

# Utjecaj ekstrakata začinskog bilja na oksidaciju masti tijekom skladištenja sous vide pripremljenog lososa

---

**Pehar, Katarina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:345071>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019. g.

Katarina Pehar

1077/PI

**UTJECAJ EKSTRAKATA  
ZAČINSKOG BILJA NA  
OKSIDACIJU MASTI TIJEKOM  
SKLADIŠTENJA *SOUS-VIDE*  
PRIPREMLJENOG LOSOSA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Tibor Jančija, dok je praktični dio istraživanja proveden u Laboratoriju za kemiju hrane na Zavodu za biotehnologiju i znanost o hrani na Norveškom sveučilištu znanosti i tehnologije, Trondheim uz pomoć izv.prof.dr.sc. Janne Crototove.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-Biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za kemiju i tehnologiju ribe i mesa

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ EKSTRAKATA ZAČINSKOG BILJA NA OKSIDACIJU MASTI TIJEKOM SKLADIŠTENJA *SOUS-VIDE* PRIPREMLJENOG LOSOSA

*Katarina Pehar, 1077/PI*

**Sažetak:** Riba je odavno poznata kao vrijedan izvor nutrijenata. Međutim, lipidi mišića ribe su zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina, izrazito podložni oksidaciji. Cilj ovog rada je utvrditi utjecaj prirodnih antioksidansa prisutnih u ekstraktima začinskog bilja i duljine skladištenja na oksidaciju lipida uzoraka lososa, udio lipida, boju fileta te gubitak mase. Mjerenja su provedena na 40 uzoraka lososa tijekom 15 dana skladištenja na temperaturi od 4°C. Uzorci su pripremljeni *sous-vide* metodom, vakuumirani i tretirani otopinama ekstrakata lavande, kadulje, mente i ružmarina. Rezultati ukazuju na to da ekstrakti začinskog bilja nemaju značajan utjecaj na udio lipida lososa i gubitak mase. Skladištenje i termička obrada utječu na  $a^*$  i  $L^*$  parametre boje. Niske TBA vrijednosti dokazuju antioksidativno djelovanje primijenjenih začina.

**Ključne riječi:** losos, oksidacija lipida, *sous-vide*, začinsko bilje

**Rad sadrži:** 40 stranica, 18 slika, 2 tablice, 55 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc.dr.sc. *Tibor Janči*

**Pomoć pri izradi:** izv.prof.dr.sc. *Janna Cropotova*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof.dr.sc. *Anet Režek Jambrak*
- 2.doc.dr.sc. *Tibor Janči*
- 3.prof.dr.sc. *Sanja Vidaček Filipić*
- 4.doc.dr.sc. *Marija Badanjak Sabolović*

**Datum obrane:** 26. rujna 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Meat and Fish Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

### INFLUENCE OF HERB EXTRACTS ON LIPID OXIDATION DURING STORAGE OF *SOUS-VIDE* PREPARED SALMON

*Katarina Pehar, 1077/PI*

**Abstract:** Fish has long been known as a valuable source of nutrients. However, due to the high content of polyunsaturated fatty acids, fish muscle lipids are highly susceptible to oxidation. The aim of this study is to determine the effect of natural antioxidants present in herb extracts and storage lengths on the lipid oxidation of salmon samples, lipid content, color of the fish and drip loss. Measurements were made on 41 salmon samples over 15 days of storage at 4 ° C. Samples were prepared by the *sous-vide* method, vacuumed and treated with lavender, sage, mint and rosemary extracts. The results indicate that herb extract has no significant effect on salmon lipid content and weight loss. Storage and thermal processing affect the color parameters. Low TBA values prove the antioxidant effect of the spices used.

**Keywords:** Salmon, lipid oxidation, sous-vide, herb

**Thesis contains:** 40 pages, 18 figures, 2 tables, 55 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 2, Zagreb

**Mentor:** PhD. *Tibor Janči*, Assistant professor

**Technical support and assistance:** PhD. *Janna Crobotova*, Associate professor

#### Reviewers:

1. PhD. *Anet Režek Jambrak*, Full professor
2. PhD. *Tibor Janči*, Assistant professor
3. PhD. *Sanja Vidaček Filipec*, Full professor
4. PhD. *Marija Badanjak Sabolović*, Assistant professor

**Thesis defended:** 26 September 2019

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. OPĆENITO O RIBI</b> .....	<b>2</b>
2.1.1. Atlantski losos ( <i>Salmo salar</i> ).....	2
<b>2.2. POTROŠNJA RIBE</b> .....	<b>3</b>
2.2.1. Prednosti konzumacije ribe.....	4
<b>2.3. LIPIDI RIBE</b> .....	<b>5</b>
2.3.1. Oksidacija lipida .....	6
<b>2.4. TOPLINSKA OBRADA NAMIRNICA</b> .....	<b>9</b>
2.4.1. Sous-vide metoda.....	9
<b>2.5. MEDITERANSKO ZAČINSKO BILJE</b> .....	<b>11</b>
2.5.1. Kadulja.....	11
2.5.2. Lavanda.....	11
2.5.3. Menta .....	12
2.5.4. Ružmarin.....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>14</b>
3.1.1. Uzorci .....	14
3.1.2. Reagensi.....	14
3.1.3. Kemikalije.....	15
3.1.4. Oprema .....	15
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>16</b>
3.2.1. Priprema uzoraka .....	16
3.2.1. Termička obrada .....	17
3.2.2. Analiza gubitka mase.....	18
3.2.3. Određivanje boje.....	18
3.2.4. Određivanje udjela lipida.....	19
3.2.6. Određivanje peroksidnog broja.....	21
3.2.7. TBA test.....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2. ODREĐIVANJE BOJE</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3. UKUPNI UDIO LIPIDA</b> .....	<b>30</b>
<b>4.4. ODREĐIVANJE PEROKSIDNE VRIJEDNOSTI LIPIDA</b> .....	<b>31</b>

<b>4.5. TEST TIOBARBITURNOM KISELINOM .....</b>	<b>33</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>35</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>36</b>



# 1. UVOD

Ribe i riblji proizvodi predstavljaju veliki i važan izvor hrane za ljude diljem svijeta. Dobar su izvor visokovrijednih hranjivih sastojaka poput esencijalnih dugolančanih omega-3 masnih kiselina, koje imaju blagotvoran utjecaj na ljudsko zdravlje. Lososi (lat. *Salmoniformes*) su red riba iz razreda zrakoperki, izrazito bogati proteinima, omega-3 masnim kiselinama te vitaminima i mineralima. Lososi se danas uzgaju u velikim količinama te su izrazito važni s nutritivnog i ekonomskog aspekta.

Unatoč mnogim pozitivnim aspektima vezanim uz proizvode ribarstva, postoje i nedostaci. Svježa riba lako je kvarljiva namirnica. Promjene kvalitete i nutritivnog sastava kod svježe ribe odvijaju se izrazito brzo i posljedica su aktivnosti mikroorganizama, endogenih enzima te kemijskih reakcija. Hlađenje i zamrzavanje najvažnije su metode produljenja trajnosti ribe te su prvenstveno usmjerene na usporavanje ili eliminaciju mikrobiološke aktivnosti koja je najvažniji uzrok kvarenja. Iako se pravilnim rukovanjem i skladištenjem mikrobiološka aktivnost značajno usporava, enzimske i kemijske reakcije poput procesa oksidacije u tkivu ribe i dalje se odvijaju te dovode do gubitka kvalitete. Oksidacija dovodi do gubitka omega-3 masnih kiselina, samim time i nutritivne vrijednosti. Uz to, produkti oksidacije nosioci su nepoželjnih mirisa i aroma te dovode do narušavanja senzorskih karakteristika proizvoda.

Cilj ovog rada je ispitati kako će mediteranski ekstrakti začinskog bilja (prirodni antioksidansi) i skladištenje utjecati na oksidaciju lipida atlantskog lososa, koji je prethodno obrađen *sous-vide* metodom i vakuumiran. Osim utjecaja na oksidaciju, proučavat će se i utjecaj na boju fileta lososa, udio lipida i gubitak mase.

Prirodni antioksidansi koji će se koristiti prilikom eksperimentalnog izvođenja rada su ekstrakt ružmarina, kadulje, mente i lavande.

Poznavanje oksidacijske stabilnosti lipida lososa, tijekom različitog vremena skladištenja te tretiranje ekstraktima začinskog bilja moglo bi, jednog dana, biti od velike koristi za industriju.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. OPĆENITO O RIBI

Ribe (*Pisces*) se općenito mogu definirati kao vodeni kralježnjaci koji imaju škrge za disanje i peraje kojima se kreću. Kemijski sastav ribljeg mesa varira ovisno o vrsti ribe, dobi, načinu ishrane, veličini, spolu, geografskom području ulova i godišnjem dobu (Silva i sur., 2000). S nutritivnog stajališta riba je jedan od najznačajnijih izvora bjelančevina životinjskog podrijetla, a odlikuje se i bogatim sastavom masnih kiselina koje su prijeko potrebne organizmu za odvijanje različitih metaboličkih procesa.

Osnovni kemijski sastav ribe je vrlo varijabilan i čini 16-21% proteina, 0,2-25% masti, 1,2-1,5% minerala, 0-0,5% ugljikohidrata i 66-81% vode (Love, 1970).

Morska riba je bogata jodom, kalijem, natrijem i bakrom, dok slatkovodna sadrži nešto manje natrija i joda. Sve vrste ribe sadrže vitamine B1, B2, B6 i B12, koji su važni za pravilan rad živčanog sustava. Riba je bogata i kalcijem, no on je uglavnom koncentriran u ljuskama.

U usporedbi s mesom sisavaca, meso ribe ima manju energetska vrijednost, sadrži manje vezivnog tkiva, ne sadrži elastin, a bjelančevine su lakše probavljive, bolje iskoristive te pogodnijeg aminokiselinskog sastava. Masti ribe su sastavljene od dugolančanih masnih kiselina (14-22 C atoma) i pretežito nezasićenih masnih kiselina (Cvrtila i sur., 2006).

#### 2.1.1. Atlantski losos (*Salmo salar*)

Atlantski losos je anadromna riba koja se mrijesti i izležava u slatkoj vodi. To je riba izduženog tijela koje se zadeblja s godinama. Prosječna duljina lososa je 71 do 76 cm, težina 3,6 do 5,4 kg nakon dvije godine provedene u moru, iako neki mogu težiti i do 13 kg. Kada postigne duljinu od oko 15 cm, losos migrira u ocean (obično u svibnju ili lipnju), nakon čega se odrasle jedinke vraćaju u slatku vodu radi razmnožavanja. Učinkovitost lososa ovisi o mnogim čimbenicima, uključujući genetske osobine, okoliš, zdravlje ribe, količinu i kvalitetu konzumirane hrane te životnu dob (Stead i sur., 2001).

Budući da je losos hladnokrvna životinja, temperatura ima važnu ulogu za brzinu rasta ribe tijekom životnog ciklusa. Optimalni temperaturni raspon je 8-14°C. Rast, zdravlje i razmnožavanje riba kao i ostalih vodenih životinja prvenstveno ovise o prehrani, odnosno adekvatnoj opskrbi hranjivim tvarima, kako količinski, tako i kvalitetom, bez obzira na sustav

u kojem se uzgajaju. Tijekom razvoja lososa od embrija do zrelosti, nekoliko je faza rasta koje su regulirane prehranom i hormonima (Johnston, 2001). Dobivanje na masi, količina unesene hrane, učinkovitost razgradnje hrane i probavljivost masnoća veći su kod selekcioniranih linija nego kod divljih linija lososa (Helland i sur., 1998).

Što se sastava mesa lososa tiče, svježi losos sadrži (u 100 g): 76 g vode, 20 g proteina i 3,5 g masti. Energetska vrijednost iznosi 116 kcal. Osim što je izvor visokokvalitetnih bjelančevina, losos sadrži značajne količine važnih nutrijenata, primjerice fosfor, selen, kalij, tiamin, niacin, pantotensku kiselinu, vitamin B6 i B12 i riboflavin; dok su ostali zastupljeni u manjim količinama. Također, jedan je od najboljih izvora omega-3 masnih kiselina koje smanjuju rizik od nastanka bolesti kardiovaskularnog sustava.

## **2.2. POTROŠNJA RIBE**

Ribe i morski plodovi predstavljaju veliki i važan izvor hrane visokenutritivne vrijednosti za ljude diljem svijeta. Ribarstvo i akvakultura čine veliki dio gospodarstva koji osigurava radna mjesta i prihode za milijune. U 2014. godini zemlje u razvoju od izvoza ribe ostvarile su prihod od 80 milijardi \$ (USD), što je više nego u drugim sektorima gospodarstva zajedno (duhan, riža, šećer) (FAO, 2016).

