

Oksidacija masti u mesu i mesnim proizvodima

Novina, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:658911>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Katarina Novina

6229/PT

OKSIDACIJA MASTI U MESU I MESNIM PROIZVODIMA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i tehnologija mesa i ribe

Mentor: Prof. dr.sc. Helga Medić

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju mesa i ribe

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Oksidacija masti u mesu i mesnim proizvodima

Katarina Novina, 0058198299

Sažetak: Oksidacija masti u mesu i mesnim proizvodima povezana je s razvojem užglosti i produkata oksidacijskog kvarenja. Zbog visokog sadržaja višestruko nezasićenih masnih kiselina meso je osjetljivo na oksidaciju masti tijekom obrade i skladištenja. Produkti oksidacije mogu promijeniti kvalitetu mesa: boju, teksturu, okus i miris te imati nepovoljno djelovanje na zdravlje ljudi. Postoji mnogo metoda za određivanje stupnja oksidacije mesa nastale tijekom prerade ili skladištenja. Najčešće korištena metoda je određivanje sekundarnih produkata oksidacije masti, malondialdehida, TBA testom. Metoda ima brojne nedostatke ali se zbog svoje jednostavnosti još uvijek koristi.

Ključne riječi: malondialdehid, meso, oksidacija masti, tiobarbiturna kiselina

Rad sadrži: 29 stranica, 8 slika, 21 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Prof.dr.sc. Helga Medić

Pomoć pri izradi: dr.sc. Nives Marušić Radovčić

Datum obrane: rujan 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering

Laboratory for Meat and Fish Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Meat and meat products oxidation

Katarina Novina, 0058198299

Abstract: Lipid oxidation in meat is associated with the development of rancidity and products of oxidative deterioration. Due to the high content of polyunsaturated fatty acids, meat is sensitive to lipid oxidation during the processing and storage. Products of oxidation may change food quality like sensory characteristics (color, texture, aroma) and can have negative effect on human health. There are a lot of methods for measuring the degree of lipid oxidation in meat during processing and storage. The most commonly used method is determining the secondary lipid oxidation product, malodialdehyde, using TBA test. Although this method has some disadvantages, it is most commonly used because of its simplicity.

Keywords: malodialdehyde, meat, lipid oxidation, thiobarbituric acid

Thesis contains: 29 pages, 8 figures, 21 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: Professor Helga Medić, PhD.

Technical support and assistance: Nives Marušić Radovčić, PhD.

Defence date: September 2017.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.	OKSIDACIJA MASTI	2
2.2.	ČIMBENICI KOJI UBRZAVAJU OKSIDACIJU MASTI (PROKSIDANSI).....	5
2.2.1.	ANTIOKSIDANSI I SINERGISTI.....	5
2.2.2.	TERMOOKSIDACIJSKE PROMJENE MASTI	8
2.3.	OKSIDACIJA MASTI U MESU	8
2.4.	ODREĐIVANJE OKSIDACIJE MASTI U MESU I MESNIM PROIZVODIMA	9
2.4.1.	ODREĐIVANJE PRIMARNIH PROMJENA	10
2.4.2.	ODREĐIVANJE SEKUNDARNIH PROMJENA.....	11
2.4.3.	ODREĐIVANJE MEĐUPRODUKATA SLOBODNIH RADIKALA.....	12
2.5.	METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE MASTI	12
2.5.1.	KEMIJSKE METODE.....	12
2.5.2.	FIZIKALNE METODE	13
2.6.	TBA TEST.....	15
2.6.1.	MALONDIALDEHID I DRUGI TBA REAKTIVNI SPOJEVI	16
2.6.2.	RAZLIČITI POSTUPCI TBA TESTA	18
2.6.3.	INTERFERENTI	20
2.6.4.	OGRANIČENJA TBA TESTA	21
2.6.5.	ODNOS TBA TESTA SA SENZORSKOM ANALIZOM	21
2.6.6.	PREDNOSTI TBA TESTA.....	21
2.6.7.	NEDOSTACI TBA TESTA I MJERE OPREZA	22
2.6.8.	PRIMJENA TBA TESTA.....	22
2.7.	KATALIZA PEROKSIDACIJE MASTI.....	22
2.7.1.	NEENZIMSKA KATALIZA.....	22
2.7.2.	PEROKSIDACIJA MASTI OVISNA O ŽELJEZOVOM REDOKS PROCESU	23
2.7.3.	ENZIMSKA KATALIZA.....	23
2.8.	BIOLOŠKI I TEHNOLOŠKI FAKTORI KOJI UTJEČU NA PEROKSIDACIJU MASTI U MESU.....	23
2.9.	KVALITETA MESA POD UTJECajem PEROKSIDACIJE MASTI.....	25
2.9.1.	UGODNI I NEUGODNI OKUSI.....	25
2.9.2.	POGORŠANJE BOJE OKSIDACIJSKIM REAKCIJAMA.....	25
2.9.3.	TEKSTURA MESA POD UTJECajem PEROKSIDACIJE MASTI	26
2.9.4.	NUTRITIVNA VRIJEDNOST MESA POD UTJECajem PEROKSIDACIJE MASTI	26

3.	ZAKLJUČAK.....	28
4.	POPIS LITERATURE	29

1. UVOD

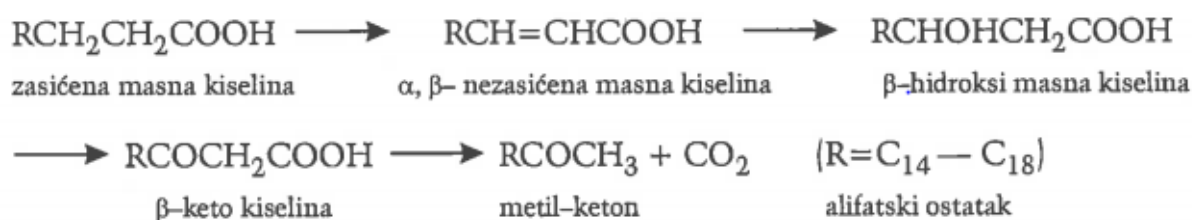
Oksidacija masti značajan je čimbenik pri procjeni kvalitete i prihvatljivosti mesa, odgovorna je za promjenu senzorskih svojstava kao i tvorbu potencijalno toksičnih spojeva. Oksidacijska užeglost predstavlja jedan od glavnih uzorka kvarenja mesa što dovodi do gubitka okusa, promjene sastava, čvrstoće, izgleda i hranidbene vrijednosti mesa. Proces koji uzrokuje oksidacijsko razlaganje masti nazivaju se peroksidacijom masti, a započinju ih slobodni radikali. Meso koje sadrži veliku količinu polinezasićenih masnih kiselina osjetljivo je na oksidaciju masti i proteina čiji nastali produkti utječu na njegovu kvalitetu, pohranu i čuvanje, a time izravno mogu utjecati i na zdravlje čovjeka. Kvaliteta mesa širok je pojam i ekonomski je vrlo značajan. Podrazumijeva analizu mnogobrojnih pokazatelja, a pod utjecajem je više čimbenika (pasma, genotip, spol, hranidba, sustav držanja, način klanja, hlađenje, čuvanje mesa). Kvalitetu mesa određuje i niz drugih pokazatelja poput sadržaja hranjivih tvari (sadržaj proteina, masti, kolesterola, aminokiselina, masnih kiselina, minerala, vitamina, vode i pepela) i tehnoloških svojstava (temperatura, pH vrijednosti, električna provodljivost, sposobnost otpuštanja i vezanja vode). Potrošači kvalitetu mesa, između ostalog, procjenjuju i na osnovi boje, pri čemu se očekuje da svježije meso ima svjetliju boju.

Određivanje oksidacije masti u mesu je vrlo bitno jer se tako može odrediti kvaliteta, primjena, skladištenje i tretiranje mesa. Iako postoje razne metode kojima se određuje oksidacija, najznačajnija metoda je TBA test, kojim se određuje sekundarni produkt oksidacije, malondialdehid. Malondialdehid je reaktivan spoj koji može uzrokovati toksičan stres stanice, tvori kovalente adukte s DNA te se zbog toga smatra mutagenim.

