Identifikacija i kvantifikacija hlapljivih spojeva nastalih tijekom skladištenja oslića i skuše u zamrznutom stanju

Buršić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:009065

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Ivana Buršić
640/PI

IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA NASTALIH TIJEKOM SKLADIŠTENJA OSLIĆA I SKUŠE U ZAMRZNUTOM STANJU

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe na Zavodu za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Sanje Vidaček, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistenta dipl. ing. Tibora Jančia.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju mesa i ribe

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA NASTALIH TIJEKOM SKLADIŠTENJA OSLIĆA I SKUŠE U ZAMRZNUTOM STANJU

Ivana Buršić, 640/PI

Sažetak: *Cilj ovog istraživanja bio je kvalitativno i kvantitativno odrediti hlapljive spojeve koji nastaju oksidacijom masnih kiselina tijekom 10-omjesečnog skladištenja ribe u zamrznutom stanju pri -18 °C. Istraživanje je provedeno na uzorcima oslića (Merlucius merlucius) i skuše (Scomber scombrus). Hlapljivi sastojci arome izolirani su primjenom tehnike mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (HS-SPME), a zatim su analizirani uz pomoć plinsko kromatografsko – maseno spektrometrijske instrumentalne metode (GC–MS). Promatrane su promjene u koncentracijama 14 odabranih spojeva koji su prethodno prepoznati u literaturi kao indikatori promjena tijekom skladištenja, a provedena je i detaljna analiza koja je obuhvatila sve spojeve koji su se pojavili tijekom 10 mjeseci skladištenja, s posebnim naglaskom na one koji se pojavljuju 1. i 10. mjeseca skladištenja. U obje je vrste ribe došlo do blage oksidacije masnih kiselina tijekom skladištenja. Za praćenje oksidacije masnih kiselina u skuši kao pogodni spojevi pokazali su se 2-butanon, heksanal, heptanal i benzaldehid.*

Ključne riječi: *oksidacija, masne kiseline, hlapljivi spojevi, zamrzavanje*

Rad sadrži: 46 stranica, 31 slika, 5 tablica, 47 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Izv.prof.dr.sc. Sanja Vidaček*

Pomoć pri izradi: *Tibor Janči, dipl.ing., asistent*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Izv.prof.dr.sc. *Sandra Balbino*
2. Izv.prof.dr.sc. *Sanja Vidaček*
3. Doc.dr.sc. *Marina Krpan*
4. Izv.prof.dr.sc. *Ksenija Marković* (zamjena)

Datum obrane: 12. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF VOLATILES APPEARING DURING FROZEN STORAGE OF HAKE AND MACKAREL

Ivana Buršić, 640/PI

Abstract: *The aim of this study was to qualitatively and quantitatively define volatile compounds that occur as a result of the fatty acids oxidation during the 10 – months – long frozen storage of fish at the temperature of -18 °C. The research was conducted on hake (Merlucius merlucius) and mackerel (Scomber scombrus) samples. Volatile aroma compounds were isolated by the usage of solid phase microextraction technique (HS-SPME), and subsequently analyzed using gas chromatography – mass spectrometric instrumental method (GC-MS). Changes in 14 chosen compounds which are previously known from the literature and considered to be indicators of storage occurring changes are observed. Furthermore, a detailed analysis was conducted taking into account all the compounds occurring during the 10 – month storage, with the stress on those occurring in both the 1st and 10th month. In both types of fish a mild oxidation of fatty acids was observed. 2-butanone, hexanal, heptanal and benzaldehyde proved to be suitable compounds for monitoring the oxidation of fatty acids in mackerel.*

Keywords: *oxidation, fatty acids, volatiles, freezing*

Thesis contains: 46 pages, 31 figures, 5 tables, 47 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology**,** Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Sanja Vidaček, Associate professor*

Technical support and assistance: *Tibor Janči, M.Sc., Assistant*

Reviewers:
1. PhD. *Name, Sandra Balbino,* Associate professor
2. PhD. *Name, Sanja Vidaček,* Associate professor
3. PhD. *Name, Marina Krpan,* Assistant professor
4. PhD. *Name, Ksenija Marković,* Associate professor (substitute)