2014. godine svjetska opskrba ribom dosegla je najvišu razinu od oko 20 kg ribe po stanovniku, a 2013. godine u industrijaliziranim zemljama potrošnja ribe po stanovniku iznosila je 26,8 kg (FAO, 2016). Trgovina morskim plodovima u mnogim zemljama još uvijek raste i više od 50% izvoza ribe dolazi iz zemalja u razvoju. Ukupna proizvodnja ribe u 2014. godini iznosila je 93,4 milijuna tona (FAO, 2016). U 2016. godini više od 146 milijuna tona, što je oko 87% svjetske proizvodnje ribe, bilo je namijenjeno izravnoj prehrani ljudi. Ribe se ne moraju konzumirati samo kao svježi ili ohlađeni/smrznuti proizvod. Na tržištu postoji mnogo prerađenih proizvoda kao što su sušeni, dimljeni ili soljeni (Eymard i sur., 2009). Preostalih 21 milijun tona upotrijebljeno je za neprehrambene proizvode kao što su riblje ulje, riblje brašno ili kao sirovina za hranjenje u akvakulturi (FAO, 2016).

Svake godine ulovi se više od 100 milijuna tona ribe i školjkaša, a oko 25% tog ulova pretvara se u otpad zbog mikrobne aktivnosti i kvarenja, što iznosi oko 25% ukupnog gubitka

poljoprivrednih i ribljih proizvoda godišnje (Kaale i sur., 2011). Riba su najveća skupina životinja koje se koriste za proizvodnju hrane. Postoji više od 30000 već poznatih vrsta riba, ali samo oko 700 se komercijalno lovi i koristi za proizvodnju hrane u velikoj mjeri (Alasalvar i sur., 2010).

Unatoč mnogim pozitivnim aspektima vezanim uz morske proizvode postoji jedan, veliki nedostatak. Svježa riba, školjke i drugi vodeni proizvodi lako su kvarljive namirnice. Promjene kvalitete i nutritivnog sastava kod svježe ribe odvijaju se izrazito brzo i posljedica su aktivnosti mikroorganizama, endogenih enzima te kemijskih reakcija. Hlađenje i zamrzavanje najvažnije su metode produljenja trajnosti ribe te su prvenstveno usmjerene na usporavanje ili eliminaciju mikrobiološke aktivnosti koja je najvažniji uzrok kvarenja. Iako se pravilnim rukovanjem i skladištenjem mikrobiološka aktivnost značajno usporava, enzimske i kemijske reakcije poput procesa osidacije u tkivu ribe i dalje se odvijaju te dovode do gubitka kvalitete. Riba sadrže endogene enzime koji kataliziraju proteolizu proteina u mišićima i vezivnom tkivu. Oni također potiču hidrolizu masti, što rezultira slobodnim masnim kiselinama i potiče oksidaciju lipida (Wu i sur., 2014). Svi gore navedeni aspekti ukazuju na važnost skladištenja i prerade ribe, radi očuvanja prehranbene vrijednosti i kvalitete.

Postoji velika potreba za razvojem učinkovitih metoda i tehnologija kako bi se produžio rok trajanja svih svojstava svježeg proizvoda kao što su prehranbene vrijednosti, okusi, teksture i kvaliteta. Jedan od najvećih izazova je održavanje stabilne i niske temperature tijekom distribucije, koja će očuvati kvalitetu i spriječiti kvarenje (Wąsowicz i sur., 2004). Kontrola temperature i skladištenje na niskim temperaturama ili zamrzavanje su učinkovite metode za održavanje hranjivih tvari, kvalitete i produljenje roka trajanja ribe.

### 2.2.1. Prednosti konzumacije ribe

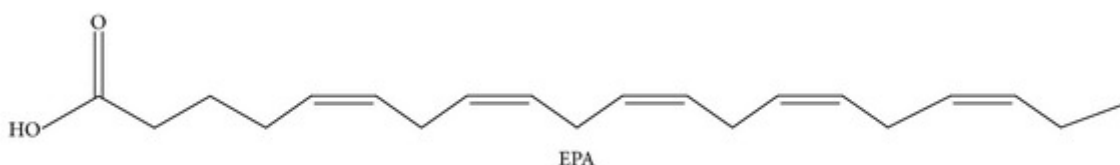
Povećana potrošnja ribe i ribljih proizvoda poboljšava prehranu zbog velike količine i raznolikosti hranjivih tvari. Riba i riblji proizvodi dobar su izvor visokovrijednih hranjivih sastojaka i lako probavljivih životinjskih bjelančevina, koje sadrže sve esencijalne aminokiseline. Dobar su izvor esencijalnih masti, kao što su dugolančane omega-3 masne kiseline, koje imaju blagotvoran utjecaj na ljudsko zdravlje. Postoje mnoge zdravstvene koristi od konzumacije nezasićenih masti, uključujući smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti, pozitivno djelovanje na živčani sustav te na razvoj mozga fetusa i djece. Ovisno o sadržaju masti, riba imaju nisku koncentraciju kolesterola i nisku kalorijsku vrijednost (Wu i sur., 2014). Riba također osiguravaju vitamine (A, B i D) i mnoge minerale, potrebne za razne

tjelesne funkcije (kalcij, jod, cink, željezo i selen) (FAO, 2016). Povećani unos ribe može pomoći u rješavanju problema s neuravnoteženom prehranom i suzbijanju pretilosti (FAO 2016).

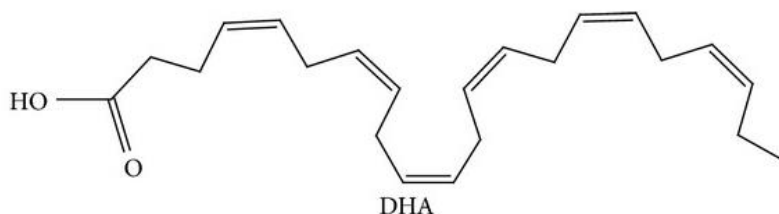
Iako konzumacija ribe ima blagotvoran učinak na ljudski organizam, u mnogim zemljama potrošnja je još uvijek preniska, posebno u zapadnom svijetu (Eymard i sur., 2009).

### 2.3. LIPIDI RIBE

Riba i riblji proizvodi donose brojne zdravstvene prednosti zbog visoke razine omega-3 masnih kiselina, koje su esencijalni spojevi i uključene su u mnoge fiziološke procese (Pedrosa i sur., 2014). Iz tog razloga preporučuje se povećana potrošnja ribe i ribljih proizvoda. Masne vrste riba obiluju dugolančanim omega-3 polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA): EPA (eikozapentaenska kiselina, C20: 5 omega-3) (slika 1) i DHA (dokozaheksaenska kiselina, C22: 6 omega-3) (slika 2) (Eymard i sur., 2009) i upravo njihova konzumacija donosi najkorisnije učinke.



Slika 1. Kemijska struktura eikozapentaenske kiseline (EPA) (D'Antona i sur., 2014)



Slika 2. Kemijska struktura dokozaheksaenske kiseline (DHA) (D'Antona i sur., 2014)

Koliko su važne polinezasićene masne kiseline govori i činjenica da je oko 50% suhe tvari mozga sastavljeno od masnoća, od kojih je gotovo 50% PUFA (arahidonska i dokozaheksaenska). Dugotrajnim deficitom polinezasićenih masnih kiselina dolazi do

metaboličkih promjena na nivou stanične membrane, što za posljedicu ima niz negativnih promjena u organizmu. Polinezasićene masne kiseline snižavaju „loš kolesterol“ (LDL kolesterol) i dobar su izvor esencijalnih masnih kiselina tipa omega-3. Ribe sadrže dugolančane PUFA (C18, C20 i C22) uključujući linolnu kiselinu [18: 2 (omega-6)] i linolensku kiselinu [18: 3 (omega-3)] – dvije esencijalne masne kiseline. Esencijalne masne kiseline uključene su u proizvodnju duljeg lanca polinezasićenih masnih kiselina – prostaglandina, koji kontroliraju mnoge tjelesne funkcije, npr. dilataciju perifernih krvnih žila što rezultira nižim arterijskim tlakom (Gogus i sur., 2010).

PUFA, a posebno omega-3 i omega-6 masne kiseline, imaju važnu gradivnu funkciju u organizmu. Esencijalna su komponenta membrana stanica središnjeg živčanog sustava gdje sudjeluju u održavanju dinamičke strukture, odnosno fluidnosti membrane. Ta je uloga posebno izražena u novorođenčadi i djece, kada je brzina rasta živčanog tkiva najveća. Svoje biološke efekte omega-3 i omega-6 ispoljavaju preko eikosanoida u čijoj su sintezi supstrati.

Eikosanoidi su „glasnici“ koji se vežu na receptore svih stanica u organizmu i sudjeluju uglavnom u upalnim procesima i imunološkom odgovoru. Eikosanoidi koji potječu iz omega-6 PUFA, poput arahidonske kiseline, pokazuju imunološki učinak i pro-upalna svojstva. Eikosanoidi koji potječu od omega-3 PUFA (EPA i DHA) imaju protuupalno djelovanje (Pedrosa i sur., 2014) i smanjuju rizik od trombogeneze te upala koje mogu biti uzrokovane omega-6PUFA (Gogus i sur., 2010).

Omega-3 PUFA mogu se koristiti u liječenju mnogih bolesti, npr. ekcema, psorijaze, bolesti crijeva ili reumatoidnog artritisa (Gogus i sur., 2010). Povećan unos omega-3 PUFA iz morskih proizvoda, kao što je primjerice meso masne ribe i jetra bijele ribe mogu smanjiti razni triglicerida u krvi, agregaciju trombocita i fibrinogena te smanjiti rizik od ishemijske srčane bolesti (Turner i sur., 2006). Niska potrošnja ribe može biti povezana s mentalnim bolestima, na primjer s depresijom (Turner i sur., 2006), a fosfolipidi mogu imati blagotvoran učinak na liječenje shizofrenije (Gogus i sur., 2010).

### 2.3.1. Oksidacija lipida

Kao što je već navedeno, riba je odavno poznata kao vrijedan izvor kvalitetnih, lako probavljivih proteina, dugolančanih omega-3 masnih kiselina, u masti topljivih vitamina (E i D), kao i esencijalnih vitamina i minerala (Tacon i sur., 2013). Međutim, lipidi mišića ribe su, zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina, vrlo osjetljivi na oksidaciju. Bez

odgovarajućeg rukovanja i obrade oksidacija dovodi do gubitka omega-3 masnih kiselina, samim time i nutritivne vrijednosti. Uz to, produkti oksidacije nosioci su nepoželjnih mirisa i aroma te dovode do narušavanja senzorskih karakteristika proizvoda.

Oksidacija ribljih lipida počinje zbog stresa, dok je riba još živa (Turner i sur., 2006). Na oksidaciju lipida ribe mogu utjecati vanjski čimbenici kao što su skladištenje, temperatura, vrijeme, kuhanje, prerada ili pakiranje, kao i unutarnji čimbenici, poput sastava mišića (Maestre i sur., 2011). Gubitak kvalitete, razvoj neugodnog okusa i mirisa, smanjivanje roka trajanja, gubici hranjivih vrijednosti (npr. gubitak PUFA) i moguća proizvodnja štetnih molekula su samo neke od posljedica oksidacije lipida u hrani.

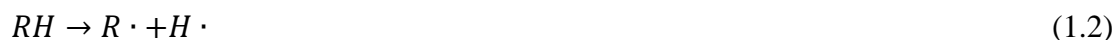
Proizvodi nastali tijekom oksidacije lipida mogu reagirati s dušikovim spojevima kao što su proteini, fosfolipidi, aminokiseline i DNA, što rezultira stvaranjem smeđih pigmenta i fluorescentnih spojeva, koji mogu imati negativne učinke na ljudsko zdravlje (Turner i sur., 2006).

Ribljii lipidi razlikuju se od lipida sisavaca. Glavna razlika je u tome što ribljii lipidi uključuju do 40% masnih kiselina dugih lanaca (14-22 ugljikova atoma) koje su visoko nezasićene. Masti sisavaca rijetko će sadržavati više od dvije dvostruke veze po molekuli masne kiseline dok depo masti ribe sadrže nekoliko masnih kiselina s pet ili šest dvostrukih veza.

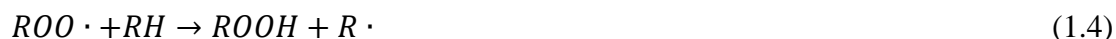
Oksidacija visoko nezasićenih masnih kiselina može biti uzrokovana fotooksidacijom, autoksidacijom ili enzimski posredovanom oksidacijom, a može se aktivirati slobodnim radikalima (hidroksil radikal i peroksil radikal) ili oksidansima koji nisu slobodni radikali, na primjer singletni kisik (Pedrosa i sur., 2014). Svaka vrsta oksidacije daje specifične produkte kao što su hidroperoksidi, aldehidi ili polimerni spojevikoji mogu imati citotoksične ili genotoksične učinke (Niki i sur., 2005). Primarni produkt koji nastaje tijekom oksidacije lipida je hidroperoksid bez mirisa (Guillén-Sans i sur., 1998).

