednosti nakon 10 dana skladištenja dosegle vrijednosti od 36,76 mg TMA/100 g kontrolni uzorak, 29,81 mg TMA/100 g smjesa A i 25,24 mg TMA/100 g smjesa B.

Parametar oksidativne stabilnosti ili sadržaj MDA (*Slike 24-26*) pokazuje utjecaj dodataka biljnih ekstrakata na stabilnost ribljih burgera. Na osnovu prezentiranih rezultata može se uočiti da tijekom svih 10 dana skladištenja vrijednosti TBA testa nisu rasle u odnosu na kontrolni uzorak u kojem je vidljiv eksponencijalni rast. Također početne TBA vrijednosti za smjese A i B su bile 2,5 puta niže u odnosu na kontrolni uzorak a nakon 10 dana skladištenja razlika u koncentraciji MDA u smjesama su bile gotovo 10 puta niže od kontrolnog uzorka.

Ozogul i sur. (2011) također su uočili pozitivan učinak ekstrakata čajeva ružmarina i kadulje na filete sardine pakirane u vakuumu i skladištene pri 3±1 °C u vidu smanjenog stvaranja amonijaka i BA.[20,24] Sardina kojoj je dodan ekstrakt čaja od ružmarina ili kadulje pokazala je niže kemijske značajke zbog antioksidativnih svojstava ekstrakata. Praćenjem senzornih svojstava autori su zaključili da je rok trajanja sardine 13 dana za kontrolne skupine i 20 dana za skupine tretirane ekstraktima. Obzirom na dobivene rezultate dali su zaključak o mogućoj primjeni prirodnih ekstrakata čaja od ružmarina ili kadulje u prehrambenoj industriji u svrhu produljenja roka trajanja.[23] Nedavno je studija koju su proveli Gao i sur. (2014) pokazala da sinergijski učinak ekstrakta ružmarina zajedno sa nisinom inhibira raspad proteina, lipidnu oksidaciju, raspad nukleotida i mikrobni rast kod fileta strijele modrulje (*Trachinotus ovatus*) tijekom skladištenja pri 4 °C.[20,25]

Rezultati određivanje ukupnog broja (log CFU/g) mezofilnih i psihrofilnih bakterija tijekom skladištenja prikazani su na *slikama 27-32*. Tijekom skladištenja uočava se kontinuirani porast ukupnog broja bakterija, kao i razlike između kontrolnog uzorka i testiranih smjesa. Kod kontrolnog uzorka dolazi do porasta ukupnog broja kolonija mezofilnih bakterija s 1,62 na 3,05, kod smjese A s 1,76 na 2,42 i kod smjese B s 1,98 na 2,56. Sličan odnos se uočava i u sadržaju psihrofilnih bakterija. Kontrolni uzorak pokazuje rast s 1,67 na 3,08, smjesa A s 1,83 na 2,99, a smjesa B s 2,12 na 2,98. Iz ovih podataka može se uočiti da se kod kontrolnog uzorka razvio najveći broj ukupnih mezofila i psihrofila, a kod smjese B najmanji ukupni broj bakterija. Slabiji rast mikroorganizama u ribljim proizvodima u odnosu na kontrolni uzorak dokazali su i Kenar i sur (2010) korištenjem ekstrakta ružmarina i čaja od kamilice.[23] Istaknute studije u ovom radu pokazale su i učinkovitost ekstrakta ružmarina u koncentracijama od 0,4 i 0,8% u kontroli rasta bakterija u uzorcima burgera atlantske skuše skladištenih u vakuumu tijekom hlađenja. Kenar i sur. (2010) dokazali su da uranjanje fileta sardine u etanolni ekstrakt ružmarina i čaj od kadulje (*Salvia officinalis*) produžuje rok trajanja vakuum pakiranja do 7 dana u uvjetima čuvana pri 3±1 °C.[20,23]

5. ZAKLJUČCI

Zaključci ovog rada su:

- Male promjene u sadržaju soli i pH vrijednosti ribljih burgera.
- Visok sadržaj TVB i TMA u svim ispitanim uzorcima.
- Dodatak smjese ekstrakata poboljšava oksidativnu stabilnost ribljih burgera.
- Dodatak ekstrakata smanjuje ukupan broj mezofilnih bakterija.
- Smjesa češnjaka i klinčića najbolje je očuvala analizirane parametre kakvoće burgera.