2. TEORIJSKI DIO

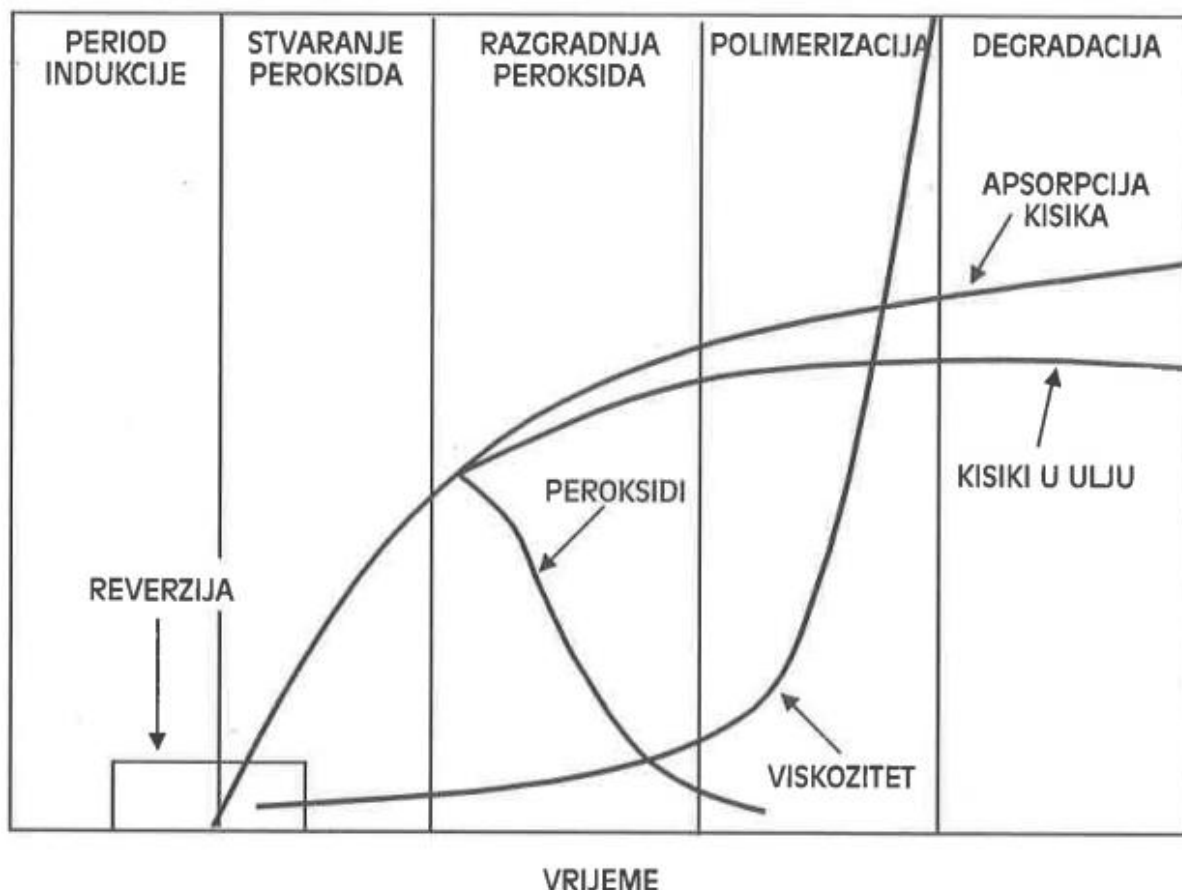
2.1. OKSIDACIJA MASTI

Oksidacijsko kvarenje je najčešći oblik kvarenja masti, a predstavlja proces oksidacije ugljikovodičnog lanca masnih kiselina. Zasićene masne kiseline su relativno inertne i na njih kisik djeluje pod točno određenim uvjetima ili biološkom katalizom. U tim slučajevima se kisik gotovo uvijek veže na C-3 atom, β -položaj, a ta reakcija se naziva β -oksidacija (Slika 1.). β -oksidacija masti i namirnica događa se rijetko pri normalnim uvjetima, a uzrokuju je mikroorganizmi ili enzimi kada masti nisu čiste ili su dio neke namirnice, gdje se uz masti nalazi voda i druge tvari kao hranjivi supstrati mikroorganizama. Primarni produkti β -oksidacije su β -keto-kiseline, a sekundarni su metil ketoni. Prisutnost vrlo malog udjela metil ketona daje mastima neugodan miris užglosti, svojstven za ovu vrstu kvarenja. U prisutnosti vode iz β -keto kiselina mogu nastati dvije masne kiseline kraćeg lanca. Sprječavanje β -oksidacije postiže se pasterizacijom, sterilizacijom, podešavanjem pH ili dodavanjem nekih konzervansa proizvodima koji su podložni ovoj vrsti kvarenja.



Slika 1. Oksidacija zasićene masne kiseline[1]

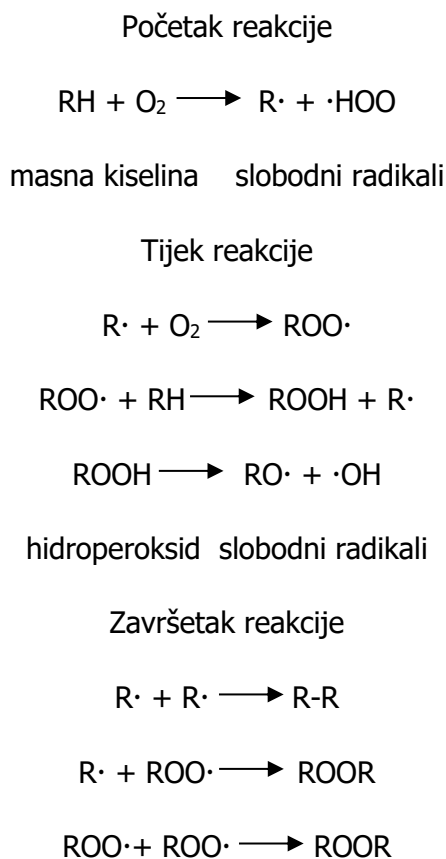
Kod nezasićenih masnih kiselina, koje se nalaze u većoj ili manjoj mjeri u svim prirodnim mastima i uljima, dolazi do vezanja kisika iz zraka na dvostruke veze. Oksidacijsko kvarenje masti kisikom iz zraka naziva se autooksidacija jer nastali produkti katalitički pospješuju daljnji tijek oksidacije i najčešći je način kvarenja čistih masti. Proces autooksidacije može u početku biti vrlo spor, ali se djelovanjem autokatalitičkih procesa ubrzava, a količina oksidacijskih produkata povećava (Slika 2.). U početnoj fazi autooksidacije masti, koja se naziva vrijeme indukcije, količina produkta oksidacije je tako mala da ne djeluje na organoleptička svojstva ni na prehrambenu vrijednost masti. Hoće li doći do autooksidacije masti brže ili polaganije ovisi o sastavu masti, uvjetima čuvanja i prisutnosti sastojaka koji ubrzavaju odnosno usporavaju ovu reakciju[1].



Slika 2. Autooksidacija masti[1]

Da bi rastumačili pojavu autokatalize prilikom autooksidacije Farmer i sur. (1942) su postavili teoriju slobodnih radikala[2]. Slobodni radikal je atom ili molekula sa nesparenim elektronom i zbog toga je jako nestabilan i reaktivan. Nakon što slobodan radikal privuče elektrone sa stabilnog spoja, taj stabilan spoj postaje slobodan radikal. Takav novonastali slobodan radikal reagira s drugim spojem koji postaje slobodan radikal i reagira sa sljedećim spojem. Zbog toga se reakcije sa slobodnim radikalima događaju kao niz reakcija[3]. U prvoj fazi kisik iz zraka napada nezasićene masne kiseline i pri tome se stvaraju slobodni radikali, nastali slobodni radikali dalje reagiraju s masnim kiselinama stvarajući nove radikale i tako uz ubrzanje dolazi do lančane reakcije. U drugoj fazi se iz slobodnih radikala stvaraju hidroperoksidi i slobodni radikali peroksida, vezanjem kisika na slobodne radikale masnih kiselina. Hidroperoksidi su primarni produkti oksidacije, bez mirisa i okusa, nestabilni su pa se dalje razgrađuju na slobodne radikale i razgradne produkte oksidacije koji uzrokuju neugodan okus i miris masti. Reakcije koje uzrokuju raspad hidroperoksida i stvaranje sekundarnih oksidacijskih produkata su vrlo složene. Oksidacija se nastavlja lančano sve dok slobodni radikali ne reagiraju međusobno (treća faza) stvarajući polimere koji su neaktivni, time se završava autooksidacija. Lančana reakcija se može kraće prikazati, ako se nezasićenu masnu

kiselinu kod koje je H nestabilan (H atom vezan na ugljikov atom u α -položaju prema dvostrukoj vezi) označi s RH. Tijek autooksidacije se tada može prikazati na sljedeći način (Slika 3.).



Slika 3. Reakcije autooksidacije[4]

Razgradnjom hidroperoksida nastaje veliki broj sekundarnih produkata (aldehidi, ketoni, alkoholi, masne kiseline, epoksidi i dr.) koji mogu nastati direktno razgradnjom hidroperoksida ili naknadnim reakcijama. Pretpostavlja se da alkoholi i ketoni nastaju direktno iz hidroperoksida, a iz ketona naknadno nastaju masne kiseline[4].

Produkti autooksidacije već u malim količinama daju mastima neugodan okus i miris. Tako na primjer 2,4-heptadienal, 2,4-oktadienal ili 3-heksanal, koji nastaju iz hidroperoksida linolenske kiseline, daju nekim mastima neugodan okus već s udjelom 0,01 mg/kg. Tako mali udio produkata autooksidacije javlja se kod nekih masti već u vremenu indukcije kad masti smatramo još dobrima za prehranu. Ta pojava se naziva reverzijom okusa i mirisa. Oksidacijom masti gube esencijalne masne kiseline koje se kao nezasićene s dvije ili više dvostrukih veza oksidiraju prve. Produkti oksidacije djeluju toksično pa je potrebno spriječiti kvarenje masti tijekom tehnološkog postupka i skladištenja. Masti treba stalno kontrolirati i oksidirane masti maknuti iz upotrebe[1].

2.2. ČIMBENICI KOJI UBRZAVAJU OKSIDACIJU MASTI (PROKSIDANSI)

Iako procesi autooksidacije u prisustvu kisika teku sami od sebe, mogu biti ubrzani nizom čimbenika, a najčešći je toplina. Porastom temperature proces se naglo ubrzava pa se pri 100°C autooksidacija ubrzava i do 300 puta, ovisno o količini kisika koji je na raspolaganju. Autooksidaciju također ubrzava svjetlo kao nosilac energije, a najviše ono u ultraljubičastom dijelu spektra, budući da ga masti apsorbiraju. Oksidacijski procesi na svjetlu su pojačani u prisustvu klorofila međutim on u mraku djeluje kao antioksidans. Kao katalizatori autooksidacije djeluju i tragovi metala nastali djelovanjem slobodnih masnih kiselina na metalne dijelove tijekom procesa proizvodnje ili skladištenja. Prisutnost vrlo malog udjela (od 0,01-1 mg/kg) metala ubrzava autooksidaciju, a najjači metalni prooksidans je bakar. Prema nekim istraživanjima metali su prooksidansi samo u slučaju kada su već nastali hidroperoksidi, za razliku od temperature i svjetla koji ubrzavaju početak autooksidacije. Djelovanjem metala na hidroperokside dolazi do oksidacije iona metala i stvaranja hidroksil iona i slobodnih radikala. U mesnim prerađevinama kao i u drugim proizvodima u kojima je mast sastavni dio, na kvarenje masti mogu utjecati enzimi i čitav niz drugih sastojaka prisutnih u tim proizvodima. Da bi se usporio proces autooksidacije potrebno je ukloniti toplinu, svjetlo, zrak i druge katalizatore. Hladnim skladištenjem može se znatno produžiti vijek trajanja jestivih masti i proizvodima s mastima. Teže je zaštititi masti od visoke temperature u postupcima proizvodnje i prerade, zbog čega se u modernim kontinuiranim postupcima masti izlažu višoj temperaturi samo kratko vrijeme i pod vakuumom. Upotrebom tamne ili neprozirne ambalaže može se isključiti svjetlo, pri čemu se treba odabrati takav materijal koji ne propušta valne duljine svjetla koje mast može apsorbirati[1].

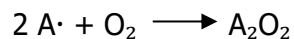
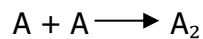
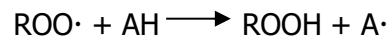
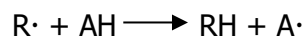
2.2.1. ANTIOKSIDANSI I SINERGISTI

Prirodna održivost masti može se poboljšati dodavanjem tvari koje inhibiraju autooksidaciju tzv. antioksidansi. Njihova svrha je stabilizirati slobodne radikale tako što im doniraju vodik ili primaju elektrone sa njih stvarajući komplekse te odgoditi početak autooksidacije i usporiti oksidaciju masti u mesu. U literaturi se navodi velik broj spojeva koji imaju to svojstvo, ali se svi ne mogu koristiti za ljudsku prehranu. Antioksidans koji se koristi u ljudskoj prehrani mora zadovoljiti sljedeće uvjete:

- mora biti topljiv u uljima i mastima;
- mora biti aktivan u malim količinama (0,001-0,02%);

- ne smije prouzrokovati strani okus, miris i boju ni nakon dužeg skladištenja ili zagrijavanja;
- antioksidacijsko djelovanje ne smije biti ograničeno samo na mast, već mora djelovati i na proizvod u kojem se mast nalazi;
- ne smije biti skup, da ne poveća cijenu proizvoda;
- njegova identifikacija i određivanje u proizvodima mora biti jednostavna.