Hidroperoksid je vrlo nestabilan i reagira dalje stvarajući sekundarne produkte, kao što su aldehidi, ketoni i ugljikovodici, što dovodi do promjene boje, stvaranja neugodnog okusa i utječe na vitamine (Pedrosa i sur., 2014). Primarni produkti oksidacije nastaju u ranoj fazi oksidacije, dok se produkti sekundarne oksidacije akumuliraju u naprednijoj fazi procesa.

Tri faze oksidacije lipida su: inicijacija, propagacija i terminacija. Faze inicijacije (jednadžbe 1.1 i 1.2) mogu biti potaknute toplinom, svjetlom, djelovanjem lipolitičkih enzima i metalnim ionima (Pedrosa, 2014).



Slobodni radikal (R) nastaje iz slobodne molekule masne kiseline ili triglicerida. Radikal reagira s kisikom i formira peroksidni radikal koji je potreban za proizvodnju hidroperoksida – faza propagacije (jednadžba 1.3 i 1.4) i novih slobodnih radikala koji su zaslužni za reinicijaciju (Guillén-Sans i sur., 1998).



Proces se zaustavlja kada dva radikala formiraju inaktivnu tvar – faza terminacije (jednadžbe 1.5 i 1.6) (Guillén-Sans i sur., 1998).



Reaktivni oblici kisika (ROS) uključuju radikale kisika i ne-radikalne derivate kisika, primjerice: superoksid ( $O_2^-$ ), hidroksil ( $OH \cdot$ ), peroksil ( $RO_2$ ), alkoksil (RO), peroksi (ROO), hidroperoksi (HOO), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), ozon ( $O_3$ ) i singletni kisik (Choe i sur., 2006).

Živi organizmi posjeduju mehanizme antioksidativnog djelovanja, koji brane organizme od ROS-a, no ne i nakon smrti, što rezultira nakupljanjem ROS-a u mišićnom tkivu (Tokur i sur., 2007). Akumulacija ROS-a u mišićima dovodi do oksidacije lipida što predstavlja glavni problem u skladištenju i preradi masne ribe. Osobito se akumulira u tamnim mišićima pelagičnih vrsta riba zbog prisutnosti pro-oksidanata poput hema proteina (Hb), mioglobina, kompleksa prijelaznih metala s niskim molekulskim masama, itd. (Tokur i sur., 2007).

Hemoglobin i mioglobin distribuiraju kisik različitim tkivima u tijelu. Hemoglobin je glavni pigment u crvenim krvnim stanicama, dok je mioglobin glavni pigment mišićnih stanica (Baron i sur., 2002). Smatra se da su hemoglobin i mioglobin jedni od najvažnijih



promotora oksidacije lipida u mišićima riba (Maqsood i sur., 2012). ROS mogu reagirati s biološkim molekulama kao što su lipidi, proteini, šećeri i vitamini te mogu katalizirati reakcije oksidacije koje ubrzavaju narušavanje kvalitete ribe i ribljih proizvoda (Baron i sur., 2007). ROS mogu se smatrati opasnim za ljudsko zdravlje, mogu proizvoditi niske molekularne hlapive aldehide, alkohole, ugljikovodike, promijeniti funkcionalnost lipida, proteina i ugljikohidrata te uništiti esencijalne hranjive tvari (Choe i sur., 2006).

## **2.4. TOPLINSKA OBRADA NAMIRNICA**

Zbog kontinuiranog rasta broja zdravstveno osviještenih potrošača, posebna pažnja pridaje se upotrebi minimalno prerađene hrane i blage toplinske obrade čiji je cilj očuvanje hranjivih sastojaka čime se osigurava njihova visoka kvaliteta i stabilnost (Iborra-Bernad i sur., 2014). Od otkrića vatre, kuhanje se koristilo kao glavna metoda toplinske obrade hrane, a cilj je produžiti rok trajanja namirnice uništavanjem mikroorganizama i inaktivacijom određenih enzima. Zagrijavanje također pomaže u poboljšanju probavljivosti i osjetilnih karakteristika krajnjeg proizvoda kao što su izgled, boja, okus i tekstura (Iborra-Bernad i sur., 2014).

Najčešće korištene metode toplinske obrade mesa i ribe u današnje vrijeme su: kuhanje, obrada pomoću mikrovalne pećnice, pečenje i pečenje na roštilju. Nažalost, nabrojene metode donose niz negativnih učinaka, kao što su razgradnja termolabilnih vitamina i bioaktivnih spojeva, uništavanje staničnih membrana, denaturacija proteina, kao i curenje minerala i vitamina u vodu za kuhanje (Rodriguez-Estrada i sur., 1997). Uz to, zbog prisutnosti kisika i korištenja relativno visokih temperatura prilikom toplinske obrade, većina ovih metoda može značajno izmijeniti sastav masnih kiselina te smanjiti razinu PUFA u hrani bogatoj lipidima. Stvaraju se nepoželjni produkti oksidacije lipida, osobito tijekom pečenja ili prženja mesa i ribe (Gerber i sur., 2009). Stoga je izbor toplinske obrade vrlo važan, kako bi se osigurala dobra kvaliteta i sigurnost prehrambenih proizvoda.

### **2.4.1. *Sous-vide* metoda**

Zbog navedenih razloga, *sous-vide* kuhanje dobiva sve veću pažnju kako kod potrošača, tako i u ugostiteljstvu širom svijeta. Francuski izraz „*sous vide*“ definira se kao

termička obrada hrane u vakuumu, u kontroliranim uvjetima temperature i vremena (Baldwin, 2012). Ova metoda podrazumijeva uporabu nižih temperatura (ispod 100°C) i dulje vrijeme kuhanja u usporedbi s tradicionalnim metodama kuhanja (Schellekens, 1996), nakon čega slijedi brzo hlađenje na 0-4°C i kasnije skladištenje u rashlađenom prostoru.

*Sous-vide* kuhanje predstavlja jednostavan postupak obrade kojim se potrošačima nude prehrambeni proizvodi spremni za jelo. Ova nova metoda može osigurati visoku kvalitetu proizvoda zbog smanjene koncentracije kisika unutar vakuum pakiranja (Oz i sur., 2016). Smanjenjem gubitka vode i hlapljivih spojeva očuvana je senzorska i nutritivna kvaliteta hrane (Oz i sur., 2016). Također je otkriveno, kako *sous-vide* kuhanje poboljšava teksturne karakteristike, povećavajući nježnost i sočnost, što je važno za malu djecu i starije potrošače (Botinestean i sur., 2016). Štoviše, kombinacija primjene nižih temperatura i vakuum pakiranja u *sous-vide* tehnologiji može značajno produžiti rok trajanja prehrambenih proizvoda u usporedbi s hranom pripremljenom tradicionalnim metodama kuhanja (Diaz i sur., 2009).

Kvaliteta ribe koja se skladišti na hladnom, smanjuje se kao rezultat nekoliko složenih biokemijskih i mikrobioloških procesa, kao što su endogena enzimska aktivnost, rast anaerobne mikroflore, te oksidativni procesi u proteinima i lipidnim komponentama (Rodríguez i sur., 2006). Riblji proizvodi su izrazito skloni oksidaciji lipida tijekom skladištenja, zbog visokog sadržaja PUFA, što značajno smanjuje njihovu kvalitetu (Nguyen i sur., 2013). Promjene senzorskih svojstava u ohlađenoj ribi uključuju nepoželjne promjene u okusu, boji i teksturi, te pojavu neugodnih mirisa uslijed užeglosti i stvaranja trimetilamina (Richards i sur., 2002). Kombinacijom niskih temperatura kuhanja sa vakuum pakiranjem, *sous-vide* metoda može odgoditi kvarenje ribe inaktiviranjem endogene proteaze i lipaze, uz očuvanje senzorne i hranjive kvalitete proizvoda (Baldwin, 2012).

## 2.5. MEDITERANSKO ZAČINSKO BILJE

### 2.5.1. Kadulja

Kadulja (lat. *Salvia officinalis*) je samonikla biljka koja raste na području Sredozemnog mora kao grm s višegodišnjom drvenastom stabljikom. Listovi su uski, eliptični i na dugoj peteljci. Četverobridna stabljika je slabo razgranata ili uopće nije razgranata. Donji dijelovi stabljike su drvenasti, a gornji zeljasti. Cijela biljka je prekrivena gustim dlakama te je sivozelene do srebrnaste boje. Plod je dvoplodnički kalavac koji se raspada na 4 oraščića (Kuštrak, 2005). Čitava biljka ugodnog je i vrlo jakog mirisa. Raste u krškom kraju, na kamenjaru, te ju smatraju „čuvaricom tla“. Rasprostranjena je u primorskom dijelu Hrvatske, a cvate od svibnja do kolovoza (Kušan, 1956).

Kadulja se još od povijesti koristi kao ljekovita biljka; djeluje kao antiseptik, kao sredstvo za grgljanje kod katara grla i ždrijela, koristi se za čišćenje krvi, liječi upale crijeva, želuca, jetre, žuči i mokraćnih puteva. Također djeluje kao jedno od najboljih sredstava protiv noćnog znojenja bolesnika s tuberkulozom. Svježim listovima kadulje trljaju se zubi i zubno meso da očvrstu (Willfort, 1978).

Kadulja je jedna od najznačajnijih izvora prirodnih antioksidanasa koja sadrži fenolne spojeve i fenolne kiseline. Fenolne kiseline čine 55-60% od ukupnih fenolnih spojeva u uzorku kadulje (Jasicka-Misiak i sur., 2018). Glavni antioksidacijski učinak u kadulji imaju derivati kafeinske kiseline (ružmarinska kiselina) te flavoni (luteolin-3-glikozid). Osim antioksidacijskog svojstva, značajan je i antimikrobni, antialergijski i antibiotski učinak (Dent i sur., 2017; Aruoma i sur., 1992).

### 2.5.2. Lavanda

Lavanda (lat. *Lavandula angustifolia*) je mediteranska biljna vrsta. Preferira toplu klimu i veću nadmorsku visinu, iako se neke vrste uzgajaju i u kontinentalnim dijelovima. Raste kao razgranati grm visine 30-80 cm s mnogo uspravnih izdanaka. Izdanci su gusto prekrivenih duguljastim i uskim sivozelenim listovima (Tomašević, 1982). Cvjetne stabljike lavande dugačke su od 20-40 cm, a na vrhovima tih dugačkih stabljika javljaju se sitni, mirisni usnati cvjetovi. Lavanda ima jak, aromatičan miris i okus, a odlikuje ga slatkasti, cvjetni okus s osvježavajućom citrusnom notom (Šilješ i sur., 1992).

Lavanda igra veliku ulogu u liječenju i preventivi različitih bolesti i tegoba kod ljudi. Važna je njezina ljekovitost kod probavnih smetnji (Galle, 2016). U narodnoj medicini lavanda se cijeni zbog umirujućeg djelovanja. Obična lavanda koja se uzgaja tako dugo da danas ima velik broj hibrida, bila je prvo ulje za aromaterapiju, a i dalje je odlična prva pomoć za kožne probleme, glavobolje i probavne smetnje. U obliku čaja ublažava glavobolju i potiče san (Airey i sur., 2007).

Lavanda je bogat izvor različitih skupina fenolnih spojeva (fenolnih kiselina i flavonoida) kojima se pripisuju antioksidativna, antimikrobna, antiseptička, protuupalna i druga svojstva. Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Velik broj ljekovitih biljaka sadrži flavonoide koji imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost (Rice-Evans i sur.,1995). Fenolni spojevi su zbog hidroksilnih skupina i zbog nezasićenih dvostrukih veza osjetljivi na oksidaciju, što ih čini dobrim antioksidansima (Rice-Evans i sur., 1997).

### 2.5.3. Menta

Metvica spada u porodicu *Lamiaceae* tj. usnače. Najraširenija i najpoznatija sorta roda *Mentha* je *Mentha piperita* L. poznata pod nazivom pepermint ili paprena metvica i *Mentha spicata* L. poznata pod nazivom spearmint ili klasasta metvica. Ljekovita je i aromatična biljka, ali se koristi i kao začim. Ljekovite tvari nastaju izmjenom tvari u biljci tijekom njenog života tj. rasta i razvoja i one se pohranjuju u biljci. List metvice i nadzemni dio tj. stabljika sa lišćem najviše se koriste u ljekovite svrhe, ali također i za razne proizvode koji se dobivaju od eteričnog ulja metvice. Nadzemni dio sadrži 1-2 % eteričnog ulja, a list sadrži 2-4 % eteričnog ulja (Stepanović i sur., 2001).

Glavni sastojak paprene metvice je mentol koji sprječava stezanje glatkog crijevnog mišića, doprinosi liječenju probavnih smetnji i grčeva u crijevima te pojačava osjećaj prisutnosti zraka u bronhiolama i sinusima. Drugi glavni sastojak je menton, koji daje snažan miris paprene metvice. Gorke tvari koje se nalaze u metvici potiču lučenje žuči te pojačavaju rad gušterače i jetre (Bowles, 2012).