Thesis defended: 12 September 2016

Sadržaj **stranica**

1.0 UVOD ... **1**

2.0 TEORIJSKI DIO ... **2**

2.1 RIBA U LJUDSKOJ PREHRANI ... 2
2.1.1 Masti i masne kiseline ... 2
2.1.2 Oslić ... 4
2.1.3. Skuša ... 5
2.2 POST-MORTALNE PROMJENE KOD RIBA ... 6
2.3 KONZERVIRANJE ZAMRZAVANJEM ... 7
2.3.1 Promjene na ribi tijekom zamrzavanja i skladištenja ... 7
2.3.2 Hidroliza i oksidacija lipida ... 8
2.4 HLAPLJIVI SPOJEVI KAO POKAZATELJI SVJEŽINE RIBE ... 9
2.5 KONTROLA KVALITETE PROIZVODA RIBARSTVA ... 11
2.5.1. Organoleptička procjena ... 11
2.5.2 Instrumentalne metode ... 12
2.5.3 Identifikacija i kvantifikacija hlapljivih spojeva ... 12

3.0 EKSPERIMENTALNI DIO ... **15**

3.1 PLAN ISTRAŽIVANJA ... 15
3.2 MATERIJALI ... 15
3.2.1 Priprema uzorka ribe ... 15
3.2.2 Korištena oprema ... 16
3.2.3 Korištene kemikalije ... 16
3.3 METODE ... 16
3.3.1 Određivanje hlapljivih spojeva HS-SPME/GC-MS metodom ... 16
3.3.2 Statistička obrada rezultata mjerenja ... 19

4.0 REZULTATI I RASPRAVA ... **20**

5.0 ZAKLJUČCI ... **39**

6.0 LITERATURA ... **40**

1.0 UVOD

Riba je namirnica koja predstavlja važan dio uravnotežene prehrane. Bogata je proteinima visoke biološke vrijednosti te esencijalnim, višestruko nezasićenim masnim kiselinama, poznatijim kao omega – 3 masnim kiselinama koje dokazano pogoduju ljudskom zdravlju.

Ukoliko se ribom ne rukuje na propisan način, s vremenom dolazi do nepoželjnih promjena boje, mirisa i teksture. Budući da se radi o organizmima izrazito kratkog roka trajanja, potrebno je pravilnom manipulacijom usporiti odvijanje reakcija koje doprinose procesu kvarenja. Sniženje temperature zamrzavanjem jedan je od mogućih načina produljenja trajnosti proizvoda ribarstva. Zamrzavanje uspješno inhibira razvitak mikroorganizama, no ne sprječava u potpunosti odvijanje autolitičkih procesa, a tijekom dugotrajnijeg skladištenja, prvenstveno kao posljedica neenzimskih aktivnosti, dolazi i do oksidacije masti te razvoja užeglosti. Na obujam oksidacije masti osim trajanja skladištenja, utječu i temperatura, koncentracija kisika te uvjeti provedbe zamrzavanja, kao i unutarnji čimbenici koji obuhvaćaju udio masti u ribi te sastav masnih kiselina.

U ovome radu identificirani su i kvantificirani hlapljivi spojevi nastali tijekom skladištenja oslića i skuše u zamrznutom stanju. Analiza je provedena na svježem uzorku te nakon približno 1, 2, 5 i 10 mjeseci, a korištene su tehnike mikroekstrakcije na čvrstoj fazi i plinsko kromatografsko – maseno spektrometrijske instrumentalne metode. Praćene su promjene u koncentracijama 14 odabranih spojeva koji su poznati iz znanstvene literature kao potencijalni pokazatelji kvarenja, a provedena je i analiza koja je obuhvatila sve identificirane spojeve, s posebnim naglaskom na one koji se pojavljuju i 1. i 10. mjeseca skladištenja. Cilj ovog rada je okarakterizirati kvarenje pomoću hlapljivih spojeva nastalih tijekom skladištenja, kao i njihova kvantifikacija te odrediti one spojeve koji su najpogodniji za praćenje kvarenja.

2.0 TEORIJSKI DIO

2.1 RIBA U LJUDSKOJ PREHRANI

Riba je nutritivno vrijedna namirnica koja se odlikuje pogodnim kemijskim sastavom, posebice esencijalnim masnim kiselinama, aminokiselinama te pojedinim vitaminima i mineralima koji su prijeko potrebni konstituenti kvalitetne ljudske prehrane. Najznačajniji je prirodni izvor polinezasićenih masnih kiselina koje dokazano pogoduju sveopćem ljudskom zdravlju, a obiluje i vitaminima A, D, E i K koji imaju ključne uloge u metabolizmu.