Antioksidansi su većinom aromatski spojevi fenolnog karaktera s dvije hidroksilne skupine u para- i orto- položaju što omogućuje prelaženje tog spoja u kinonski, odnosno hidrokinonski i obrnuto. Prepuštajući svoj vodik slobodnom aktiviranom radikalu masne kiseline ili slobodnom radikalu peroksida, prekidaju lančanu reakciju i time usporavaju proces autooksidacije. Mehanizam djelovanja antioksidansa može se prikazati shemom u kojoj je slobodni radikal masne kiseline označen s $R\cdot$, slobodni radikal hidroperoksida s $ROO\cdot$, a antioksidans s AH (Slika 4.).



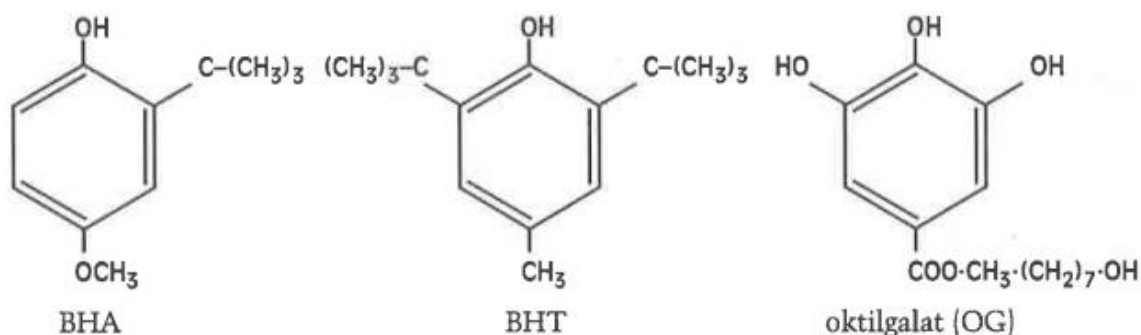
Slika 4. Mehanizam djelovanja antioksidansa[1]

Nastali spojevi A_2 i A_2O_2 su stabilni i ne djeluju na daljnje promjene u procesu autooksidacije. Dodatak antioksidansa produžuje održivost, vrlo je važno da se antioksidans doda svježoj masti niskog peroksidnog broja, jer već oksidiranu mast naknadno dodani antioksidans ne može regenerirati. Proces usporavanja autooksidacije teče dok se prisutni antioksidans potpuno ne iscrpi. Antioksidacijsko djelovanje nekog antioksidansa izražava se pomoću antioksidacijskog indeksa (AI), koji označava koliko se puta poveća održivost neke masti dodatkom antioksidansa:

$$AI = I_A / I_0 \quad (1)$$

Gdje je I_0 – vrijeme indukcije masti bez antioksidansa; I_A – vrijeme indukcije masti s antioksidansom. Vrijeme indukcije je broj sati potreban da mast dostigne peroksidni broj 5 mmol/kg.

Danas je poznat veliki broj prirodnih i sintetskih antioksidansa, ali se u praksi ne koriste svi za stabilizaciju jestivih masti. Najpoznatiji prirodni antioksidansi su tokoferoli koji dolaze kao neosapunjivi sastojci gotovo svi prirodnih ulja i masti. Prvi prirodni spoj koji je predložen kao antioksidans je lecitin koji je smjesa različitih fosfolipida. Od ostalih antioksidansa treba navesti začinsko bilje, prvenstveno ono iz porodice *Lamiaceae*. Najviše radova je objavljeno o ekstraktu ružmarina i kadulje koji imaju izrazito antioksidacijsko djelovanje, a zadržavaju ga pri visokoj temperaturi (98-194°C). Od sintetskih antioksidansa najpoznatiji i najviše upotrebljavani su : butilhidroksianisol (BHA), butilhidroksitoulen (BHT), terc-butilhidrokinon (TBHQ) i esteri galne kiseline (Slika 5.). Dodatak ovih antioksidansa je zakonski reguliran i ne smije prelaziti 0,01% odnosno 0,02% računato na masu masti[1].



Slika 5. Sintetski antioksidansi[1]

Budući da potrošači zahtijevaju „label friendly“ prehrambene proizvode, korištenje sintetičkih antioksidansa nije sigurno, zbog toga što imaju loš utjecaj na zdravlje. Također postoje problemi kod primjene prirodnih antioksidansa u prehrani zbog toga što oni imaju posebnu boju, okus i visoku cijenu. Prirodni antioksidansi su najčešće napravljeni od sjemenki, žitarica, orašastih plodova i biljnog ulja te je zbog toga jako važno umanjiti njihov izvorni okus, aromu i boju jer su neprihvatljivi u mesnim proizvodima.

Sinergisti su tvari koje produžuju djelovanje antioksidansa, a najviše se koriste: limunska, askorbinska i octena kiselina te askorbil palmitat. Dodatak sinergista također je reguliran zakonom i obično se uz antioksidans dodaje i 0,005-0,02% sinergista, ali svaki sinergist ne odgovara svakom antioksidansu. Mehanizam djelovanja sinergista nije još potpuno objašnjen. Najčešće se navodi da sinergisti reduciraju antioksidans dajući mu H atom, pa produžuju vrijeme njegova djelovanja ili se vežu s tragovima metala i isključuju njihovo prooksidacijsko djelovanje na proces autooksidacije[1].

2.2.2. TERMOOKSIDACIJSKE PROMJENE MASTI

U industrijskim procesima pripreme hrane, kao i u kućanstvu, prženje osobito duboko prženje je najčešći način pripreme hrane, jer je brzo i lako prilagodljivo masovnoj proizvodnji, a daje ukusan i atraktivan proizvod. S druge strane, pri povišenoj temperaturi ubrzava se razgradnja masti, jer se u uvjetima prženja (visoka temperatura, prisutnost vodene pare, kontakt površine masti sa zrakom i aeracija u dubljim slojevima) odvijaju složene kemijske reakcije pa će se poslije određenog vremena zagrijavanja naći osim produkata oksidacije (hidroperoksida i njihovih razgradnih produkata) i produkti termooksidacije kao cikličke masne kiseline, dimeri i polimeri masnih kiselina i triacilglicerola, oksidni polimeri i drugi hlapljivi i nehlapljivi spojevi, od kojih je do sada identificirano preko 400. Stupanj termooksidacijskih promjena ovisi o vrsti masti, temperaturi i dužini zagrijavanja. Kako su produkti termooksidacije, posebice polimeri i cikličke masne kiseline nepoželjni i štetni, nužno je vršiti kontrolu kakvoće masti[1].

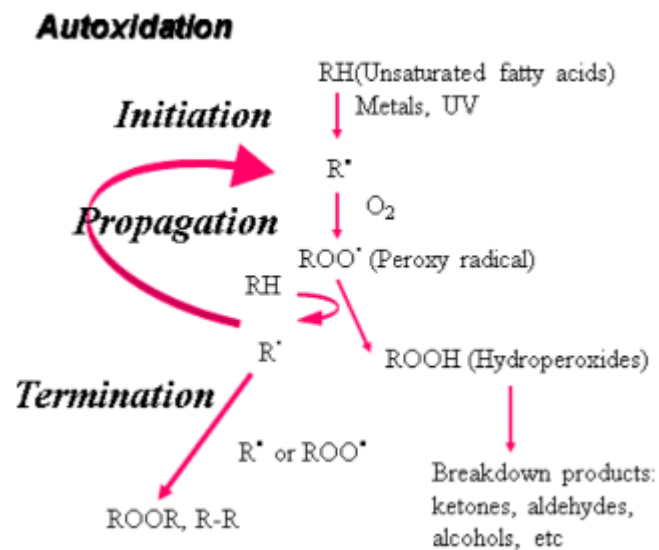
2.3. OKSIDACIJA MASTI U MESU

Masti su primarno odgovorne za poželjnu i nepoželjnu aromu te okus mesa. Oksidacija masti u većini slučajeva pogoršava kvalitetu mesa i uzrokuje neprihvatljiv okus za potrošače. Povećanje oksidacije masti može uzrokovati promjenu okusa, boje, teksture i prehrambene vrijednosti mesa. Postoje i drugi štetni utjecaji povezani sa oksidacijom masti kao što je smanjenje roka trajanja, povećavanje neugodnog okusa, promjene funkcionalnih i senzorskih karakteristika te ponekad stvaranje kancerogenih tvari. Malondialdehid je jedan od razgradnih produkata oksidacije masti i smatra se da je kancerogen.

Oksidacija masti događa se enzimskim i neenzimskim reakcijama, a te kompleksne reakcije u mesu objašnjavaju se nizom reakcija. Najvažniji mehanizam oksidacije masti u mesu je autooksidacija, kontinuirani niz reakcija slobodnih radikala (Slika 6.). Također se pokazalo da kisikovi slobodni radikali često uzrokuju biološka oštećenja masti, nukleinskih kiselina, enzima i proteina, posebno reagiraju sa polinezasićenim masnim kiselinama i tako nastaju peroksidi u stanicama[4].

Postoji puno faktora koji utječu na oksidaciju masti u mesu, na primjer toplina i svjetlo, kataliza, sadržaj kisika, fosfolipidi, nezasićene masne kiseline, stanje prije klanja, procesi koji uništavaju membrane mišića, i pH. Prevencijom ovih faktora zaustavlja se oksidacija što je vrlo važno kada se proizvode mesni proizvodi. Fosfolipidi koji se nalaze u stanicama membrane vrlo su osjetljivi na oksidaciju u mesu zbog toga što sadrže više nezasićenih masnih kiselina u usporedbi sa drugim lipidima. Nemasno meso sadrži veliki postotak fosfolipida što ga čini

osjetljivim na oksidaciju, zbog toga fosfolipidi najviše doprinose užglosti nemasnog mesa uzrokovanoj oksidacijom. Na oksidaciju masti utječe i stupanj nezasićenosti masnih kiselina u fosfolipidima i frakcijama triacilgliceroa. Meso od različitih stočnih vrsta ima različitu osjetljivost na oksidaciju masti zato što različite vrste sadrže različite omjere nezasićenih masnih kiselina, na primjer piletina sadrži visoki postotak nezasićenih masnih kiselina i zato u piletini brže dolazi do oksidacije masti nego kod svinjetine. Svinjetina sadrži više nezasićenih masnih kiselina nego govedina te je osjetljivija na oksidaciju masti uspoređujući s govedinom. Stupanj oksidacije masti ovisi o vrsti mesa te procesima mljevenja, sjeckanja, ljuštenja, emulgiranja i kuhanja jer oni ubrzavaju oksidaciju masti. Glavni razlog ubrzavanja je taj što procesiranje oslobađa membranske veze fosfolipida te mogu brže oksidirati. Procesiranje uništava strukturu mišića što uzrokuje reakciju nezasićenih masnih kiselina sa kisikom iz zraka te se povećava kontakt sa enzimima i hem pigmentima koji sadrže metalne ione te dolazi do autooksidacije. Kontrola tih faktora najbolji je način zaustavljanja oksidacije masti i neugodnih okusa u mesnim proizvodima[4].