Metvica je izvor antioksidativnih spojeva, koji uključuju fenolne kiseline (ružmarinska i kavena), flavone (derivati luteolina), flavanone (derivate eriocitrina), vitamine (karotenoide i askorbinsku kiselinu) te terpene (terpinen, timol, linalol, mentol i menton) (Riachi i sur.,

2015). Flavonoidi su snažni antioksidansi koji oslobađaju tijelo od štetnih tvari, podižu imunitet te ubrzavaju oporavak oštećenih stanica organizma.

#### 2.5.4. Ružmarin

Ružmarin (lat. *Rosmarinus officinalis*) je trajni, razgranjeni, zeleni grm s bezbroj šiljastih ogranaka koji samoniklo raste na području Mediterana. Listovi su sjedeći, tvrdi, kožasti, vrlo uski i dugi 2-3cm, vrlo intenzivno i ugodno mirišu i imaju gorak i aromatičan okus. Vrlo je poznat u sunčanim i kamenitim krajevima našeg obalnog područja i otočja. Cvate od ožujka do svibnja. Cvjetovi, izdanci u cvatu i listovi koriste se u ljekovite svrhe. Može služiti kao aromatik, karminativ i stimulans.

Ružmarin može služiti u rješavanju probavnih poteškoća, za poboljšanje cirkulacije, kao sredstvo za masažu, za čišćenje krvi i kao začim. Destilacijom listova i grančica dobiva se ružmarinovo ulje koji je sastavni dio ružmarinove masti i koristi se također kao sastojak mnogih parfema (Willfort, 1978).

Ekstrakt ružmarina najbolji je izvor prirodnih antioksidanasa. Ima veliku koncentraciju aktivnih tvari kao što su ružmarinska kiselina, karnosol, karnosolna kiselina i metil karnosol (Škevin, 2003).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Uzorci

Za ispitivanje parametara korišteni su uzorci lososa – 2 fileta lososa (svaki po 2,5 kg) (slika 3), kupljeni dan prije početka eksperimenta, u maloprodajnom lancu „Ravnkloa“ (Trodnheim, Norveška). Fileti su podijeljeni na 40 djelova, podjednake mase.



Slika 3. Filet lososa, odstranjene kože, mase 2,5 kg (vlastita fotografija)

#### 3.1.2. Reagensi

Korišteni reagensi: 2% otopine ekstrakata začinskog bilja kadulje, ružmarina, mente i lavande. Reagensi su pripremljeni na način da je 3 g začinskog bilja ekstrahirano sa 40 mL etanola i vode (1:1), od čega je napravljena 2% otopina (2 mL ekstrakta preneseno je u odmjernutikvicu od 100 mL koja je nadopunjena vodom do oznake).

### 3.1.3. Kemikalije

Korištene kemikalije navedene su u sljedećoj tablici.

Tablica 1. Kemikalije korištene u analizama (naziv, metode za koje su korištene i nazivi proizvođača).

Kemikalije	Metode	Proizvođač
Kloroform ( $\text{CHCl}_3$ )	TBA, lipidna ekstrakcija	Merck
Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )	lipidna ekstrakcija	Merck
2-tiobarbiturna kiselina (TBA)	TBA	Sigma-Aldrich
Octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	PV, TBA	Merck
Butilirani hidroksitoluen (BHT)	TBA	Sigma-Aldrich
Trikloroctena kiselina (TCA)	TBA	Merck
Kalijev jodid (KI)	PV	Merck
Destilirana voda	Lipidna ekstrakcija, PV, TBA	NTNU
Natrijev tiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	PV	Merck
Natrijev sulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )	TBA	Merck
1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP)	TBA	SINTEF
Dušik ( $\text{N}_2$ ) (plin)	Određivanje udjela lipida	

### 3.1.4. Oprema

Korištena oprema navedena je u sljedećoj tablici.

Tablica 2. Oprema korištena u analizama (naziv, metode u kojima je korištena i nazivi proizvođača).

Oprema	Metode	Proizvođač
Vorteks-mikser	TBA	MS2 Minishaker IKA, Njemačka
Vodena kupelj	<i>Sous-vide</i> , TBA	Grant, UK
Spektrofotometar	TBA	TECAN, Infinite M200 PRO, Austrija
Magnetna miješalica	TBA	Heidolph MR 3001K, Njemačka

<b>Analićka vaga</b>	Određivanje udjela lipida, TBA, PV	AG204 Delta Range, Mettler Toledo, SAD
<b>Tehnićka vaga</b>	Određivanje gubitka mase	Nerliens, Norveška
<b>Homogenizator</b>	Lipidna ekstrakcija	Ultra turex, IKA, Njemaćka
<b>Centrifuga</b>	Lipidna ekstrakcija	Sorvall RC5B plus, SAD
<b>Centrifuga</b>	TBA	Universal 16A – Hettich Zentrifugen, Njemaćka
<b>Evaporator</b>	Određivanje udjela lipida	Pierce, Reacti-Vap, SAD
<b>Automatski titrator</b>	PV	TitroLine 7800, Xylem Analytics, Njemaćka
<b>Kolorimetar</b>	Određivanje boje	Konica-Minolta, Osaka, Japan
<b>Uređaj za vakumiranje</b>	<i>Sous-vide</i>	Webomatic, Njemaćka
<b>Štapni mikser</b>	Lipidna ekstrakcija	

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema uzoraka

Pri dopremanju u laboratorij, ukupno 5 kg lososa, uklonjene kože, podijeljeno je na 40 podjednakih uzoraka (5 skupina po 8 uzoraka). Prva skupina služila je kao kontrolna te nije tretirana ekstraktima začinskog bilja. Ostale skupine proporcionalno su poprskane otopinama začinskog bilja, po svim dijelovima uzorka.

8 uzoraka tretirano je otopinom dobivenom od ekstrakta lavande, 8 otopinom dobivenom od ekstrakta ružmarina, 8 ih je pošpricano otopinom dobivenom od ekstrakta kadulje te preostalih 8 otopinom dobivenom od ekstrakta mente. Tako tretirani uzorci ostavljeni su da odstoje 5 min, sa svake strane.

Nakon toga, uzorci su upakirani u vrećice od poliamid-polipropilena te vakuumski zatvorene na uređaju za vakumiranje, Webomatic, Njemaćka (slika 4).





Slika 4. Uređaj za vakuumiranje, Webomatic, Njemačka (vlastita fotografija)

### 3.2.1. Termička obrada

Nakon vakuumiranja, uzorci su termički obrađeni sous-vide metodom.

Svi uzorci ribe (40 komada) kuhani su u vodenoj kupelji (Grant, UK), 10 min, na 70°C (slika 5), nakon čega su polegnuti u kutiju, prekriveni ledom te postavljeni u hladnu sobu na temperaturu od +4°C, na 15 dana. Svih 15 dana led se mijenjao 2 puta dnevno, kako bi se održala temperatura.

Kroz 15 dana, svaki drugi dan (1., 3., 5., 7., 9., 11., 13. i 15. dan) na 5 različitih uzoraka (po 1 uzorak iz svake skupine) provedeno je mjerenje gubitka mase te boja. Nakon određivanja gubitka mase i boje uzorci su izmiksani pomoću miksera te premješteni u plastične vrećice, kako bi na tim uzorcima bili provedeni lipidna ekstrakcija, određivanje peroksidnog broja (PV metoda) te test tiobarbiturnom kiselinom (TBA test).



Slika 5. Vodena kupelj, Grant, UK (vlastita fotografija)

### 3.2.2. Analiza gubitka mase

Kalo je određen kao razlika u masi prije i nakon termičke obrade uzorka. Izmjerena je masa vakuumiranog uzorka prije termičke obrade (uzorak+vrećica) te je nakon termičke obrade vrećica otvorena, tekućina otpuštena tijekom termičke obrade uklonjena je pomoću papira te je određena masa suhe vrećice i uzorka.

### 3.2.3. Određivanje boje

Određivanje boje provedeno je na površini uzorka odmah nakon otvaranja ambalaže kako bi se spriječila degradacija boje uzrokovana utjecajem svjetla i kisika iz zraka (Honikel, 1998). Referentna metoda mjerenja boje ribe je ona koja koristi  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  spektar boja.  $L^*$  je parametar svjetline mesa ribe iskazana vrijednostima od 0 do 100 (0 = crno, 100 = bijelo). Vrijednost parametra  $a^*$  je mjera crvenila mesa ribe iskazana vrijednostima od -60 do 60, a iskazuje spektar od crvene do zelene boje pri čemu veća vrijednost  $a^*$  parametra karakterizira crvenije meso ribe. Vrijednost  $b^*$  parametra ukazuje na spektar nijansi između plave i žute boje, a njegova veća vrijednost označava izraženost žutog dijela spektra.

Za određivanje boje lososa korišten je kolorimetar Konica Minolta (slika 6). Vrijednosti za  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  izračunate su kao srednja vrijednost 3 mjerenja uz napomenu da su se kod mjerenja izbjegavala područja s većom količinom masnoće zbog što točnijih i ujednačenijih mjerenja.



Slika 6. Kolorimetar, Konica-Minolta, Japan (vlastita fotografija)

#### 3.2.4. Određivanje udjela lipida

Udio lipida određen je metodom prema Bligh i sur. 1959.

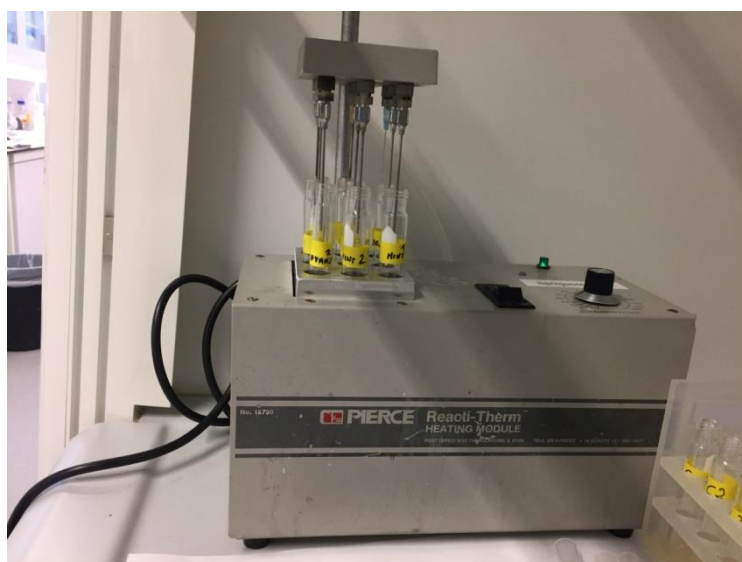
Oko 10 g prethodno usitnjenog uzorka lososa stavljeno je u plastične bočice za centrifugu, koje su otporne na kloroform. Dodano je 10 mL destilirane vode, 20 mL kloroforma i 40 mL hladnog metanola te homogenizirano 2 minute laboratorijskim homogenizatorom. Nakon toga dodano je 20 mL kloroforma, homogenizirano 30 sekundi, 20 mL destilirane vode te ponovno homogenizirano 30 sekundi.

Zatim su bočice sa uzorcima postavljene u uređaj za centrifugiranje, Sorvall RC5B plus te su centrifugirane 10 minuta na 9000 rpm. Nakon centrifugiranja dobivene su odjeljene 3 faze (slika 7): 1. Vodeno/metanolna faza (prozirna), 2. Protein faza (bijela), 3. Lipidno/kloroformna faza (roza-zbog pigmenta ribe). Pipetmanom se lipidno-kloroformna faza izdvaja u plastične bočice te se koristi za daljnje analize.



Slika 7. Prikaz odjeljenih faza uzorka nakon miksiranja i lipidne ekstrakcije (vodeno/metanolna, protein i lipidno/kloroformna faza) (vlastita fotografija)

Nakon toga, precizno je izvagana masa prazne staklene epruvete (s točnošću od 0,0001g). U izvaganu epruvetu je zatim preneseno 1 mL lipidno/kloroformne faze te su epruvete postavljene u evaporator (Pierce, Reacti-Vap, SAD). Korištenjem suhe topline (40°C) i dušika koji se upuhuje prema dolje, direktno u staklene epruvete, evaporator ubrzava isparavanje kloroforma (slika 8). Nakon 30 minuta epruvete su radi hlađenja prebačene u eksikator te su nakon 2 h ponovno vagane (s točnošću 0,0001g).



Slika 8. Evaporator, Pierce, Reacti-Vap, SAD (vlastita fotografija)

Za izračun mase lipida u 100 g uzorka korištena je formula:

$$g \text{ lipida} / 100 g \text{ uzorka} = \frac{(m_2 - m_1) * \text{volumen kloroforma} * 100}{\text{masa uzorka (g)} * \text{isparen kloroform (ml)}}$$

gdje su:

$m_1$  – masa prazne epruvete i

$m_2$  – masa epruvete sa uzorkom, nakon isparavanja kloroforma.