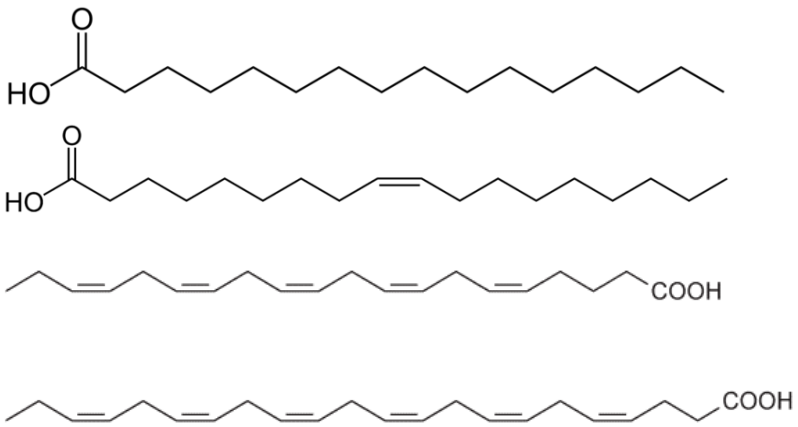
Osnovni kemijski sastav ribe je vrlo varijabilan i čini 16 – 21 % proteina, 0,2 – 25 % masti, 1,2 – 1,5 % minerala, 0 – 0,5 % ugljikohidrata i 66 – 81 % vode (Love, 1970). Razlikuje se između pojedinih vrsta, kao i unutar iste vrste. Neki od čimbenika o kojima ovisi jesu vrsta ribe, dob, veličina, spol i spolna zrelost, način ishrane, geografsko područje ulova i godišnje doba (Silva i Chamul, 2000).

U odnosu na meso sisavaca koje se koristi u prehrani, meso ribe je male energetske vrijednosti, sadrži vrlo malo vezivnog tkiva, ne sadrži elastin, bjelančevine koje sadrži su lakše probavljive (u prosjeku 2 do 3 sata), bolje iskoristive i pogodnijeg aminokiselinskog sastava, a masti sastavljene od dugačkih lanaca (14 – 22 C atoma) i pretežito nezasićenih masnih kiselina (Cvrtila i Kozačinski, 2006).

2.1.1 Masti i masne kiseline

Masti su po svom kemijskom sastavu smjesa triacilglicerola i masnih kiselina (na jednu molekulu glicerola esterski su vezane 3 masne kiseline) (Sikorski, 1990 navedeno u Šimat i sur., 2009).
U ribljim lipidima razlikujemo zasićene (SFA), mononezasićene (MUFA) i polinezasićene masne kiseline (PUFA). Njihovi se razmjeri u ukupnim lipidima razlikuju. Među zasićenim masnim kiselinama dominira palmitinska kiselina (C16:0), a među mononezasićenim oleinska kiselina C18:1. PUFA možemo podijeliti u dvije biokemijske skupine – omega-3 (ω–3) i omega-6 (ω–6), koje imaju različiti biološki utjecaj. Kvantitativno među PUFA prevladavaju eikozapentaenska (EPA, 20:5) i dokozaheksaenska kiselina (DHA, 22:5), takozvane ω–3 masne

kiseline. Manji udio čine ω–6, u koje ubrajamo arahidonsku (20:4), eikozadiensku (20:2) i linolnu kiselinu (18:2) (Guizani i sur., 2015, Moradi i sur., 2011). Riblja se mast većim dijelom sastoji od nezasićenih masnih kiselina (30–40 %), što ribe čini posebno podložnim oksidacijskim procesima i kvarenju (Cvrtila i Kozačinski, 2006).



Slika 1. Strukturne formula najznačajnijih masnih kiselina prisutnih u ribljim lipidima. Redom: C16:0, C18:1, EPA i DHA

Budući da je riblje meso posebno varijabilno u pogledu količine masti, ovisno o tom parametru, ribe se razvrstavaju u 3 kategorije: nemasne – do 3 % masti, srednje masne – do 8 % masti i masne s količinom masti koja iznosi više od 8 % (Cvrtila i Kozačinski, 2006). Generalno, plava je riba (skuša) masnija od bijele (oslić) i shodno tome bogatija blagotvornim ω–3 masnim kiselinama. Uzrok tome je različita raspodjela masti; u plave je ribe mast pohranjena u masnim stanicama po čitavome tijelu, a u bijele uglavnom u jetri te manjim dijelom u trbušnoj šupljini.