Slika 6. Autooksidacija u mesu[4]

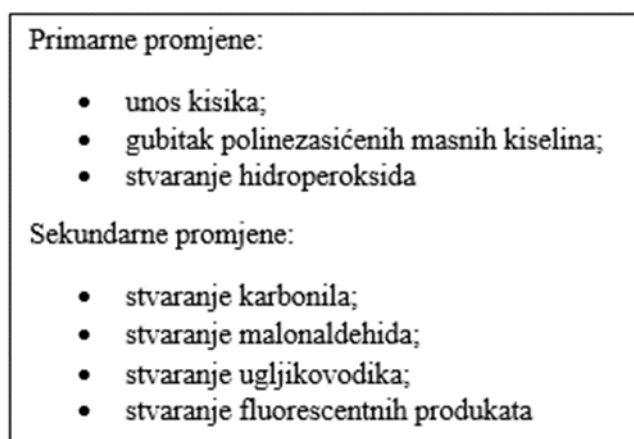
2.4. ODREĐIVANJE OKSIDACIJE MASTI U MESU I MESNIM PROIZVODIMA

Oksidacija dovodi do užglosti te je povezana s problemom skladištenja masti i ulja. Razgradnjom hidroperoksida nastaju kompleksne smjese spojeva male molekulske mase sa karakterističnim okusom i mirisom. Ti spojevi uzrokuju užglost, oporost i druge neugodne okuse u mesu. Doprinos koji napravi pojedini spoj okusu i aromi mesa ovisi o koncentraciji tog spoja. Alhidi, nezasićeni alkoholi i vinil ketoni imaju relativno niski prag mirisa, neki imaju karakterističnu aromu pri koncentracijama manjim od 0,001 mg/kg te postoji mogućnost

da doprinesu okusu ako se nalaze u mesu. Pošto je oksidacija masti vrlo složen proces, postoji puno načina na koji se može određivati stupanj oksidacijskih promjena koje se događaju u hrani. Idealno bi bilo kada bi postajala metoda za određivanje oksidacije masti koja bi određivala fizikalne i kemijske promijene senzorski i prepoznala kada te promijene postanu neprihvatljive. Kada se korisnost određenog analitičkog procesa procjenjuje trebaju se postaviti određena pitanja:

- Predstavlja li svojstvo koje mjerimo dovoljno veliki opseg oksidacije?
- Je li metoda dovoljno specifična za to određeno svojstvo?
- Hoće li se svojstvo koje mjerimo promijeniti drugim utjecajima osim oksidacije?

Metode koje se koriste za određivanje oksidacije masti u mesu tradicionalno se dijele na one koje određuju primarne promjene te one koje određuju sekundarne promjene(Slika 7.)[5].



Slika 7. Parametri kojima se određuje oksidacija masti[5]

2.4.1. ODREĐIVANJE PRIMARNIH PROMJENA

Metode koje određuju primarne promjene mogu se podijeliti na one koje određuju gubitak reaktanata (nezasićene masne kiseline ili kisik) te na one koje prate nastajanje primarnih produkata oksidacije masti (hidroperoksida). Općenito se više koriste metode za određivanje stupnja oksidacije u nekuhanim proizvodima koji se pohranjuju pri niskim temperaturama. Promjena u sastavu fosfolipida kod mehanički odkoštene piletine i govedine pokazuje oksidativne promjene tijekom skladištenja u hladnjacima. Za praćenje oksidacije masti koristi se i metoda određivanja apsorpcije kisika[5].

Nakon što se masti ekstrahiraju iz hrane hidroperoksidi se u mesu određuju različitim metodama. Najčešće korištena metoda za određivanje količine hidroperoksida je određivanje

peroksidnog broja, a ona uključuje jodometrijsku metodu. Određivanje peroksidnog broja koristi se za procjenu oksidacije masti u brojnim mesnim proizvodima, uključujući svinjsku mast i meso, goveđe meso, mljevenu piletinu i puretinu. Prilikom određivanja peroksidnog broja treba pripaziti jer razgradnja peroksida u sekundarne produkte može rezultirati smanjenjem stupnja oksidacije. Na primjer, peroksidni broj kod govedine se smanjuje nakon dva tjedna skladištenja u hladnjacima. Znanstvenici su također zaključili da određivanje peroksidnog broja nije najbolji način određivanja stupnja oksidacije za meso koje se dugo skladišti, osobito mljeveno meso. Odnos između peroksidnog broja i oksidiranog okusa u mesu varira ovisno o vrsti mesa i načinu na koji je meso obrađeno[4].

U zadnje vrijeme, oksidacijski procesi se povezuju sa starenjem organizma, rakom i drugim bolestima. Zbog velikog interesa za identifikaciju i određivanje hidroperoksida u tekućinama i tkivima, razvijene su kvantitativne metode koja određuje prisutnost hidroperoksida masnih kiselina, a ne njihovih razgradnih produkata. Hidroperoksidi masnih kiselina se mogu odrediti pomoću tekućinske kromatografije visoke djelovnosti (HPLC), plinskom kromatografijom ili masenom spektrometrijskom analizom. Za plinsku kromatografiju ili masenu spektrometriju potrebno je reducirati hidroperoksid u odgovarajuću hidroksi kiselinu tretiranjem sa trifenilfosfinom ili natrijevim borohidridom. Ostale metode koje se koriste uključuju fluorescencijske metode koje se baziraju na detekciji fluorescencije tijekom oksidacije luminola hidroperoksidom[5].

2.4.2. ODREĐIVANJE SEKUNDARNIH PROMJENA

U slučajevima gdje se oksidacija događa ubrzano, na primjer u kuhanom mesu, primarni produkti se brzo razgrađuju u stabilne sekundarne produkte te je primjenjivije određivati sekundarne produkte kao pokazatelje oksidacije masti. Jedna od najstarijih i najkorištenijih metoda za određivanje sekundarnih produkata u mesu je test 2-tiobarbiturne kiseline (TBA). Stupanj oksidacije masti se definira kao TBA vrijednost i izražava se kao miligrami malondialdehida po kilogramu uzorka. Malondialdehid je relativno manji produkt oksidacije masti koji nastaje tijekom oksidacije polinezasićenih masnih kiselina i reagira sa TBA kako bi nastao obojeni kompleks sa apsorpcijskim maksimumom pri 530-532 nm.

Druge metode za određivanje sekundarnih promjena oksidacije masti uključuju određivanje hidrokarbonata (etana i pentana) i fluorescentnih produkata. Iako se primjenjuju za mesne proizvode, nisu u širokoj primjeni te se zbog toga ne smatraju dijelom rutinskih analitičkih metoda u prehrambenoj industriji[5].

2.4.3. ODREĐIVANJE MEĐUPRODUKATA SLOBODNIH RADIKALA

Procesi oksidacije masti u hrani i biološkim sustavima proučavani su analizama primarnih i sekundarnih produkata oksidacije masti, ali u zadnjih 20 godina poboljšanje u pulsnoj radiolizi i tehnikama rezonancije elektronskog spina (ESR) olakšali su detekciju i istraživanja kratkotrajnih međuprodukata slobodnih radikala. ESR spektroskopija određuje samo vrste sa nesparenim elektronima, kao što su slobodni radikali. Tehnika se bazira na apsorpciji energije mikrovalova (koja se dobiva prelaženjem elektrona na viši energetski nivo) kada je uzorak stavljen u promijenljivo magnetsko polje. Veliko ograničenje u detekciji slobodnih radikala ESR je potreba da koncentracija radikala ostane viša od 10^{-8} M. Životni vijek radikala u otopini je vrlo kratak (manji od 1ms) i koncentracija stabilnog stanja općenito ostaje ispod 10^{-7} M. Razvijeno je nekoliko pristupa kako bi se umanjio problem detekcije ili na povećanju stupnja nastajanja radikala ili smanjivanjem stupnja nestanka. Te tehnike uključuju brzo smrzavanje, liofilizaciju, sustav kontinuiranog protoka i hvatanje spina. Od nabrojanih tehnika hvatanje spina najčešće je korištena metoda za izbjegavanje problema niske koncentracije stabilnih radikala. Ova metoda koristi egzogeno dodane spojeve da bi se zarobili inicijalno proizvedeni visoko reaktivni radikali i pretvorili u višestabilne detektibilne radikalne adukte. Primjena ESR u proučavanju hrane je relativno nova, ali postaje značajno važna, na primjer detekcija slobodnih radikala ESR-om se trenutno istražuje kao metoda za određivanje hrane koja je bila ozračena. ESR spektroskopija može objasniti ulogu slobodnih radikala u stvaranju specifičnih okusnih i mutagenih spojeva u mesu[5].

2.5. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE MASTI

Određivanje stupnja oksidacije masti omogućuje poznavanje kvalitete masti, a time i mogućnost njene primjene i skladištenja. Iako postoji veliki broj metoda za praćenje oksidacijskih promjena masti, niti jedna ne obuhvaća sve razgradne produkte, pa se obično primjenjuje više metoda kako bi se dobio bolji uvid u stupanj oksidacijske razgradnje. Metode se mogu podijeliti na kemijske, fizikalne i senzorske[6].

2.5.1. KEMIJSKE METODE

Peroksidni broj (PB)

Određivanje peroksidnog broja jedna je od najstarijih i najprimjenjivanijih metoda za ispitivanje primarnih produkata oksidacije masti. Ova metoda je ograničena sa prolaznošću peroksida koji su međuprodukti u stvaranju ugljikovih spojeva. Neke od analitičkih metoda određivanja peroksidnog broja su jodometrijska metoda i kolorimetrijska metoda. Najviše se koriste jodometrijske metode, u kojima se određuje količina joda kojeg iz kalijvog jodida

oslobode peroksidi sadržani u mastima, izražava se u milimolima aktivnog kisika po kilogramu masti (mmol O₂/kg). Za određivanje peroksidnog broja koristiti se još i kolorimetrijska metoda koja se zasniva na oksidaciji željezo(II) soli u željezo(III) (fero soli u feri) i mjerenjem intenziteta nastalog obojenja. Međutim, neka istraživanja su pokazala da je užeglost stočne hrane povezana sa količinom MDA (malondialdehida), a ne sa peroksidnim brojem. Kada se TBA test usporedi sa peroksidnim brojem, dolazi do nekoliko kontradiktornih rezultata. Neka istraživanja pokazuju linearnu ovisnost između TBA vrijednosti i peroksidnog broja za polinezasićene masne kiseline. Druga istraživanja pokazuju da je TBA vrijednost u dobroj vezi sa peroksidnim brojem samo u uljima koja sadrže masne kiseline sa tri ili više dvostrukih veza. TBA vrijednost i peroksidni broj u smrznutoj kuhanoj svinjetini su uspoređivani te su dobiveni rezultati da TBA vrijednost brzo raste kuhanjem, prelazeći granicu prihvatljivosti, dok je peroksidni broj ostao nizak[6].