### 3.2.6. Određivanje peroksidnog broja

Peroksidna vrijednost lipida određena je metodom AOCS Cd 8b-90, koja određuje vrijednosti peroksida u mastima i uljima. Ova metoda određuje sve supstance u smislu miliekvivalenta peroksida na 1000 grama uzorka koji oksidiraju kalijev jodid u uvjetima ispitivanja. Dakle, ova metoda mjera je opsega primarne oksidacije lipida u uzorku.

Kako oksidacija lipida uzrokuje užeglostili pogoršanje kvalitete masti i ulja, PV metodom kvantitativno se određuje jesu li, i u kojem opsegu, masti i ulja oksidirali. Metoda se provodi u digestoru, a započinje pipetiranjem 12 mL lipidno/kloroformne faze u Erlenmeyerovu tikvicu. Dodano je 18 mL octene kiseline te 0.5 mL otopine kalijevog jodida (10 g kalijeva jodida razrijeđeno sa 13 g destilirane vode). Začepljena tikvica postavljena je na titrator, TitroLine 7800, Xylem Analytics (slika 9), sadržaj unutar tikvice je zatim promiješan uz pomoć magneta 60 sekundi. Nakon toga dodano je 30 mL destilirane vode, a elektroda i vrh titratora postavljeni su unutar otopine uzorka. Zapčinje titracija, tijekom koje je sadržaj tikvice neprekidno miješan. Korišteni reagens je 0,01 M otopina natrijevog tiosulfata. Za izračun peroksidne vrijednosti lipida korištena je formula:

$$PV = (V - B) * T * M * \frac{F_1}{(w * F_2)}$$

gdje su:

V – volumen korištenog reagensa tijekom titracije uzorka, ml,

B – volumen korištenog reagensa tijekom titracije slijepa probe, ml,

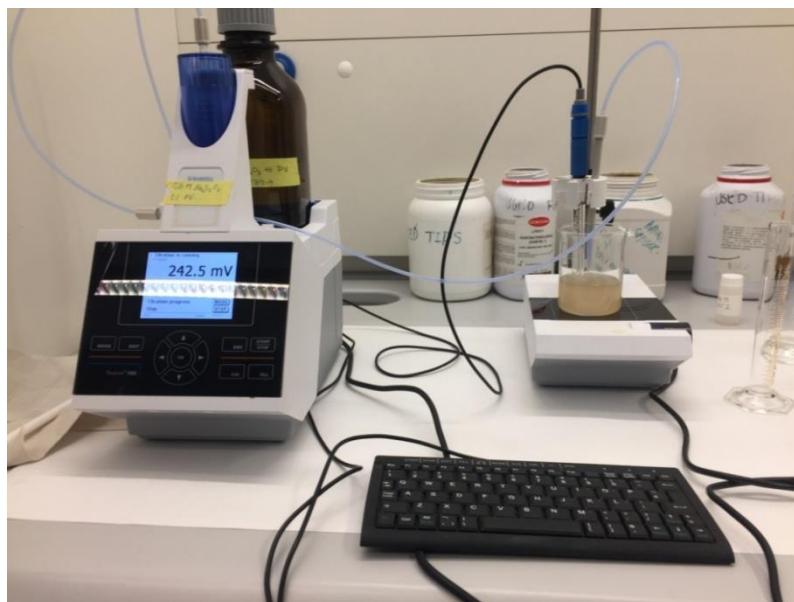
T – 0.01 M,

M – molarnost (1000),

$F_1$  – faktor 1 (1,0000),

$F_2$  – faktor 2 (1,0000),

w – masa lipida u uzorku, g.



Slika 9. Automatski titrator, TitroLine 7800, Xylem Analytics, Njemačka (vlastita fotografija)

### 3.2.7. TBA test

TBA test proveden je TBA metodom za određivanje slobodnog malondialdehida (MDA) i hidroperoksida, prema Schmedesu i Holmeru (1989).

Najprije su pripremljene potrebne otopine. TBA temeljna otopina pripremljena je otapanjem 1,44 g 2-tiobarbiturine kiseline u 50 mL destilirane vode u volumetrijskoj boci volumena 250 mL. Boca je do oznake nadopunjena octenom kiselinom. Pripremljena otopina je pomoću magneta promiješana 30 minuta. Otopina natrijevog sulfata ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) pripremljena je u volumetrijskoj boci volumena 250 mL. Količina od 9,46 g natrijevog sulfata razrijeđena je sa destiliranom vodom do oznake. Na isti način TCA otopina dobivena je razrijeđivanjem 11,43 g trikloroctene kiseline u volumetrijskoj boci (250 mL), sa nadopunom destilirane vode do oznake.

TEP temeljna otopina dobivena je otapanjem 0,22 g 1,1,3,3-tetraetoksipropana u 100 mL destilirane vode, uz miješanje pomoću magneta. TBA radna otopina pripremljena je miješanjem 180 mL TBA temeljne otopine, 120 mL kloroforma, 15 mL otopine natrijevog sulfata i 9,45 mL butiliranog hidroksitoluena (3% BHT u etanolu). Metoda je provedena u digestoru, a započeta je prenošenjem 200  $\mu\text{L}$  uzorka u staklene epruvete i dodavanjem 5 mL

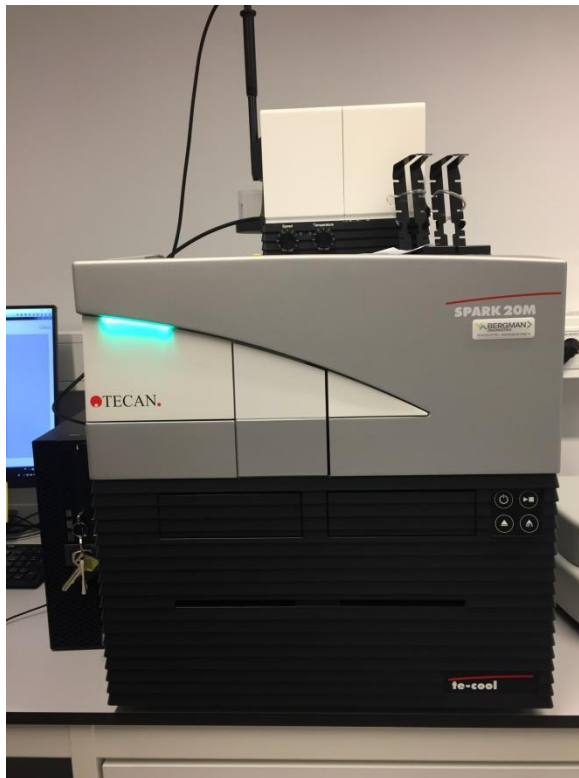
TBA temeljne otopine. Zatim je provedeno miješanje na vortexu 15 sekundi. Epruvete su potom 55 minuta inkubirane u vrućoj vodenoj kupelji (80°C) te su poslije toga ohlađene u hladnoj vodi.

Kada su epruvete ohlađene dodaje se 2,5 mL TCA otopine, nakon čega se postavljaju u centrifugu (Universal 16A-Hettich Zentrifugen) (slika 10), 10 minuta na 900 G. Standardna krivulja dobivena je primjenom iste procedure kao i za pripremu uzoraka, osim što je 200 µL uzorka zamjenjeno TEP otopinom, različite koncentracije (0, 25, 50, 100, 150 i 200 µL). Mjerena je apsorbancija (Spektrofotometar TECAN, Infinite M200 PRO) (slika 11) na 238 nm, sa destiliranom vodom kao slijepom probom. Rezultati su dobiveni pomoću formule:

$$\mu\text{MolTBA/glipida} = \frac{(\text{apsorbancija uzorka} - \text{presjek standardne krivulje})}{(\text{nagib standardne krivulje} * \text{ukupni udio lipida uzorka} * 1000)}$$



Slika 10. Centrifuga, Universal 16A-Hettich, Njemačka (vlastita fotografija)



Slika 11. Spektrofotometar, TECAN, Infinite M200 PRO, Austrija (vlastita fotografija)



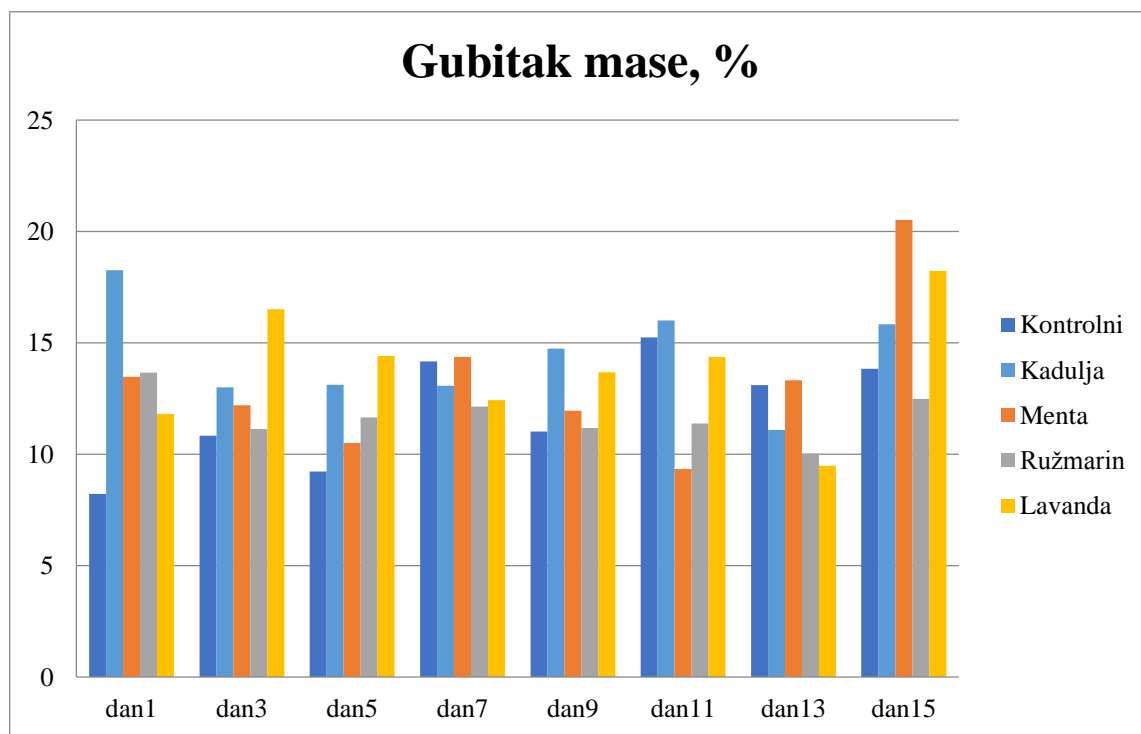
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je proučavanje utjecaja ekstrakata začinskog bilja na boju, gubitak mase, količinu te oksidaciju lipida *sous-vide* skuhanog, te različito vrijeme skladištenog lososa. Poznavanje oksidacijske stabilnosti lipida lososa, tijekom različitog vremena skladištenja te tretiranje ekstraktima začinskog bilja može biti od velike koristi za industriju.

Rezultati su prikazani grafički i uključuju standardnu devijaciju kao izračun za odstupanja. Statistička značajnost razlika između uzoraka provjerena je provedbom jednosmjerne analize varijance (ANOVA).

### 4.1. GUBITAK MASE

Na slici 12 prikazana je ovisnost gubitka mase (%) o trajanju skladištenja.



Slika 12. Gubitak mase (%) u *sous-vide* skuhanim i vakuumiranim uzorcima lososa, tretiranim otopinama začinskog bilja, nakon 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15 dana skladištenja fileta

Gubitak na masi kod ispitivanih uzoraka kreće se od 8,22% (kod kontrolnog uzorka, *sous-vide* skuhanog i vakuumiranog, skladištenog 1 dan na +4°C) do 20,52% (kod uzorka lososa, tretiranog otopinom ekstrakta mente, *sous-vide* skuhanog i vakuumiranog, te skladištenog 15 dana na +4°C).