Što se tiče sezonskih varijacija u količini i sastavu lipida oslića, Küçükgülmez i suradnici (2007) su u svome istraživanju utvrdili kako udio masti varira između 0,27 i 1,24 %. Najviše vrijednosti dosegnute su na jesen, a najniže u proljeće, kada oslić koristi masti kao izvor energije u svrhu reprodukcije. Na profil prisutnih masnih kiselina utječu prehrana, salinitet, temperatura, vrsta ribe, spol, veličina i zemljopisna lokacija. Temperatura značajno utječe na način da se razina nezasićenosti povisuje pri nižim temperaturama jer je tada potreban viši stupanj nezasićenosti masnih kiselina kako bi se održale fleksibilnost i permeabilnost membranskih fosfolipida. Shodno tome, ukupne PUFA, posebice EPA i DHA, bile su više tijekom zime. Guizani i Moujahed (2015) su ispitivanjem na skuši na sličan način ustanovili kako udio masti iznosi 11,1 % na proljeće te se snizuje na 4,5 % tijekom ljeta. Najviša razina PUFA dosegnuta je u jesen, a

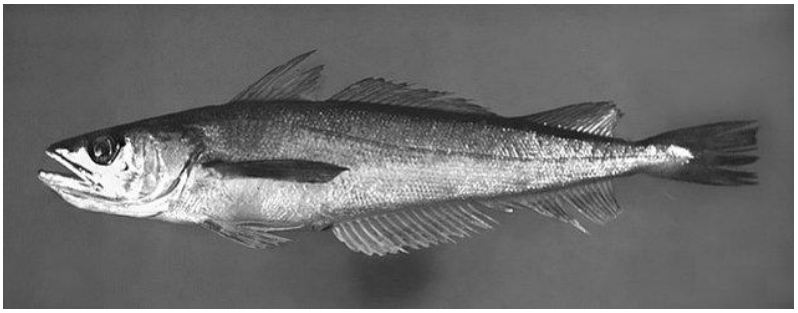
najniža u proljeće. Među njima je najzastupljenija bila DHA s najvišom vrijednosti u jesen (40,1 %).

Smatra se da ω–3 dugolančane PUFA imaju brojne povoljne učinke na ljudsko zdravlje. Sastavni su dio stanične membrane te utječu na njezinu viskoznost, djeluju protuupalno, potrebne za pravilan razvoj fetusa i zdrav proces starenja. Nedovoljan unos povezan je sa razvojem upalnih procesa, nepravilnim razvojem fetusa, kardiovaskularnim poteškoćama i povišenim rizikom od nastanka Alzheimerove bolesti. Kao preventivno djelovanje na razvoj kardiovaskularnih bolesti preporuča se dnevno konzumirati 500 mg EPA i 1000 mg DHA (Swanson i sur., 2012, Vrablík i sur., 2009).

2.1.2 Oslić

Oslić *(Merluccius merluccius)* pripada porodici mekušica *(Gadidae).* Jedna je od najznačajnijih komercijalnih vrsta demerzalnog ribarstva u Jadranskom priobalju. Osim u Sredozemlju, rasprostranjen je na atlantskoj obali Europe, zapadnom dijelu Sjeverne Afrike te duž južne obale Crnog mora (Cohen i sur., 1990, Ungaro i sur., 2001). Danju se zadržava bliže morskome dnu, a tijekom noći se odmiče prema višim slojevima mora, zbog čega se smatra i demerzalnom i pelagičkom ribom. Uglavnom obitava u području između 70 i 370 m dubine, no moguće ga je pronaći i u obalnom predjelu (30 m), kao i na dubini od 1000 m (Cohen i sur., 1990, Korta i sur., 2015).

Tijelo oslića je izduženo i valjkasto te pokriveno sitnim ljuskama koje lako otpadaju. Leđa su sivo-smeđe, a trbuh srebrnastobijele boje. Ima dvije leđne peraje, donju čeljust dulju od gornje, a u ustima 2 do 3 niza iglastih zuba (Anonymous 1, n.d.).



Slika 2. Oslić (Merluccius merluccius) (Anonymous 1, n.d.)