Anisidinski broj (AB)

Anisidinski broj obuhvaća sekundarne produkte oksidacije, a zasniva se na reakciji viših nezasićenih aldehida s p-anisidinom u kiselom mediju (octenoj kiselini). Iz vrijednosti za anisidinski broj može se procijeniti održivost masti.

Iz vrijednosti za peroksidni i anisidinski broj izračunava se oksidacijska vrijednost (OV), koja daje dobar uvid u sadržaj primarnih i sekundarnih produkata oksidacije[1].

$$OV = 2 PB + AB \quad (2)$$

Tiobarbiturni broj (TB) (test tiobarbiturne kiseline –TBA test)

Kod ove kolorimetrijske metode mjeri se intenzitet ružičaste boje na 532 nm, a koja nastaje kao rezultat reakcije tiobarbiturne kiseline s malondialdehidom (sekundarnim produktom oksidacije višestruko nezasićenih masnih kiselina). Neki autori predlažu i mjerenje boje na 450 nm. Ova metoda nije isključiva jer tiobarbiturna kiselina reagira i s drugim aldehidima koji nisu produkti oksidacije masti[7].

2.5.2. FIZIKALNE METODE

Apsorpcija u UV-dijelu spektra

Oksidacijom polinezasićenih masnih kiselina dolazi do stvaranja konjugiranih veza, koje imaju maksimume apsorpcije u ultraljubičastom području od 230-375 nm. Konjugirani dieni i konjugirani hidroperoksidi, kao primarni produkti oksidacije pokazuju maksimum apsorpcije na 232 nm, a sekundarni produkti oksidacije (konjugirani trieni, aldehidi, ketoni i dr.) na 270 nm[1].

Plinska kromatografija

Ova metoda se sve češće koristi za određivanje oksidacijskih promjena na nezasićenim masnim kiselinama, njom je moguće odrediti mali udio hidroperoksida, koji se ne može dokazati određivanjem peroksidnog broja. Plinski kromatografi opremljeni „headspace“ analizatorom sve se više koriste za određivanje hlapljivih spojeva (najčešće aldehida), koji nastaju razgradnjom masti. Plinska kromatografija se može uspješno koristiti za praćenje čiste masti, dok je u kompleksnim sustavima identifikacija prilično otežana[1].

Određivanje količine heksanala

Ova metoda uključuje određivanje količine heksanala u parnom destilatu i koristi ga u plinskoj kromatografiji. Također je otkriveno da količina heksanala u destilatu pokazuje linearnu ovisnost sa odgovarajućom TBA brojem[8].

Određivanje indeksa refrakcije

Konjugirani dieni hidroperoksida, kao i polimeri povećavaju indeks refrakcije, pa se oksidacijske promjene masti mogu pratiti određivanjem indeksa refrakcije[1].

Određivanje količine malonaldehida

Malondialdehid (MDA) nastaje prilikom peroksidacije masti, odnosno kada reaktivni kisikovi spojevi peroksid i superperoksid radikal razgrađuju višestruko nezasićene masne kiseline pri čemu nastaju razni aldehidi pa tako i MDA. MDA je organski spoj kemijske formule $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$, reaktivan je aldehyd i jedan je od mnogih reaktivnih elektrofila koji može uzrokovati toksični stres stanice. Također, MDA može stvarati kovalentne adukte s proteinima, ali i s DNA te se zbog toga smatra mutagenim. Odnos između količine MDA i oksidacije masti pobudio je zanimanje znanstvenika da istražuju metode za kvantifikaciju.

Metoda za određivanje MDA ultraljubičastom spektrofotometrijom koristi razliku u apsorpciji između zakiseljene i lužnate MDA otopine na 267 nm. Ultraljubičasti apsorpcijski spektar MDA je pH ovisan i njihova apsorpcija se mijenja između pH 3,0 i pH 7,0. Ovo ponašanje doprinosi disocijaciji enoličkog vodika sa povećanjem pH: pri pH 3 li niže smatra se da spoj ima cikličko planarnu delta cis konfiguraciju, sa intramolekularnom vodikovom vezom; iznad pH 7 je potpuno disociran i postoji kao planarni delta trans enolatni anion. Metoda je uspješno primjenjena za sadržaj MDA u destilatima užegle hrane. Njena osjetljivost je samo 40% vrijdnosti TBA testa, ali je dovoljna da se odredi granična vrijednost užeglosti. Test je jednostavniji, mnogo brži i specifičniji od TBA testa[8].

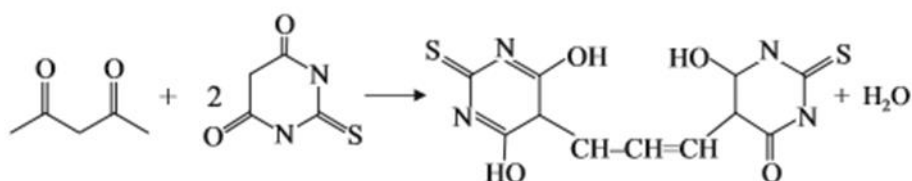
Određivanje MDA HPLC-om se prvotno koristila za kvantifikaciju MDA u vodenim destilatima, tako je otkrivena linearna korelacija između TBA broja i HPLC rezultata. Kasnije se ta metoda koristila kako bi se odredila oksidacija mesa, također je razvijena metoda za direktnu analizu MDA bez destilacije.

Za određivanje MDA plinskom kromatografijom potrebno je prvo napraviti derivaciju. Spojevi koji se koriste za derivaciju: 2-hidroksipiridin, 2,3-propandiol, 2-hidrazinobenzotiazol, pentafluoro-fenilhidrazin. Ovisno o metodi moguće je odrediti ili slobodnu MDA ili vezana MDA[8].

2.6. TBA TEST

TBA test za određivanje oksidacije masti koristi se već više od 60 godina. Kohn i Liversedge (1944) primjetili su da životinjsko tkivo koje je bilo inkubirano zrakom sa TBA stvara rozo obojenje[9]. Bernheim i suradnici (1948) su otkrili da je boja rezultat kompleksa stvorenog iz oksidacijskih produkata nezasićenih masnih spojeva i TBA[10]. MDA je najvažniji spoj koji reagira s TBA, ali postoje i drugi produkti oksidacije koji reagiraju s TBA, a to su α,β -nezasićeni aldehidi i nehlapljivi prekursori tih spojeva[8].

Ovim testom se određuje količina sekundarnog razgradnog produkata, malondialdehida, koji reagira s tiobarbiturnom kiselinom kada se zagrijava u kiseloj otopini da stvori adukt Schiffove baze koji je rozo obojen (apsorbira pri 532-535 nm) i koji je fluorescent (pobuđenost pri 515 nm, emisija pri 553 nm)(Slika 8.). Malondialdehid (MDA) nastaje oksidacijom masnih kiselina sa tri ili više dvostruke veze. TBA test određuje i druge TBA aktivne spojeve kao na primjer 2-alkane i 2,4-alkadienale te se zbog toga uz naziv TBA koristi i naziv TBARS (TBA reaktivni spoj). Ovaj test je zadovoljavajući za procjenu kvalitete masti i ulja u salu, mastima za kuhanje, sjemenkama soje, suncokretu te sjemenkama uljane repice u ranoj fazi užeglosti, također se koristi kao oznaka kvalitete u ribljoj i mesnoj industriji, ali postoje različiti rezultati odnosa sa senzorskim metodama za ribu i meso.



Slika 8. Nastanak Schiffove baze[11]

U stvarnosti, reakcija je puno više nejasna i nespecifična nego što je prikazano, uključuje alkane, alkene, alkadienale i druge produkte oksidacije kao i malonaldehid. Reakcije tih drugih produkata mogu biti različite po pomacima apsorpcijskih maksimuma, na mjestu ili u dodatku pika malonaldehida. Alkani reagiraju sa TBA u jednostavnoj kondenzaciji, kompleks je žut i apsorpira pri 450-455 nm. Acetaldehid i drugi aldehidi nastaju tijekom zagrijavanja reakcijske smjese sa kiselinom iz TBA kompleksa koji su narančasti ($\lambda_{\max}=496$ nm). Alkani apsorbiraju primarno pri 452 nm, dok 2,4-alkadieni stvaraju tipično crvene kromofore koji apsorbiraju pri 530 nm. Postoji malo dosljednosti u literaturi kako se računa apsorpcija na više valnih duljina - sa oba pika, na samo 530 nm ili samo 450 nm, ali čini se da se spektralne varijacije različitih aldehida mogu koristiti u identificiranju različitih aldehida u uzorku. Takva primjena je otežana unutarnjim promjenama, koje se događaju u aldehydima i apsorpcijskom maksimumu reakcije koji ovisi o pH, temperaturi i vremenu zagrijavanja te koncentraciji TBA i aldehida. Kao posljedica, teško je sa sigurnošću odrediti da li je aldehid endogeni ili je nastao reakcijama. Vidljiva i ultraljubičasta spektrofotometrija pigmenta ima primarni maksimum pri 532-535 nm i sekundarni pri 245-305 nm. Intenzitet boje je mjera koncentracije MDA i organoleptički je povezan sa užglosti. TBA test ima široku primjenu kao mjera oksidativne užglosti masne hrane, osobito u mesnim proizvodima. Uspoređuje se apsorpcija MDA-TBA kompleksa sa standardom 1,1,3,3 tetraetoksiopropan (TEP) ili 1,1,3,3 tetrametoksiopropan (TMP), budući da se MDA može dobiti kiselim hidrolizom iz TMP ili TEP u ekvimolekularnoj reakciji. Brzina reakcije TBA s MDA ovisi o koncentraciji TBA otopine, temperaturi i pH[11].

2.6.1. MALONDIALDEHID I DRUGI TBA REAKTIVNI SPOJEVI

MDA je tri-karbon dialdehid sa karbonilnom grupom na C-1 i C-3 položaju atoma. Postoje različiti mehanizmi različitih teorija o nastanku MDA, jedan od tih mehanizama pokazuje da se jedino peroksidi koji imaju α ili β nezasićene peroksidne grupe mogu ciklizirati u oblik MDA. Neka istraživanja pokazuju prisutnost male količine MDA iz:

- masne kiseline s manje od tri dvostruke veze, tada MDA nastaje sekundarnom oksidacijom primarnih karbonilnih spojeva;
- endoperoksida uključenih u sintezu prostaglandina, koji su nestabilni prekursori MDA sposobni za povećanje količine MDA uz toplinu ili kiselinu;
- željezo ovisne razgradnje aminokiselina, kompleksa ugljikohidrata, pentoz i heksoza te produkata slobodnih radikala koji nastaju gama zračenjem *in vivo*.

Spojevi koji reagiraju sa TBA, ali koji nisu MDA, nazivaju se TBA reaktivni spojevi (TBARS) zato što:

- reagiraju s TBA čime nastaje adukt čiji spektar je identičan onome dobivenom reakcijom s MDA standardom;
- njihov UV spektar je identičan onome MDA standarda pri pH 7,0 i pH 2,0;
- koeluiraju s MDA standardom kada su analizirani HPLC-om;
- postotak MDA određen TBA testom jednak je onom određenom s HPLC-om.