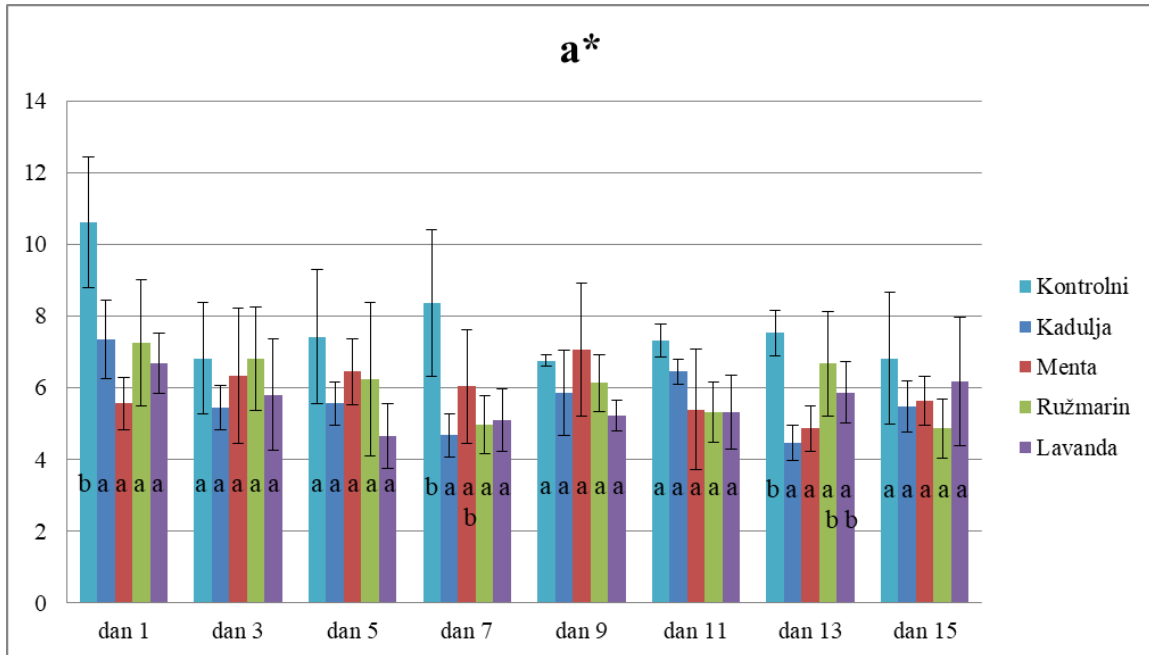
Visoki postotci gubitka mase mogu se povezati s termičkim tretmanom, koji je primijenjen na uzorke. Termičkom obradom dolazi do promjene u građi i konformaciji bjelančevina u mišićima. Zbog tih promjena mišić više nije u mogućnosti zadržati vodu te dolazi do njenog otpuštanja, a samim time i do gubitka mase (Toldrá i sur., 2010).

Gubitak mase između pojedinih uzoraka, koji su tretirani otopinama ekstrakata te *sous-vide* skuhani, značajno se ne razlikuju u odnosu na kontrolne uzorke. To pokazuje da otopine ekstrakata mente, kadulje, ružmarina i lavande nemaju utjecaja na gubitak mase.

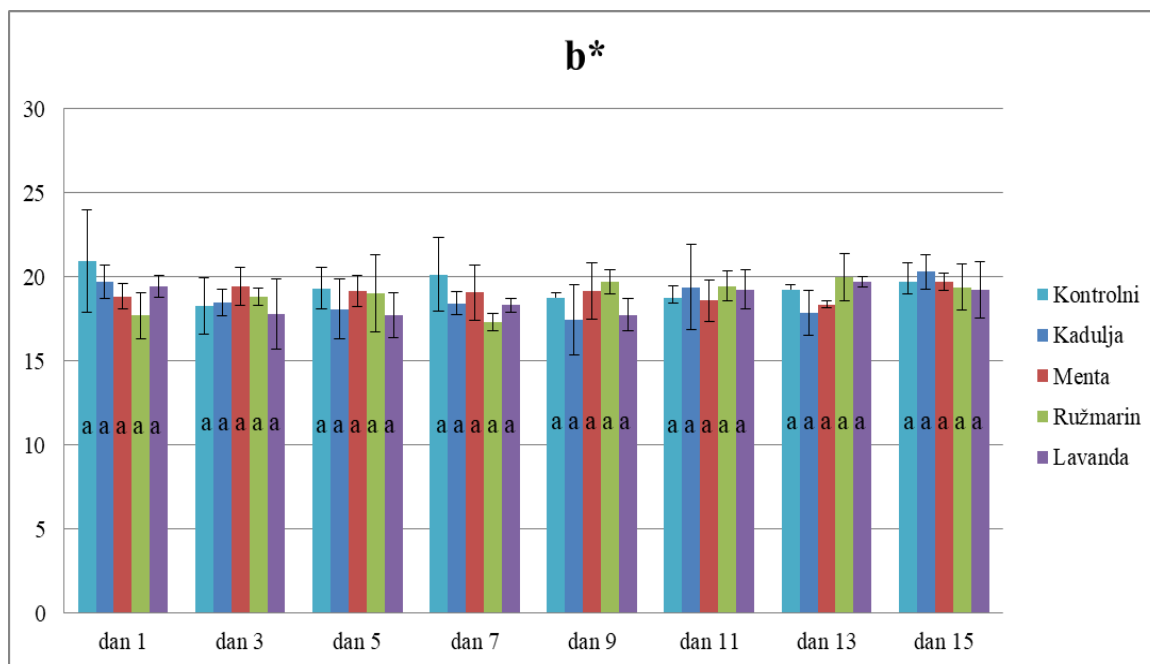
Uzrok za veći gubitak na masi u pojedinim uzorcima [uzorak tretiran kaduljom, skladišten 1 dan (18,27%), uzorak tretiran lavandom, skladišten 15 dana (18,24%) i uzorak tretiran mentom, skladišten 15 dana (20,52%)] može biti mali kapacitet mišića (smanjeno zadržavanje vode), što ovisi o dijelu fileta od kojeg je izrezan uzorak.

## 4.2. ODREĐIVANJE BOJE

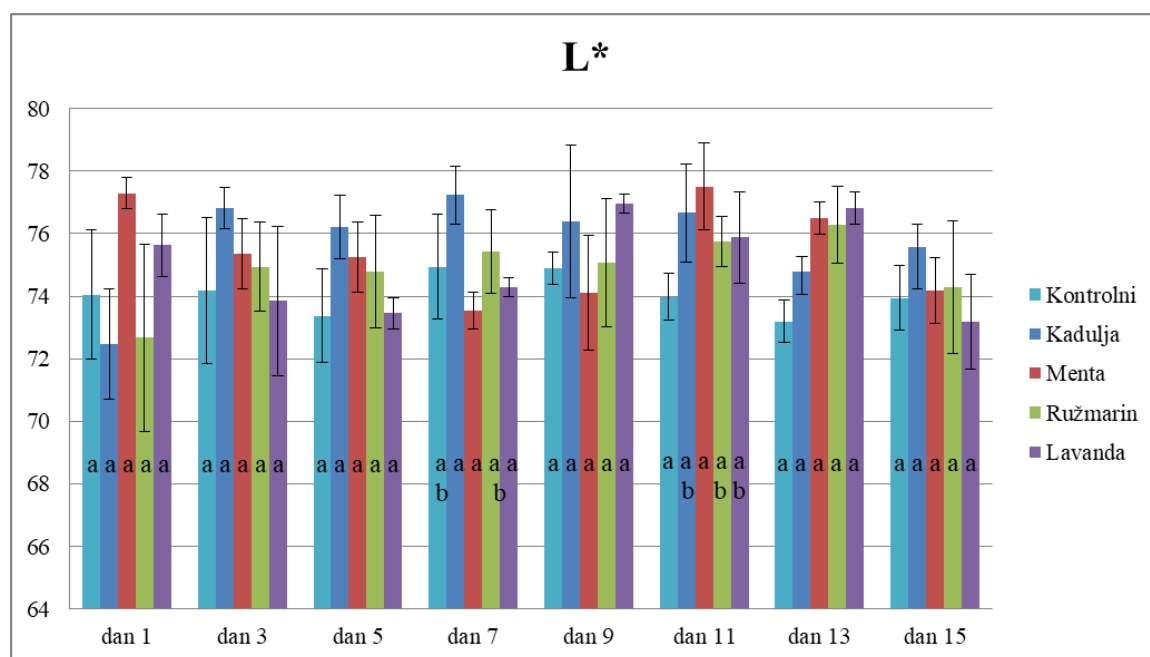
Slike 13, 14 i 15 prikazuju ovisnosti parametara boje ( $a^*$ ,  $b^*$  i  $L^*$ ) o danima skladištenja kod ispitivanih uzoraka.



Slika 13. Parametar boje  $a^*$  izmjeren u *sous-vide* skuhanim i vakuumiranim uzorcima lososa, tretiranim otopinama začinskog bilja, nakon 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15 dana skladištenja fileta. (Različita slova u stupcima označavaju statistički različite vrijednosti)



Slika 14. Parametar boje b\* izmjeren u *sous-vide* skuhanim i vakuumiranim uzorcima lososa, tretiranim otopinama začinskog bilja, nakon 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15 dana skladištenja fileta. (Različita slova u stupcima označavaju statistički različite vrijednosti)



Slika 15. Parametar boje L\* izmjeren u *sous-vide* skuhanim i vakuumiranim uzorcima lososa, tretiranim otopinama začinskog bilja, nakon 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15 dana skladištenja fileta. (Različita slova u stupcima označavaju statistički različite vrijednosti)

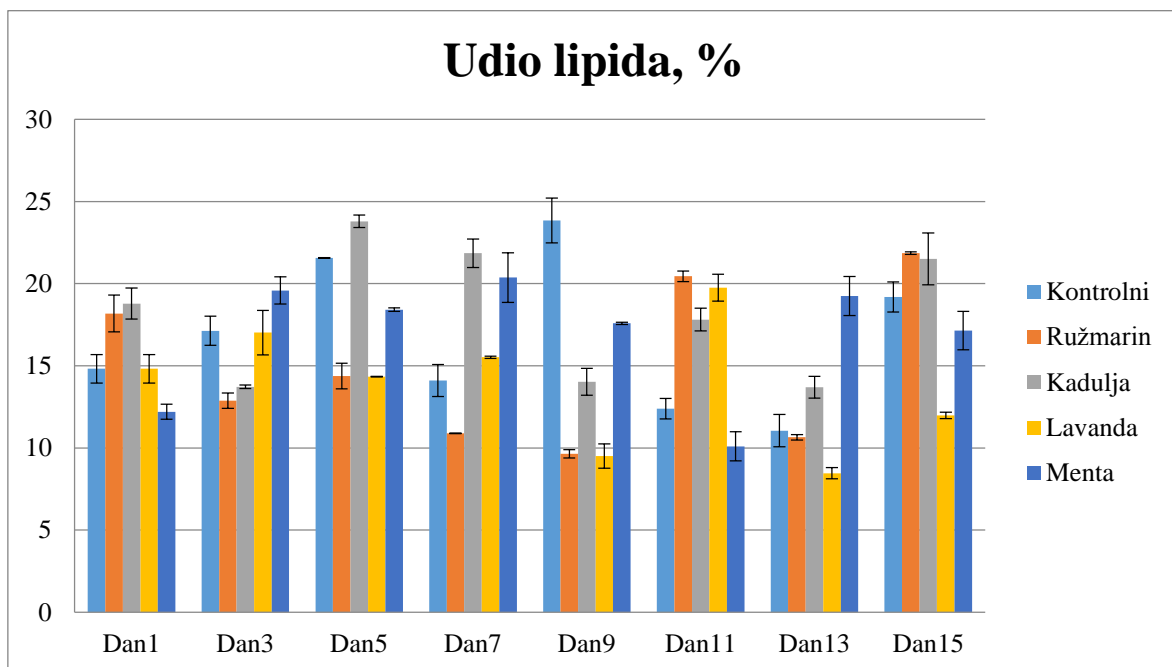
Parametar  $a^*$  je mjera crvenila mesa ribe iskazana vrijednostima od -60 do 60, a iskazuje spektar od crvene do zelene boje pri čemu veća vrijednost  $a^*$  parametra karakterizira crvenije meso ribe. Iz prikazanih rezultata može se uočiti kako vrijednost  $a^*$  parametra opada, u usporedbi s kontrolnim uzorkom 1. dan skladištenja, koji ima najveću vrijednost  $a^*$  parametra (10,62). Smanjenje navedenih vrijednosti kod uzoraka lososa povezano je sa razgradnjom karotenoida astaksantina. Astaksantin je zaslužan za boju mesa lososa. Astaksantin je zbog svoje nezasićene strukture izrazito osjetljiv na oksidaciju, a kao posljedica toga, dolazi do razgradnje astaksantina tijekom skladištenja (Ribeiro i sur., 2005).

Vrijednost  $b^*$  parametra ukazuje na spektar nijansi između plave i žute boje, a njegova veća vrijednost označava izraženost žutog dijela spektra. Parametar  $L^*$  predstavlja mjeru svjetlosti iskazanu u vrijednostima od 0 do 100 (0=crno a 100=bijelo). Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako između uzoraka, kod nijednog dana skladištenja, nema statistički značajne razlike za parametar  $b^*$ . Iz toga se može zaključiti kako termička obrada, skladištenje te obrada fileta otopinama ekstrakata začinskog bilja, nema značajnog utjecaja na promjenu izraženosti žutog dijela spektra.

Visoke vrijednosti  $L^*$  parametra kod uzoraka lososa mogu se povezati sa denaturacijom i agregacijom sarkoplazmatskih i miofibrilarnih proteina, koji povećavaju rasipanje svjetlosti (Christensen i sur., 2011). Zbog termičke obrade uzoraka lososa, odnosno temperature zagrijavanja, raste  $L^*$  vrijednost fileta jer dolazi do degradacije termo-labilnih proteinskih spojeva, kao i gubitak vode koja utječe na lom svjetlosti (Oz i sur., 2016). Između uzoraka koji su sous-vide skuhani i tretirani otopinama ekstrakata postoje male varijacije u vrijednosti parametara  $L^*$ , no bez značajne razlike prvih 5 dana skladištenja. Najveću vrijednost  $L^*$  parametra pokazuje uzorak tretiran otopinom ekstrakta mente, skladišten 11 dana (77,51), no vrijednost tog uzorka značajno se razlikuje samo od kontrolnog uzorka, koji nije tretiran otopinom ekstrakta začinskog bilja.