6. LITERATURA

1. Sallam IK, Ahmed MA, Elgazzar MM, Eldaly AE. Chemical quality and sensory attributes of marinated Pacific saury (*Cololabis saira*) during vacuum-packaged storage at 4˚C. Food Chem. 2007;102:1061-1070.
2. Institute of Food Science and Technology (IFST). Shelf life of foods - guidelines for its determination and prediction. London, UK: 1993.
3. Sallam IK. Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. Food Chem. 2007;101(2):592-600.
4. Ozogul Y, Ozogul F, Kuley E, Ozkutuk SA, Gokbulut C, Kose S. Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black Sea, during chilled storage. Food Chem. 2006;99:752-758.
5. URL: http://veterina.com.hr/?p=32109#Riba (Pristupljeno: 24.07.2019.)
6. Cvrtila Ž, Kozačinski L. Kemijski sastav mesa ribe. Meso; 2006.
7. Prato E, Biandolino F. Total lipid content and fatty acid composition of commercially important fish species from the Mediterranean, Mar Grande Sea. Food Chem. 2012;131(4):1233-1239.
8. Šimat V, Generalić Mekinić I. Advances in Chilling. U: Ozogul Y, ur. Innovative Technologies in Seafood Processing, London, UK: CRC Press; 2019. str.424.
9. Šimat V, Bogdanović T, Poljak V, Petričević S. Changes in fatty acid composition, atherogenic and thrombogenic health lipid indices and lipid stability of bogue (*Boops boops* Linnaeus, 1758) during storage on ice: Effect of fish farming activities. J Food Compos Anal. 2015;40:120-25.
10. Huss HH, editor. Quality and quality changes in fresh fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) fisheries technical paper, Rim, Italija: 1995.
11. Jessen F, Nielsen J, Erling E, Larsen E. Chilling and Freezing of Fish. In Seafood Processing Technology, Quality and Safety: Boziaris IS. ur. Oxford, UK: John Wiley & Sons; 2014. str. 33-59.
12. Bantle M, Claussen IC, Tolstorebrov I. Superchilling of organic food. SINTEF Energy Research: 2016.
13. URL:http://www.fishfromcroatia.com/hr/o-kvaliteti-i-sigurnosti-ribe-hrvatske (Pristupljeno: 29.07.2019.)

14. Dalgaard P. Fresh and lightly preserved seafood. In: Shelf Life Evaluation of Foods, 2 izdanje, Man CMD & Jones AA, ur. Gaithersburg, USA: Aspen Publishing Inc; 2000. str.110-139.
15. URL:https://archimer.ifremer.fr/doc/2005/rapport-6486.pdf (Pristupljeno: 30.07.2019.)
16. LeBlanc RJ, Gill TA. Ammonia as an objective quality index in squid. Can. Inst. Food Sci Technol J. 1984;17:195-201.
17. Paarups T, Sanchez JA, Moral A, Christensen H, Bisgaard M, Gram L. Sensory, chemical and bacteriological changes during storage of iced squid (*Todaropsis eblanae*). J Appl Microbiol. 2002;92(5):941-950.
18. Howgate P. Critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. EJE, Agric Food Chem. 2010;9(1):58-88.
19. Kim MK, Mah JH, Hwang HJ. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. Food Chem. 2009;116(1):87-95.
20. Viji P, Gudipati V, Ravishankar NC, Srinivasa Gopal TK. Role of Plant Extracts as Natural Additives in Fish and Fish Products - A Review. Fishery Technology. 2017;54:145-154.
21. Rice-Evans CA, Miller JM, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol. Med. 1996;20:933-956.
22. Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. Int J Food Microbiol. 2012;156:1-7.
23. Kenar M, Ozogul F, Kuley E. Effects of rosemary and sage tea extracts on the sensory, chemical and microbiological changes of vacuum-packed and refrigerated sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. Int J Food Sci Tech. 2010;45(11):2366-2372.
24. Ozogul F, Kuley E, Kenar M. Effects of rosemary and sage tea extract on biogenic amines formation of sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. Int J Food Sci Tech. 2011;46:761-766.
25. Gao M, Feng L, Jiang T, Zhu J, Fu L,Yuan D, Li J. The use of rosemary extract in combination with nisin to extend the shelf life of pompano (*Trachinotus ovatus*) fillet during chilled storage. Food Control. 2014;37:1–8.
26. URL:https://www.teklic.hr/featured/sve-sto-biste-trebali-znati-o-ruzmarinu-superbiljci-s-mediterana/138739/ (Pristupljeno: 12.09.2019.)
27. URL: https://www.savjetodavna.hr/2007/09/29/uzgoj-cesnjaka/ (Pristupljeno: 16.09. 2019.)

28. Kumar Y, Agarwal S, Srivastava A, Kumar S, Agarwal G, Khan Alam MZ. Antibacterial activity of Clove (*Syzygium aromaticum*) and Garlic (*Allium sativum*) on different pathogenic bacteria. Int J Pure App Biosci. 2014;2(3):305-311.
29. Pandey A, Singh P. Antibacterial activity of Syzygium aromaticum (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. Asian J Plant Sci Res. 2011;1(2):69-80.
30. URL: http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/klincic (Pristupljeno: 12.09.2019.)
31. Malle P, Tao SH. Rapid Quantitative Determination of Trimethylamine using Steam Distillation. J Food Protect. 1987;50:756-760.