Polinezasićene masne kiseline u mesu su češće esterificirane s fosfolipidima nego s trigliceridima. Zbog toga su frakcije fosfolipida identificirane kao primarni supstrati u proučavanju oksidativnog kvarenja u mesu. Istraživanja su pokazala relativno visok postotak arahidonske kiseline, dokozatetraenoinske, dokozapentaenoinske i dokozaheksaenoinske kiseline u fosfatidilserinu. Ovi fosfolipidi su odgovorni za generiranje mnogih TBARS, uključujući MDA u pilećoj jetri, srcu, plazmi i jajima.[8] Faktori koji određuju količinu nastanka MDA iz peroksidiranih polinezasićenih masnih kiselina su:

- stupanj nezasićenosti masne kiseline;
- prisutnost metala;
- pH;
- temperatura;
- vrijeme zagrijavanja.

Istraživanja pokazuju da se razgradnja produkata hidroperoksida masnih kiselina u živim te *post mortem* tkivima može razlikovati od razgradnih produkta uzrokovanih toplinom i kiselinom tijekom TBA testa. Smatra se da MDA može biti uzročnik raka i mutagen te može utjecati na sigurnost hrane. Također su pokazala da vrsta kuhanja, vrijeme i temperatura utječu na sastav MDA koji može stvarati komplekse s aminokiselinama, proteinima, glikogenom i drugim sastojcima hrane.

Vrste interakcija s MDA:

- interakcije MDA s vodom: MDA se najčešće nalazi u svom enoinskom tautomeru u vodenoj otopini. Disocijacija enoinskog aldehida započinje pri pH 2,8 i završava pri pH 6,5. Pri pH koji je manji od 2,8 MDA je hlapljiv, što doprinosi stvaranju intramolekulskih vodikovih veza. Kada je pH viši od 6,5 MDA nije hlapljiv i tada aldehyd disocira u svoj anion.
- interakcije MDA s proteinima: MDA može biti vezan sa frakcijama proteina topljivima u vodi. Kako bi MDA ispario iz kompleksa proteina nužna je acidifikacija i zagrijavanje. MDA prvenstveno reagira s histidinom, argininom, tirozinom i metioninom.

- interakcije MDA s ugljikohidratima: može se prikazati jedino reakcija MDA sa glikogenom (količina vezanog MDA po mg glikogena se može usporediti sa MDA vezanim na proteine).

Teško je odrediti optimalne uvjete za otpuštenje MDA iz vezanog oblika jer se razlikuje od jedne vrste materijala do druge i zahtjeva različite uvjete za hidrolizu. Također je teško hidrolizirati sav MDA vezan za proteine mesa bez da se koriste jaki kiseli uvjeti i zagrijavanje koje može ugroziti stabilnost MDA-TBA kompleksa te uzrokovati probleme povezane sa kvantitativnim povratkom MDA tijekom TBA testa[8].

2.6.2. RAZLIČITI POSTUPCI TBA TESTA

Postoje različiti načini korištenja TBA testa u mesu i mesnim proizvodima:

- direktna reakcija TBA otopine sa hranom i ekstrakcija crvenog pigmenta;
- vodena kisela ekstrakcija mesa;
- reakcija parnih destilata na mesu;
- reakcija na prethodno ekstrahiranoj masti iz mesa;
- spektrofouometrijska metoda: ova metoda koristi fluorescentna svojstva TBA-MDA kompleksa da bi se odredila razina MDA u uzorku.

Parna destilacija se koristi sa homogenatima mesa. Direktno tretiranje uzorka mesa toplinom, enzimima koristi se zbog jednostavnosti i brzine postupka, ali je manje specifično i sklonije je sporednim reakcijama sa nelipidima. Na primjer, kod oksidacije masti u ekstrudiranim žitaricama više se TBA može vezati u matriks hrane nego reagirati sa aldehidima otpuštenim u otopini[11]. Analiza ekstrakta masti produljuje vrijeme postupka, ali izbjegava sporedne reakcije sa nelipidima i omogućuje detaljne informacije o oksidaciji masti. Sa ekstraktima masti, TBA može ponuditi neke prednosti u stabilnosti, ali je osjetljivost manja. Napravljene su brojne usporedbe metoda za različite vrste hrane, ali bez preferencije metoda. Argumenti za odabir specifičnog modela reakcije za analizu u mesu su prikazali Fernandez i suradnici (1997)[12]. Za kvantifikaciju apsorpcija uzoraka nakon reakcije je uspoređivana sa standardnim krivuljama pripremljenima od 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP), koji hidrolizira u kiselinu dajući malonaldehid. Za točne rezultate slijepe probe TEP „recovery-a“ moraju se odrediti u svakoj metodi da bi se odredio postotak analita koji ostane nakon reakcije, te je taj „recovery“ faktor uračunat u konačni TBA broj. Ne uključivanje „recovery“ faktora povećava varijabilnost rezultata, unosi pogrešku u direktnu usporedbu apsorpcije i ograničava mogućnost da se evaluira razina relativne oksidacije u različitim materijalima ili laboratorijima.

Rezultati TBA analiza obično se prikazuju kao $\mu\text{mol TBARS/g}$ uzorka da bi se pokrili svi reaktanti ili $\text{mg malonaldehida/kg}$ uzorka ako je definiran molekularni reaktant. Nedostaci kao duljina trajanja reakcije, niska osjetljivost i nespecifičnost su doveli do promjena u rukovanju, konačnoj detekciji te kvantifikaciji produkata. TBA adukti se još uvijek najčešće određuju optički, ali druge metode pokazuju dobru osjetljivost i specifičnost te se s lakoćom može rukovati određivanjem i bazom podataka. Računanjem trećih derivacija optičkih spektra zaoštruje se apsorpcijski pik, daje se više točnih apsorpcija te se određuju različite vrste koje doprinose reakciji. Korištenje fluorescencije povećava osjetljivost i eliminira neke nuspojave. Fourierove transformacije sa infracrvenom spektroskopijom (FTIR) daju ekvivalentne rezultate sa uljima u manje od 5 minuta, ali određivanje vrsta je još uvijek neidentificirano. Da bi analiza bila specifična zahtjeva se odvajanje produkata reakcije HPLC-om ili GC-om, nakon kojih slijedi identifikacija produkata uspoređujući ih sa standardom ili identifikacija masenom spektrometrijom. Puno proizvođača koristi neke korake s toplinom kako bi povećali iskorištenje TBA kromofora, ali se pokazala prisutnost nusprodukata zbog zagrijavanja. Kada reagiraju sa TBA pri niskim temperaturama (5°C) dionali stvaraju komplekse koji se kasnije transformiraju u MDA komplekse kako se otopina zagrijava do 100°C . Također su predložili da se prisutnost aldehida može najtočnije odrediti bez zagrijavanja iako reakcija duže traje[11].

Direktna reakcija na cijelom uzorku

Sastoji se od direktnog zagrijavanja uzorka mesa sa otopinom TBA pod kiselim uvjetima te ekstrakcije crvenog pigmenta sa butanolom. To je kvantitativna metoda, ali je dugotrajna te uključuje puno ekstrakcija otapalom. Također se smatra da je oksidacija uzrokovana samim testom[8].

Destilacija

Sastoji se od reakcije između otopine TBA sa destilatima, ova metoda daje niži „recovery“ uspoređujući sa ekstrakcijom otapalom, ali je više osjetljivija i povoljnija za uzorke koji sadržavaju veliki udio masti ($>10\%$) gdje se može pojaviti zamućenost ekstrahiranog uzorka. Destilacija također smanjuje interferente u cijelim uzorcima te u ekstrahiranoj masnoći u hrani. Glavni nedostatak destilacije je njena empirijska priroda te potreba za prikupljanjem određenog volumena destilata. Najkorištenija je metoda[8].

Ekstrakcija

Temelji se na vodenoj kiselinskoj ekstrakciji uzorka (sa trikloroocetnom kiselinom) prije reakcije sa TBA. Ova metoda se smatra najboljom za procjenu količine MDA u uzorcima mesa,

zato što meso nije toplinski tretirano. Lakše ju je i brže izvesti nego destilaciju te se preporučuje koristiti gdje se veliki broj uzoraka treba brzo analizirati. Ponekad, neke nečistoće kao proteini topljivi u vodi, peptidi i drugi aldehidi mogu biti prisutni u ekstraktima mesa te mogu interferirati sa stvaranjem crvenog pigmenta. Postoji korelacija između ekstrakcije i destilacije te su Witte i suradnici (1970) predložili jednostavnu regresijsku jednadžbu ($r=0,845$) dobivenu povezivanjem TBA broja destilacijom (X) i ekstrakcijom (Y) u svinjetini[13].

$$Y = 0,0358 + 0,3917X \quad (3)$$

Ekstrakcija daje niže vrijednosti TBA nego destilacija za dvostruko više uzorka zbog smanjene autooksidacije uzorka tijekom ekstrakcije. To je potvrđeno u kasnijim istraživanjima gdje nije primjećena razlika između TBA vrijednosti određene destilacijom i ekstrakcijom otapalom. Povećanje „recovery-a“ MDA nastaje tijekom ekstrakcije masti, koja se odvija isparavanjem pri vrlo visokim temperaturama i protokom dušika. Ova metoda je bila prikladna kada se proučavala osjetljivost oksidacije različitih vrsta masti ili njihovih komponenti. Prednost je mogućnost uklanjanja prisutnih interferenata, kao na primjer peptida i pigmenta u mesu[8].

Spektrofluorometrijska metoda

Temelji se na činjenici da spektar ekstrakcije pokazuje svoj maksimum pri 532 nm, potrebna je prethodna ekstrakcija masti. Specifičnost metode je ista kao i kod spektrofotometrijskih metoda, zato što drugi spojevi nastali razgradnjom peroksida stvaraju fluorescenciju. Istraživanja su pokazala da TBA test sa flouometrijskom detekcijom može odrediti druge aldehide koji ne potječu od masti. Iako su testovi na cijelim uzorcima ili ekstrahiranoj masnoći prikladni za pojedine uzorke, destilacija ima prednost jer se može primjeniti na bilo koji sastojak hrane, brza je i reproducibilna. Velika je prednost što se TBARS dobivaju u čistim vodenim otopinama i što se rozi produkt reakcije može točno odrediti[8].