### 4.3. UKUPNI UDIO LIPIDA

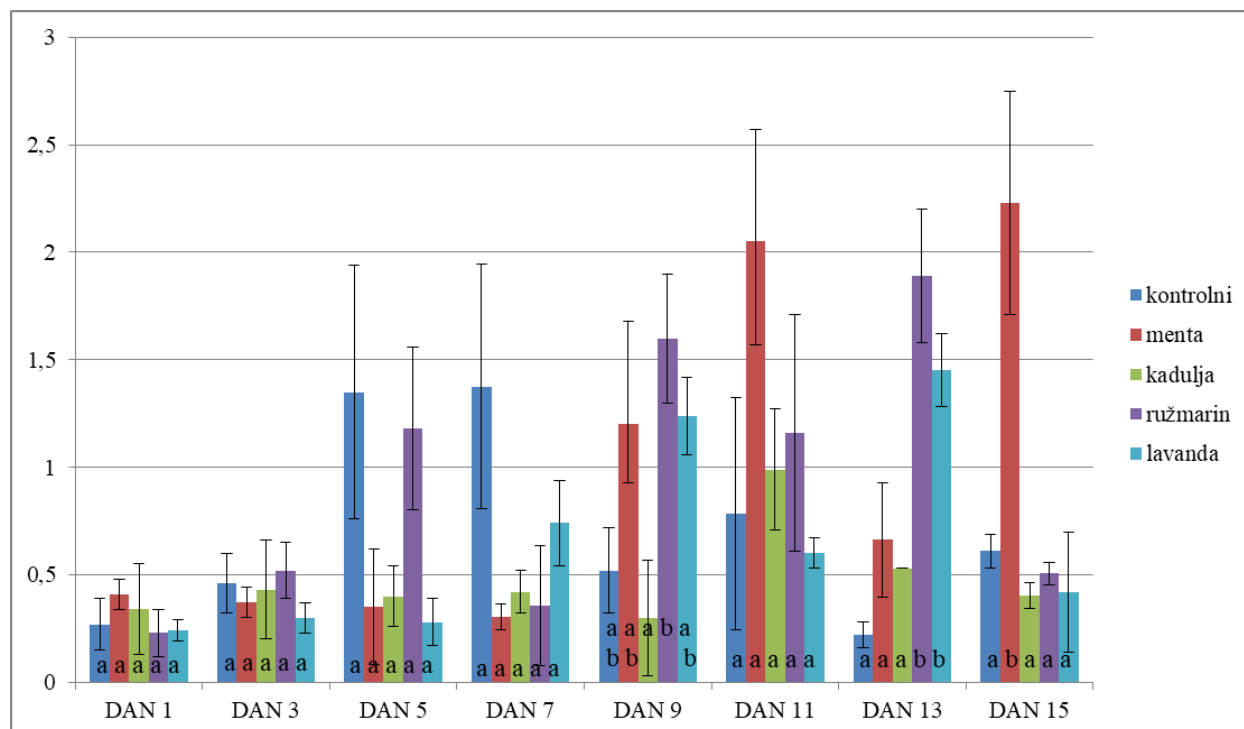
Slika 16 prikazuje ovisnost udjela lipida o danima skladištenja. Udio lipida kreće se od 8,46% (uzorak tretiran otopinom ekstrakta lavande, skladišten 13 dana) do 23,85% (kontrolni uzorak, *sous-vide* skuhan, skladišten 9 dana). Ovakve varijacije u rezultatima mogu se pripisati dobivanju, odnosno rezanju uzoraka iz različitih dijelova fileta. 2 fileta lososa (mase 2,5 kg) rezani su na manje komade. Budući da lipidi nisu homogeno distribuirani u filetu lososa, udio lipida u pojedinom uzorku ovisi o lokaciji uzimanja uzorka te se može zaključiti da navedene varijacije nisu posljedica tretmana ekstraktima začinskog bilja niti ovise o trajanju skladištenja.



Slika 16. Udio lipida (%) izmjereno u *sous-vide* skuhanim i vakuumiranim uzorcima lososa, tretiranim otopinama začinskog bilja, nakon 1, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13 i 15 dana skladištenja fileta

#### 4.4. ODREĐIVANJE PEROKSIDNE VRIJEDNOSTI LIPIDA

Slika 17 prikazuje primarne produkte oksidacije izmjerene kao peroksidna vrijednost (PV).



Slika 17. Peroksidna vrijednost lipida ( $\text{meq O}_2\text{kg}^{-1}$  ulja) izmjerena u *sous-vide* skuhanim i vakuumiranim uzorcima lososa, tretiranim otopinama začinskog bilja, nakon 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15 dana skladištenja fileta. (Različita slova u stupcima označavaju statistički različite vrijednosti)

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da nakon 1. i 3. dana skladištenja uzoraka nije došlo do značajnog porasta peroksidnog broja uzoraka lipida lososa. Nakon 1. dana skladištenja vrijednosti su se kretale od  $0,23 \text{ meq O}_2\text{kg}^{-1}$  ulja (uzorak tretiran otopinom ekstrakta ružmarina) do  $0,41 \text{ meq O}_2\text{kg}^{-1}$  ulja (uzorak tretiran otopinom ekstrakta mente). Vidljivo je kako nema značajne razlike među uzorcima. Nakon 3. dana skladištenja od  $0,29 \text{ meq O}_2\text{kg}^{-1}$  ulja (uzorak tretiran otopinom ekstrakta lavande) do  $0,52 \text{ meq O}_2\text{kg}^{-1}$  ulja (uzorak tretiran otopinom ekstrakta ružmarina), također bez značajne razlike među pojedinim uzorcima. Nakon 5. dana skladištenja uzoraka, peroksidna vrijednost počela se povećavati.

Slične vrijednosti PV-a dobivene su i u istraživanju Timm-Heinrich i sur. (2013) koji su proučavali oksidativne promjene kalifornijske pastrve tijekom skladištenja (12 dana na

2°C). Peroksidne vrijednosti bile su ispod 0,5 meq O<sub>2</sub>kg<sup>-1</sup>ulja tijekom prva 3 dana skladištenja. Nakon 5 dana vrijednost se počela lagano povećavati do 0,56 meq O<sub>2</sub>kg<sup>-1</sup> ulja. Na 12. dan skladištenja vrijednosti su se povećale i do 6 meq O<sub>2</sub>kg<sup>-1</sup> ulja.

Pokazalo se da je 7. dan skladištenja kritičan u više radova. Hernandez i sur. (2009) proučavali su oksidaciju lipida hame tijekom 18 dana skladištenja na 4°C, i pronašli velike razlike u peroksidnoj vrijednosti lipida od 7. dana nadalje.

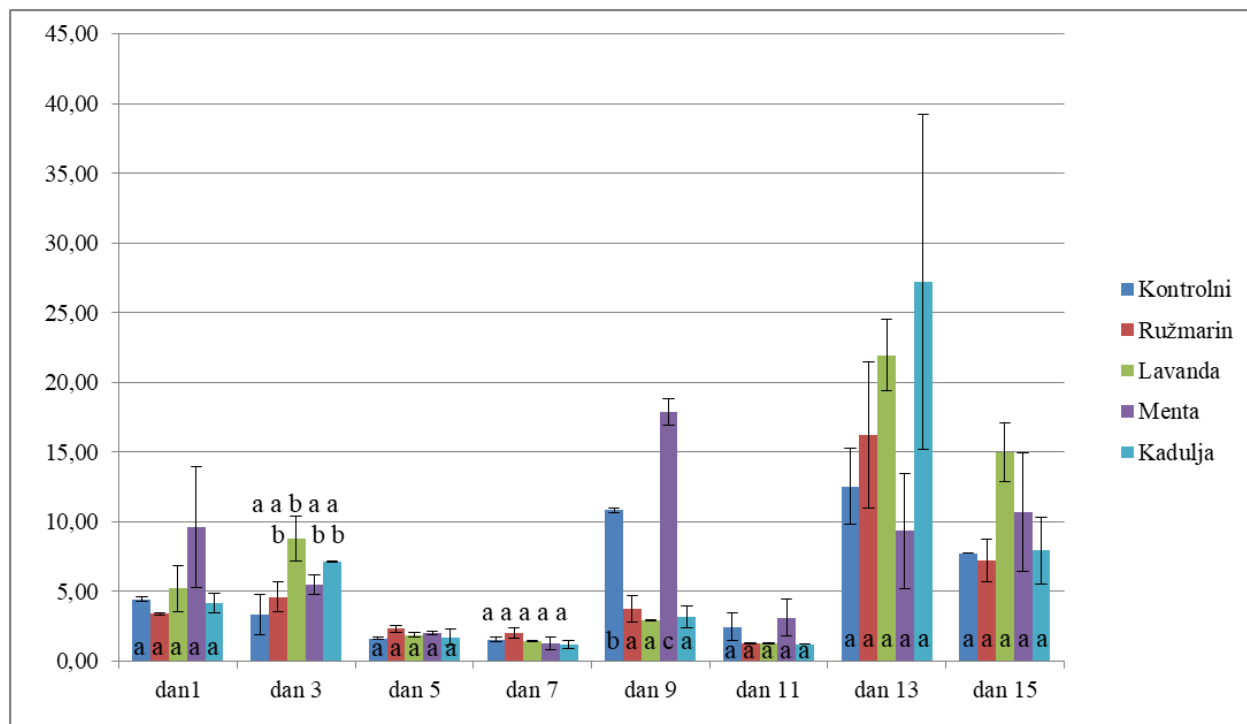
Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako su kod uzoraka lososa vrijednosti najviše porasle tek nakon 9 dana skladištenja (za uzorak tretiran otopinom ekstrakta mente (1,20 meq O<sub>2</sub>kg<sup>-1</sup> ulja), otopinom ekstrakta ružmarina (1,60 meq O<sub>2</sub>kg<sup>-1</sup> ulja) te otopinom ekstrakta lavande (1,24 meq O<sub>2</sub>kg<sup>-1</sup> ulja), kao i kontrolni uzorak (0,52 meq O<sub>2</sub>kg<sup>-1</sup> ulja)). Moguće je da su antioksidansi imali utjecaj na odgodu nastanka hidroperoksida, pa se tek 9. dan pokazao kao kritičan.

Vidljivo je, kako ekstrakt kadulje ima najveću efikasnost zaštite uzoraka lososa od stvaranja primarnih produkta oksidacije (9. Dan skladištenja vrijednost uzorka tretiranog otopinom ekstrakta kadulje značajno se razlikuje od uzorka tretiranog ekstraktom ružmarina), u odnosu na druge primijenjene antioksidanse. Ekstrakti mente, ružmarina i lavande pokazuju se efektivni prvih tjedan dana skladištenja.

Mora se uzeti u obzir, da u nekim slučajevima povećavana koncentracija antioksidansa u prehrani nije uvijek povezana s povećanjem stabilnosti lipida (Secci i sur., 2016).



#### 4.5. TEST TIOBARBITURNOM KISELINOM



Slika 18. Stupanj oksidacije lipida ( $\mu\text{mol TBARg}^{-1}$  lipida) izmjeren u *sous-vide* skuhanim i vakuumiranim uzorcima lososa, tretiranim otopinama začinskog bilja, nakon 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15 dana skladištenja fileta. (Različita slova po stupcima označavaju statistički različite vrijednosti)

TBA vrijednost nakon 1. dana skladištenja kretala se od  $3,38 \mu\text{mol TBARg}^{-1}$  lipida kod uzorka lososa koji je tretiran otopinom ekstrakta ružmarina do  $9,61 \mu\text{mol TBARg}^{-1}$  lipida koji je tretiran otopinom ekstrakta mente. Najniže vrijednosti stupnja oksidacije izračunate su nakon 7 dana skladištenja, a kretale su se od  $1,21 \mu\text{mol TBARg}^{-1}$  lipida (uzorak tretiran otopinom ekstrakta kadulje) do  $2,01 \mu\text{mol TBARg}^{-1}$  lipida (uzorak tretiran otopinom ekstrakta ružmarina). Najveće vrijednosti dobivene su nakon 13 dana skladištenja lososa, a iznosile su od  $9,34 \mu\text{mol TBARg}^{-1}$  lipida (uzorak tretiran otopinom ekstrakta mente) do  $27,20 \mu\text{mol TBARg}^{-1}$  lipida (uzorak tretiran otopinom ekstrakta kadulje). Na brzinu oksidacije lipida mogu utjecati različiti čimbenici kao što su uvjeti obrade i skladištenja, sadržaj masti i količina nezasićenih masnih kiselina te raspodjela PUFA u molekuli triacilglicerola, prisutnost antioksidansa (koji su inhibitori oksidacije) i prisutnost prooksidansa (koji su katalizatori) (Wąsowicz, 2004).