2.6.3. INTERFERENTI

Za korištenje TBA testa postoje brojni interferenti: kiseline, esteri, šećeri, amino kiseline i oksidirani proteina koji mogu reagirati sa TBA. Prvi primjećeni interferenti su preklapanje rozog pika zbog prisutnosti žutog kromagena što uzrokuje jako visoke vrijednosti ako je intenzitet dovoljno jak. Taj žuti kromagen može nastati od različitih aldehidnih spojeva kada reagiraju sa TBA. Predlažno je da se ekstrakcija otapalima koristiti ako nisu prisutni spojevi koji stvaraju žuti pigment ili su prisutni u malim količinama koji ne smetaju. Na stvaranje MDA-

TBA crvenog pigmenta utječu interferenti uzrokovani nečistoćama (proteini topljivi u vodi, peptidi i drugi aldehidi), a njihov utjecaj se može izbjeći korištenjem obrnute faze kromatografije. Daljnje pročišćavanje može se postići stavljanjem crvenog pigmenta na tankoslojnu kromatografsku ploču te razvijanjem sa kombinacijom metanola i vode. Budući da je MDA jako hidrofilan, većina ekstrahiranog MDA će biti oporavljeno sa vodenom kiselim ekstrakcijom. Otkriveno je da produkt pirolize reagira sa TBA i tvori rozi kromagen koji apsorbira na 532 nm te može biti dokaz stvaranja kromagena u odsutnosti peroksidacije masti. Drugi važan interferent u mljevenom mesu je zaostali nitrit čija prisutnost u uzorku može potaknuti nitrozaciju MDA. Nitrozacija uzrokuje nereaktivnost MDA u TBA-MDA reakcijama te time smanjuje TBA broj[8].

2.6.4. OGRANIČENJA TBA TESTA

Najznačajnije ograničenje je to da MDA i drugi kratkolančani ugljikovi produkti oksidacije masti nisu stabilni dulje vrijeme. Nestabilni su zbog toga što oksidacija tih produkata doprinosi organskim alkoholima i kiselinama, koji se ne mogu odrediti TBA testom. Kenaston i suradnici (1955) su otkrili da je TBA test osjetljiv na sve kemijske metode koje se koriste za određivanje oksidacijskih produkata linolne i linolenske kiseline, ali je relativno neosjetljiv na oleinsku kiselinu[14]. Kwon i Watts (1964) su otkrili drugo ograničenje TBA testa za dehidriranu hranu. Otkrili su da ubrzana oksidacija masti daje niski TBA, budući da MDA nastaje u hlapljivoj formi zbog odsutnosti vode i zato se ne zadržava u hrani[15].

2.6.5. ODNOS TBA TESTA SA SENZORSKOM ANALIZOM

Nekoliko autora je potvrdilo dobar odnos između TBA broja i senzorske analize pri određivanju užglosti u životinjskoj hrani: mlijeku, svinjetini, piletini. Melton (1983) je otkrio da se oksidirani okusi mogu odrediti pri TBA brojevima od 0,3-1,0 u govedini ili svinjetini, 1,0 ili 2,0 u piletini, te više od 3,0 u puretini. Te vrijednosti se ne smiju smatrati općenitima za prag užglosti u mesu. TBA broj je određen i drugim faktorima kao na primjer prehrana, starost životinja prije klanja, je li meso sirovo ili kuhano i vrsta TBA metode koja se koristi za analizu[16].

2.6.6. PREDNOSTI TBA TESTA

TBA reakcija se koristi u analizi oksidacije masti u hrani, osobito u mesu zato što se može primijeniti direktno i ne zahtjeva ekstrakciju masti. Rezultati TBA testa dobro koreliraju sa senzorskom analizom, dokazujući sudjelovanje TBA reaktanata u stvaranju neugodnih okusa i mirisa[11].

2.6.7. NEDOSTACI TBA TESTA I MJERE OPREZA

TBA test je kontroverzna analiza gdje je područje oksidacije masti podijeljeno između onih koji vole TBA test ili ga makar smatraju korisnim, ako ne savršenim i onih koji ne vole test zbog njegove nerazjašnjene kemije i neodgovarajuće primjene. Iako se mnogo naučilo o vrstama koje doprinose obojenju u reakciji, žestok argument ostaje što se zapravo određuje u TBA ili TBARS testu u pogledu identifikacije i izvornosti reaktanata. Drugo protivljenje TBA testu je to što je reakcija s TBA nespecifična te je njena valjanost osim u posebnim upotrebama vrlo upitna. Dugo zagrijavanje i dodatak željeza u nekim verzijama doprinosi razgradnji hidroperoksida i povećanju sekundarnih produkata nego određivanju već prisutnih spojeva. Reakcija TBA sa proteinima, škrobom i šećerima te nukleinskim kiselinama dovodi do precjenjivanja oksidacije kada su prisutni topljivi nelipidni reaktanti te podcjenjivanja oksidacije kada se TBA veže u polimerne komponente hrane kao na primjer u škrob i proteine. Iako se neke sporedne reakcije mogu identificirati prisutnošću pikova pri različitim valnim duljinama te se oni mogu oduzeti, cjelokupna kvantitativnost ostaje upitna osim ako se mast pročisti prije analize[11].

2.6.8. PRIMJENA TBA TESTA

Istraživanja navode da se TBA test koristi za analizu oksidacije masti u svim vrstama hrane. Najprikladija primjena je u mesu koje sadrži više arahidonske kiseline. Sve ostale primjene su sporne, ali metoda pruža neke vrijednosti za usporedbu pa ima svoje mjesto uz druge metode. Frankel (2005) je izjavio da je TBA test „neprikladan za kompleksnu hranu i biološke sustave koji sadrže nelipidne komponente koji doprinose obojanim reakcijama“ te je neprikladan zbog nerazjašnjene kemije i visoke osjetljivosti rezultata u reakcijskim uvjetima.[17] Vrijeme je da se TBARS zamijeni sa točnijim i kemijski definiranijim analizama. Ako se ipak TBA koristi, metoda treba biti ograničena na hladnu primjenu kako bi se određivali samo originalni produkti HPLC-om tako da se individualni reaktivni spojevi mogu odrediti[11].

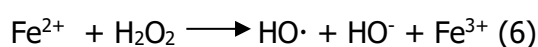
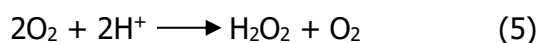
2.7. KATALIZA PEROKSIDACIJE MASTI

2.7.1. NEENZIMSKA KATALIZA

Peroksidacija masti jedan je od primarnih mehanizama smanjenja kvalitete uskladištene hrane, posebno mesa. Mnoga istraživanja su usmjerena prema određivanju katalize koja pospješuje oksidaciju mišićnih masti, također su pokazala da su hem i non-hem željezo važni katalizatori peroksidacije mišićnih masti. Dokazano je da mioglobin nije glavni prooksidans u mesu i da je non-hem željezo glavni katalizator. Nije poznato koji su glavni inhibitori koji onemogućuju fer oksidaciju membranskih masti[6].

2.7.2. PEROKSIDACIJA MASTI OVISNA O ŽELJEZOVOM REDOKS PROCESU

Biološka oksidacija najčešće je uzrokovana reakcijama sa metalnim ionima, od kojih je željezo najčešće. Odavno je poznato da željezo može katalizirati peroksidaciju i da ona može biti potaknuta prisutnošću ili dodatkom tiola i askorbinske kiseline. Nedavno je otkriveno da hidroksil radikali u ovim reakcijama započinju reakcije peroksidacije masti. Željezovi ioni u aerobnim vodenim otopinama proizvode superperokside, vodikov peroksid te hidroksi radikale, slijedećim reakcijama[6]:



2.7.3. ENZIMSKA KATALIZA

Peroksidacija masti u izoliranim mikrosomima zahtjeva NADPH ili NADH, citokrom P450 reduktazu te molekularni kisik. Enzimi prenose elektron na molekulu kisika čime nastaje O_2^- koji prelazi u H_2O_2 . U sirovom mesu ribe ili piletini peroksidacija masti potaknuta je enzimom lipogeza ili ciklooksidaza, ali ti enzimi prvo moraju biti aktivirani peroksidom ili masnom kiselinom. U kuhanom mesu tijekom skladištenja peroksidacija masti ovisi o neenzimskim reakcijama[6].

2.8. BIOLOŠKI I TEHNOLOŠKI FAKTORI KOJI UTJEČU NA PEROKSIDACIJU MASTI U MESU

Mnogi faktori utječu na peroksidaciju masti u animalnim tkivima nakon klanja. Neki od tih faktora su: vrsta, anatomski položaj, prehrana, temperatura okoliša, spol i godine, sastav te sadržaj fosfolipida. Tijekom prerade nekoliko drugih faktora ima utjecaj na stupanj peroksidacije: sastav i svježina sirovog mesa, kuhanje i zagrijavanje, sjeckanje, ljuštenje, odkoštavanje te dodavanje egzogenih komponenti, kao na primjer soli, nitrita, začina i antioksidansa[6].

Sastav masti

Prehrambeni dodatci masti u prehrani životinja i sklonost vrsta nakupljanju masnih kiselina u membranama fosfolipida utječu na sastav membranskih masti i na sklonost peroksidaciji. Istraživanja su pokazala da je fosfatidil etanolamin glavni fosfolipid koji sudjeluje u peroksidaciji masti u kuhanom mesu. Fosfolipidi su glavni uzročnici neugodnog okusa u mesu različitih životinja. Sklonost i učestalost oksidacije ovisi o stupnju i količini nezasićenih masnih kiselina[6].

Temperatura prerade i skladištenja

Pojam „warmed-over“ okus se koristi kako bi opisalo brzo nastajanje užglosti tijekom skladištenja u hladnjacima. Oksidativni okusi mogu nastati u sirovom mesu nakon mljevenja, ali nemasno sirovo mljeveno meso je stabilno nekoliko mjeseci, a ta stabilnost ovisi o vrsti mesa. Zagrijavanje može utjecati na brojne faktore koji utječu na peroksidaciju masti. Toplina narušava strukturu mišićnih stanica, inaktivira enzime i otpušta kisik sa mioglobina. Otpuštanjem kisika sa mioglobina nastaje H_2O_2 i ta reakcija se odvija pri $60^\circ C$. Količina željeza raste tijekom kuhanja, više pri nižim temperaturama i tijekom sporog zagrijavanja nego pri višim temperaturama. Pretpostavlja se da je razlog tome to što nastaje više H_2O_2 koji aktivira, ali i razara strukturu profirina, otpuštajući ion željeza. Pri višim temperaturama se pokazalo da se više O_2 otpušta iz mesa bez oksidacije pigmenta, stvarajući okolinu sa niskom razinom kisika. Također se pokazalo da $HO\cdot$ radikali nastaju tijekom zagrijavanja mesa. Visoke temperature smanjuju energiju aktivacije oksidacije te utječu na razgradnju hidroperoksida u slobodne radikale, a to pospješuje peroksidaciju i uzrokuje neugodne okuse.

Tijekom zamrzavanja usporava se oksidacija, ali se i ne zaustavlja. Slobodni radikali su topljivi u ulju i stabilniji pri niskim temperaturama, što im omogućuje da se rašire na različite udaljenosti. Voda inhibira ove reakcije, ali je poznato da meso dehidratizira tijekom smrzavanja te da zbog lošeg pakiranja oksidira brže[6].

Utjecaj NaCl-a na peroksidaciju masti

Natrijev klorid je važan aditiv u mesnoj industriji te djeluje kao prooksidans, ali može djelovati i kao antioksidans. Poznato je da natrijev klorid može ubrzati peroksidaciju mišićnih masti, ali je ta reakcija slabo razjašnjena. U početku se mislilo da metalne nečistoće u soli uzrokuju peroksidaciju masti ili da povećavaju aktivaciju oksidaze, ali u zadnje vrijeme se otkrilo da NaCl pojačava aktivaciju željezovih iona. Prooksidacijski efekt NaCl-a se može inhibirati sa EDTA. Taj efekt NaCl-a utječe na njegovu sposobnost da onemogući ionima željeza vezanje u makromolekule za reakcije oksidacije. No, smatra se da efekt NaCl-a na katalizu peroksidacije masti u hrani, posebno u mesu treba dodatna pojašnjenja[6].

Utjecaj nitrita na peroksidaciju masti

Nitriti imaju važnu ulogu u razvitku boje te kao konzervansi. Također je poznato da dodatak nitrita tijekom konzerviranja smanjuje peroksidaciju masti. Nedavno je otkriveno da dušikov oksid može inhibirati Fenton reakcije, nastajanje feril iona te lipogenaznu i ciklooksidadnu aktivnost. Antioksidacijski efekti dušikovitog oksida onemogućuju njegovu

sposobnost da bude ligand željezovom ionu te da budu elektron donori i čistač slobodnih radikala. Dodatak pigmenta konzerviranom mesu, dinitrozil ferohemokrom, ima antioksidacijsko djelovanje i predloženo je da se koristi umjesto nitrita. Uloga nitrita u peroksidaciji masti i u konzerviranju mesa je bila pomno istraživana, a iz tih istraživanja se može zaključiti da nitrit koji tvori dušikov oksid tijekom konzerviranja potiče antioksidacijski efekt, na način da reagira sa non-hem i hem željezo proteinima kako bi spriječili katalizu metala. Dušikov oksid djeluje kao hvatač radikala, stabilizirajući nezasićene masti[6].

2.9. KVALITETA MESA POD UTJECAJEM PEROKSIDACIJE MASTI

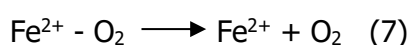
2.9.1. UGODNI I NEUGODNI OKUSI

Skladištenje kuhanog mesa kratko vrijeme uzrokuje pojavljivanje karakterističnog neugodnog okusa uzrokovanog peroksidacijom nezasićenih masnih kiselina. Povezanost frakcija masti sa okusima mesa tijekom zagrijavanja i skladištenja vrlo je složena. Smatra se da slobodni radikali, hidrolitičke i kondenzacijske reakcije doprinose stvaranju ugodnih i neugodnih okusa. Pokazalo se da termički potaknuta oksidacija masti tijekom početka kuhanja stvara promjenjive produkte koji doprinose željenom okusu mesa. Ti specifični okusi ne nastaju u konzerviranom mesu jer su oksidacijski procesi onemogućeni. Općenito podgrijani okusi uzrokuju nestanak svježeg okusa, a nastaju okusi poput „kartonske kutije“ i drugi okusi povezani sa užeglošću masti i ulja. Peroksidacijom masti nastaje velika količina vodikovog peroksida, a razgradnjom vodikovog peroksida nastaje veliki raspon ugljikovih spojeva koji sudjeluju u pogoršanju okusa hrane, posebno mesa[6].

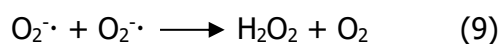
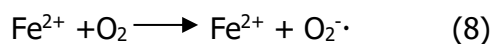
2.9.2. POGORŠANJE BOJE OKSIDACIJSKIM REAKCIJAMA

Boja svježeg mesa najvažnija je karakteristika po kojoj kupci ocjenjuju svježinu i kvalitetu mesa. Privlačnost svježeg mesa se smanjuje kako svijetlo crvena boja oksidira u crveno smeđu. Oksimioglobin je glavni pigment u mesu, apsorbira svjetlost pri 380-440 nm i između 480-650 nm. Gubitkom kisika iz oksimioglobina i elektrona iz fero iona nastaje metmioglobin te dolazi do promijene boje iz svijetlo crvene u tamno crvenu pa na kraju u smeđu.

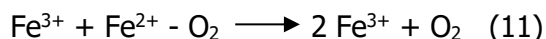
Oksimioglobin u prisutnosti aniona, niskog pH ili visoke temperature otpušta kisik, stvarajući mioglobin:



Mioglobin se može autooksidirati stvarajući O_2^- , H_2O_2 , metmioglobin i feri spojeve sljedećim reakcijama:



Feri ion može reagirati s oksihemom stvarajući met-hem:



Meso sadrži enzime koji mogu reducirati metmioglobin u oksimioglobin. Otkriveno je da ako se stoku hrani vitaminom E tada se poboljšavaju pigmenti i stabilnost masti u mesu. Iz tog se vidi da je peroksidacija masti važna ne samo za okus nego i za stabilnost boje sirovog mesa.

Dušikov oksid mioglobin, glavni je pigment konzerviranog mesa i on je osjetljiv na direktnu oksidaciju kisikom. Reakcija nastaje pod utjecajem svjetla te nastaje NO_3^- i metmioglobin. Zamjena zraka ugljikovim dioksidom te zaštita od svjetla i niske temperature štite pigmente od oksidacije[6].

2.9.3. TEKSTURA MESA POD UTJECAJEM PEROKSIDACIJE MASTI

Reakcija peroksidiranog masti s aminokiselinama i proteinima je još jedan važan dio peroksidacije masti u mesu. To područje se još nije do kraja istražilo te se mora u budućnosti istražiti. Reakcije između oksidiranog masti i proteina mogu se podijeliti u tri kategorije:

- nastajanje nekovalentnog kompleksa;
- reakcije slobodnih radikala uz nastajanje kovalentnog kompleksa;
- reakcije sa sekundarnim produktima[6].

2.9.4. NUTRITIVNA VRIJEDNOST MESA POD UTJECAJEM PEROKSIDACIJE MASTI

Peroksidacija masti utječe na promjene okusa mesa, boje i teksture, a autooksidacija utječe na stvaranje toksina. Slobodni radikali koji nastaju peroksidacijom masti oksidiraju neke vitamine, na primjer vitamin A i karotenoide, vitamin C i vitamin E, ali s tim istim reakcijama mogu oksidirati i druge molekule kao na primjer kolesterol. Zagrijane masti i ulja te predkuhano meso su problematični jer oksidiraju kolesterol. Predkuhana govedina ne sadrži ili sadrži jako malo kolesterola, a oko 2% kolesterola u usitnjenoj govedini oksidira. U predkuhanj usitnjenj puretini, koja oksidira puno brže nego govedina, količina kolesterola

koji je oksidirao iznosi 3%. Skladištenje pri 4°C povećava razinu oksikolesterol produkata. Postoje dokazi da nusproizvodi oksidacije masti mogu utjecati na naše zdravlje[6].

3. ZAKLJUČAK

Oksidacija masti je važan faktor koji ukazuje na održivost mesa i mesnih proizvoda tijekom prerade, skladištenja i upotrebe. Budući da je proces oksidacije vrlo složen i da kao posljedicu ima nastajanje mnogih produkata koji su odgovorni za promjenu senzorskih i organoleptičkih svojstava mesa, potrebno je odrediti stupanj oksidacije, uvjete koji ubrzavaju reakcije te mogućnosti za usporavanje i prekid oksidacijskih reakcija. Produkti oksidacije djeluju toksično i potrebno je razviti postupke kojima bi se spriječila oksidacija mesa tijekom tehnoloških procesa i skladištenja.

Dodatkom antioksidansa mesu dolazi do poboljšanja održivosti masti, budući da oni inhibiraju autooksidaciju stabilizirajući slobodne radikale. Najveći izazov predstavlja izbor antioksidansa zato što potrošači zahtijevaju da se ne koriste sintetički antioksidansi, već prirodni koji imaju boju, okus i visoku cijenu. Boja i okus antioksidansa nije prihvatljiva u mesu i mesnim proizvodima.

Iako su za određivanje stupnja oksidacije razvijene razne metode, kao najraširenija metoda se koristi TBA test kojim se određuju sekundarni produkti oksidacije. Ova metoda ima brojne nedostatke od kojih je najznačajniji taj što nije isključiva jer TBA reagira i s drugim aldehydima, a ne samo sa malondialdehydom.

Budući da ni jedna metoda ne obuhvaća identifikaciju i određivanje svih produkata oksidacije potrebno je primijeniti više metoda kako bi se dobio što bolji uvid u stupanj oksidacije.

4. POPIS LITERATURE

- [1] Rade D., Mokrovčak Ž., Štruelj D. (2001) Priručnik za vježbe iz kemije i tehnologije lipida.
- [2] Farmer E. H., Bloonfield G. F., Sundralingam A., Sutton D. A. (1942) *Trans Faraday Soc.* **38**: 348-356.
- [3] Škevin D. (2016) Kemija i tehnologija ulja i masti, interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.
- [4] Cheng J. H. (2016) Lipid Oxidation in Meat. *Journal of Nutrition & Food Sciences* **6**: 1-3.
- [5] Gray I. J., Monahan F. J. (1992) Measurement of lipid oxidation in meat and meat products. *Trends in Food Science & Technology* **3**: 315-319.
- [6] Kanner J. (1992). Oxidative Processes in Meat and Meat Products: Quality Implications. *Meat Science* **36**: 169-189.
- [7] Ganhao R., Estevez M., Morcuende D. (2011) Suitability of the TBA method for assessing lipid oxidation in a meat system with added phenolic-rich materials. *Food Chemistry* **85**: 772-778.
- [8] Fernandez J., Perez-Alvarez J. A., Fernandez-Lopez J. A. (1996) Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry* **59**: 345-353.
- [9] Kohn H. I., Liversedge M. (1944) On new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, epinephrine and menadione. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **82**: 292-297.
- [10] Bernheim F. M., Bernheim L. C., Wilbur K. M. (1948) The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. *Journal of Biological Chemistry* **174**: 257-264.
- [11] Hu M., Jacobsen C. (2016) Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oil and Fats, Elsevier Inc. str. 45-48, 170-171.
- [12] Fernandez J., Perez-Alvarez J. A., Fernandez-Lopez J. A. (1997) Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry* **59**: 345-353.
- [13] Witte V.C., Krause G. F., Bailey M. E. (1970) A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *Journal of Food Science* **35**: 582-585.

- [14] Kenaston C. B., Wilbur K. M., ottolenghi A., Bernheim F. (1955) Comparison of methods for determining fatty acid oxidation produced by ultraviolet irradiation. *Journal of the American Oil Chemists Society* **32**: 33-35.
- [15] Kwon T., Watts B. M. (1964) Malonaldehyde in aqueous solution and its role as a measure of lipid oxidation. *Journal of Food Science* **29**: 294-302.
- [16] Melton S. L. (1983) Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. *Food Technology* **37**: 105-111.
- [17] Frankel E. N. (2005) 2-Thiobarbituric acid (TBA) value in Lipid Oxidation. *The Oily Press* str. 108-110.

Izjava o izvornosti

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

Katarina Novina
Ime i prezime studenta