Rezultati pokazuju kako svi korišteni ekstrakti začinskih bilja prvih 7 dana djeluju antioksidativno. Stvaranje aktivnih oksidansa enzima može biti spriječeno djelovanjem antioksidansa. Antioksidansi uklanjaju slobodne radikale u cilju sprječavanja autooksidacije ili kao inhibitori kisika u procesu foto-oksidacije. Također sudjeluju u reakcijama adaptacije (Niki i sur., 2005).

Vrijednosti za uzorke koji su tretirani otopinom ekstrakata ružmarina, lavande i kadulje, bile su niske sve do 13. dana skladištenja. To potkrepljuje tvrdnju kako je ekstrakt ružmarina najbolji izvor prirodnih antioksidanasa. Ima visokukoncentraciju aktivnih tvari kao što su ružmarinska kiselina, karnosol, karnosolna kiselina i metil karnosol (Škevin, 2003).

Također može se uočiti, kako nakon 9 dana skladištenja TBA vrijednost za uzorak tretiran otopinom ekstrakta mente raste na  $17,89 \mu\text{mol TBARg}^{-1}$  lipida i značajno se razlikuje od uzoraka tretiranih ostalim otopinama ekstrakata začinskog bilja. Moguće objašnjenje ovog odstupanja je činjenica da i određeni antioksidansi mogu imati prooksidativno djelovanje. Prooksidans može biti bilo koja tvar, ksenobiotik ili endobiotik, koja inducira oksidativni stres potičući proizvodnju slobodnih radikala ili koja spriječava rad antioksidanasa. Prooksidansi mogu biti radikali sadržani u tkivima ili molekule, ali neka istraživanja pokazuju da to također mogu biti i antioksidansi (Palece i sur., 2010).

## 5. ZAKLJUČCI

*Sous-vide* termička obrada, skladištenje i tretiranje otopinama začinskih ekstrakata dovode do promjena senzorskih i tehnoloških karakteristika lososa. Provedenim istraživanjem utvrđene su sljedeće promjene:

- Otopine ekstrakata mente, kadulje, ružmarina i lavande nemaju utjecaja na gubitak mase tijekom hladnog skladištenja *sous-vide* pripremljenih uzoraka lososa.
- Vrijednost  $a^*$  parametra, odnosno mjera crvenila mesa ribe, smanjuje se tijekom skladištenja, u usporedbi s kontrolnim uzorkom 1. dan skladištenja, zbog razgradnje karotenoida astaksantina.
- Visoke vrijednosti  $L^*$  parametra posljedica su termičke obrade uzoraka
- Razlike u udjelu lipida između pojedinih uzoraka posljedica su nehomogene distribucije lipida u filetu lososa te su uzrokovane različitim lokacijama uzrokovanja i ne mogu se dovesti u vezu s tretmanom ekstraktima začinskog bilja ili trajanjem skladištenja.
- Peroksidne vrijednosti najviše su porasle tek nakon 9 dana skladištenja za sve uzorke, osim za uzorak tretiran otopinom ekstrakta kadulje.
- Ekstrakti mente, ružmarina i lavande pokazuju se efektivni prvih tjedan dana skladištenja, dok ekstrakt kadulje ima najveću efikasnost zaštite uzoraka lososa od stvaranja primarnih produkta oksidacije.
- Svi korišteni ekstrakti začinskih bilja prvih 7 dana skladištenja djeluju antioksidativno.
- TBA vrijednosti za uzorke koji su tretirani otopinom ekstrakata ružmarina, lavande i kadulje, bile su niske sve do 13. dana skladištenja, što dokazuje njihovo antioksidativno djelovanje.
- Nakon 9 dana skladištenja TBA vrijednost za uzorak tretiran otopinom ekstrakta mente raste na  $17,89 \mu\text{mol TBARg}^{-1}$  lipida – menta počinje djelovati kao prooksidans.

## 6. LITERATURA

- Airey, R., Houdret, J. (2007) Priručnik alternativnog liječenja, Školska knjiga, Zagreb.
- Alasalvar, C., Shahidi, F., Miyashita, K., Wanasundara, U. (2010) Seafood quality, safety, and health applications, Wiley-Blackwell, Chichester.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Aeschbach, R., Loligers, J. (1992) Antioxidant and prooxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica* **2**, 257-268.
- Baldwin, D. E. (2012) Sous Vide cooking: A review. *Int. J. Gastron. Food Sci.* **1**, 15–30.
- Baron, C. P., Andersen, H. J. (2002) Myoglobin-induced lipid oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3887.
- Baron, C. P., Kjaersgård, I.V., Jessen, F., Jacobsen, C. (2007) Protein and lipid oxidation during frozen storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Agric. Food Chem.* **55**, 8118.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian J. Biochem.* **37**, 911-917.
- Botinestean, C., Keenan, D. F., Kerry, J. P., Hamill, R. M. (2016) The effect of thermal treatments including sous-vide, blast freezing and their combinations on beef tenderness of *M. semitendinosus* steaks targeted at elderly consumers. *LWT-Food Sci. Technol.* **74**, 154–159.
- Bowles, E. J. (2012) Eterična ulja, Veble commerce, Zagreb.
- Choe, E., Min, D. (2006) Chemistry and Reactions of Reactive Oxygen Species in Foods. *Crit. Rev. Food Sci.* **46**, 1-22.
- Christensen, L. B., Ertbjerg, P., Aaslyng, M. D., Christensen, M. (2011). Effect of prolonged heat treatment from 48 °C to 63 °C on toughness, cooking loss and color of pork. *Meat Sci.* **88**, 280-285.
- Cvrtila, Ž., Kozačinski, L. (2006) Kemijski sastav mesa riba. *Meso.* **7**, 365-370.

Dent, M., Bursad Kovačević, D., Bosiljkov, T., Dragović-Uzelac, V. (2017) Polyphenolic Composition of Antioxidant Capacity of Indigenous Wild Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.). *Croatica Chemica Acta*. **90**, 451-459.

Diaz, P., Nieto, G., Banon, S., Garido, M. D. (2009) Determination of shelf life of sous vide salmon (*Salmo salar*) based on sensory attributes. *J. Food Sci.* **74**, 371–376.

Eymard, S. Baron, C.P., Jacobsen, C. (2009) Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chem.* **114**, 57.

FAO (2016) The state of food and agriculture 2016. FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rim. <http://www.fao.org/3/a-i6030e.pdf>. Pristupljeno 17. kolovoza 2019.

Galle, Toplak, K. (2016) Domaće ljekovito bilje, Mozaik knjiga, Zagreb.

Gerber, N., Scheeder, M. R. L., Wenk, C. (2009) The influence of cooking and fat trimming on the actual nutrient intake from meat. *Meat Sci.* **81**, 148–154.

Gogus, U., Smith, C. (2010) n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *Internat. J. Food Sci. Technol.* **45**, 417-436.

Guillén-Sans, R., Guzmán-Chozas, M. (1998) The Thiobarbituric Acid (TBA) Reaction in Foods: A Review. *Crit. Rev. Food Sci.* **38**, 315-350.

Hernandez, M.D., Lopez, M.B., Alvarez, A., Ferrandini, E., Garcia, B., Garrido, M.D. (2009) Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. *Food Chem.* **114**, 237–245.

Iborra-Bernad, C., Tárrega, A., García-Segovia, P., Martínez-Monzó, J. (2014) Comparison of sous-vide treatments and traditional cooking using instrumental and sensory analysis. *Food Anal. Method.* **7**, 400–408.

Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Petecka, M., Buslovych, O., Shlyapnikov, V.A., Wiczorek, P.P. (2018) Antioxidant phenolic compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. *Ecol. Chem. Eng. S.* **25**, 133-142.

Kaale, L.D., Eikevik, T.M., Rustad, T., Kolesaker, K. (2011) Superchilling of food. *J. Food Engen.* **107**, 141-146.

Kuštrak, D. (2005) Farmakognozija – Fitofarmacija, Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb.

Kušan, F. (1956) Ljekovito i drugo korisno bilje, Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb.

Maestre, R., Pazos, M., Medina, I. (2011) Role of the raw composition of pelagic fish muscle on the development of lipid oxidation and rancidity during storage. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 62-84.

Maqsood, S., Benjakul, S., Kamal-Eldin A. (2012) Haemoglobin-mediated lipid oxidation in the fish muscle: A review. *Trends Food Sci. Tech.* **28**, 33.

Nguyen, M. V., Arason, S., Thorkelsson, G., Gudmundsdottir, A., Thorarinsdottir, K. A., Vu, B. N. (2013) Effects of added phosphates on lipid stability during salt curing and rehydration of cod (*Gadus morhua*). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **90**, 317–326.

Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N. (2005) Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *BB. Res. Comm.* **338**, 668.

Oz, F., Seyyar, E. (2016) Formation of heterocyclic aromatic amines and migration level of bisphenol-A in sous-vide-cooked trout fillets at different cooking temperatures and cooking levels. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 3070–3082.

Palace, J., Leite, M.I., Nairne, A. (2010) Interferon beta treatment in neuromyelitis optica, Increase in relapses in neuromyelitis optica. *Arch Neurol.* **67**, 256-259.

Pedrosa, R., Tecelão, C., Gil, M. M. (2014) Lipids in Meat and Seafood, *Methods in Food Analysis*. Science Publishers, British Channel Islands, USA.

Rodriguez-Estrada, M. T., Penazzi, G., Caboni, M. F., Bertacco, G., Lercker, G. (1997) Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburgers. *Meat Sci.* **45**, 365–375.

Rodríguez, O., Barros-Velázquez, J., Piñeiro, C., Gallardo, J. M., Aubourg, S. P. (2006) Effects of storage in slurry ice on the microbial, chemical and sensory quality and on the shelf life of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chem.* **95**, 270–278.

Ribeiro, H.S., Rico, L.G., Badolato, G.G., Schubert, H. (2005) Production of O/W emulsions containing astaxanthin by repeated premix membrane emulsification. *J Food Sci.* **70**, 117–123.

Riachi, L. G., De Maria C.A.B. (2015)Peppermint antioxidants revisited. *Food Chem.* **176**, 72-81.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radi. Res.***22**, 375-383.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Food Sci.* **2**, 152-159.

Richards, M., Hultin, H. (2002) Contributions of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 555–564.

Schellekens, M. (1996) New research issues in sous-vide cooking. *Trends Food Sci. Technol.***7**, 256–262.

Schmedes, A., Holmer, G. (1989) A new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation. *JAOCS.* **66**, 813-817.

Secci, G., Parisi, G. (2016) From farm to fork: lipid oxidation in fish products. *Ital. J. Anim. Sci.* **15**, 124-136.

Silva, J. L., Chamul, R. S. (2000) Composition of Marine and Freshwater Finfish and Shellfish Species and Their Products. U: Marine & Freshwater products handbook (Martin, R. E., Carter, E. P., Flick, Jr., G. J., Davis, L. M.), Technomic Publishing Company Inc, Lancaster-Basel.

Stepanović, B., Radanović, D., Šumatić, N., Pržulj, N, Todorović, J., Komljenović, I., Marković, M. (2001) Tehnologija proizvodnje ljekovitih, aromatičnih i začinskih biljaka, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva Republike Srpske, Banja Luka.

Šilješ, I., Grozdanić, Đ., Grgesina, I. (1992) Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja, Školska knjiga, Zagreb.

Škevin, D. (2003) Utjecaj prirodnih antioksidanasa na održivost i svojstva djevičanskog maslinovog ulja sorte oblica i buharica, doktorski rad, Prehrambeno biotehnološki fakultet, Zagreb.

Tacon, A.G.J., Metian, M. (2013) Importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Rev. Fisher. Sci.* **21**, 22-38.

Timm-Heinrich, M., Eymard, S., Baron, C.P., Nielsen, H.H., Jacobsen, C. (2013) Oxidative changes during ice storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed different ratios of marine and vegetable feed ingredients. *Food Chem.* **136**, 1220–1230.

Tokur, B., Korkmaz, K. (2007) The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish. *Food Chem.* **104**, 754-760.

Toldrá, F., Aristoy, M.C. (2010) Handbook of meat processing, Blackwell Publishing, Iowa.

Tomašević, A. (1982) Mogućnosti korišćenja ljekovitog bilja s našeg krša. *Šumarski list.* **106**, 125-139.

Turner, R., McLean, C. H., Silvers, K. M. (2006) Are the health benefits of fish oils limited by products of oxidation?. *Nutr. soc.* **19**, 53-62.

Wąsowicz, E., Gramza, A., Heś, M., Jeleń, H. H., Korczak, J., Małecka, M., Mildner-Szkudlarz, S., Rudzińska, M., Samotyja, U., Zawirska-Wojtasiak, R. (2004) Oxidation of lipids in food. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **13**, 87-100.

Willfort, R. (1978) Ljekovito bilje i njegova upotreba, Mladost, Zagreb.



## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

*Katarina Poler*

Ime i prezime studenta