Mriještenje je dugi period koji varira u različitim populacijama. Na Mediteranu traje od prosinca do lipnja te se odvija na dubini između 100 i 300 m. Mladi oslići žive na mutnome dnu do 3. godine, kada se približavaju obali. Ženke zrelost dostižu unutar 7, a mužjaci unutar 5 godina. Ženke rastu brže od mužjaka, dok općenito jedinke koje obitavaju na Mediteranu rastu sporije. U predjelu Mediterana u trenutku zrelosti ženke su velike između 36 i 40 cm, a mužjaci 26 do 27 cm. Odrasle se jedinke hrane uglavnom ribom (mali oslići, sardele, sardine) i lignjama, a mladi planktonskim rakovima (Cohen i sur., 1990).

Oslić se tijekom povijesti, posebno u predjelu zapadne Europe, smatrao bitnom prehrambenom namirnicom. Primarno se lovi parangalom i koćama. Prema podacima FAO 1999. godine ukupno je ulovljeno 68 569 t, a prednjačile su Španjolska s 22 931 t i Italija s 9 754 t (Cohen i sur., 1990, FAO, 2016a). Kemijski sastav varira ovisno o fazi reproduktivnog ciklusa, kretanju i prehrani. Prosječno sadrži 80 % vode, između 0,4 i 1 % masti te 17,8 – 18,6 % proteina (Murray i Burt, 2001).

2.1.3. Skuša

Skuša (*Scomber scombrus*) je riba koštunjača iz porodice skuša *(Scombridae)*. Rasprostranjena je u predjelima istočnog i zapadnog Atlantiku te Sredozemnog i Crnog mora. Ubraja se u epipelagičke i mezodemerzalne vrste. Živi u plovama te migrira ovisno o temperaturi – zimu provodi u većim dubinama, a u proljeće, kada temperatura mora dosegne između 11 °C i 14 °C, približava se obali (Anonymous 2, n.d., Collette i Nauen, 1983).

Tijelo skuše je izduženo, vretenasto, spljošteno na bokovima te se stanjuje u tanak rep s velikom račvastom repnom perajom. Iza druge leđne i podrepne peraje nalazi se 4 do 9 pojedinačnih manjih peraja. Glava joj je duga, a gubica šiljasta. Leđna je strana modre ili modrikasto-zelenkaste boje s poprečnim crnim prugama, a trbušna bijelo-srebrnaste (Anonymous 2, n.d.).



Slika 3. Skuša (Anonymous. n.d.)

Populacija koja obitava na Mediteranu, zrelost doseže pri veličini od oko 30 cm, a mrijesti se između ožujka i travnja (Collette i Nauen, 1983). Mlade se ribe hrane zooplanktonom, a odrasle jedinke ribljom mlađi i srdelicama. U Jadranu dosegne maksimalnu veličinu od 45 cm, dok u Atlantiku naraste do 60 cm. Ženke dosegnu veću veličinu od mužjaka.

Najčešći način ulova skuše je pomoću mreža plivarica. Prema izvješću FAO, 1999. godine ukupno je ulovljeno 610 947 t skuše. Zemlje s najvećim prometom skuše bile su Ujedinjeno Kraljevstvo sa 166 658 t i Norveška sa 160 816 t (Anonymous 2, FAO, 2016b). Što se tiče kemijskog sastava, udio vode iznosi 60 – 74 %, masti 1-23,5 %, a proteina 16 – 20 % (Murray i Burt, 2001). Skuša je poznata kao riba s vrlo visokim udjelom masti prije perioda mriješćenja te predstavlja jedan od najbogatijih izvora dugolančastih polinezasićenih masnih kiselina (LC – PUFA) (Hattour, 2000 navedeno u Guizani i Moujahed, 2015). Nakon perioda mriješćenja drastično opada udio masti te tada iznosi oko 1 %.

2.2 POST-MORTALNE PROMJENE KOD RIBA

Odmah nakon smrti proizvoda ribarstva nastupaju post – mortalne promjene *(post-mortem)* tijekom kojih dolazi do postupnog opadanja svježine ribe te s vremenom do nastanka kvarenja. Opadanje svježine posljedica je autolitičkih i bakterioloških reakcija, a opaža se kroz promjene boje, mirisa i teksture ribe (Vidaček, 2013). Kvarenje ribe prati nekoliko faza: nastanak rigor mortisa (mrtvačke ukočenosti), prestanak rigor mortisa, autolitičke promjene te bakteriološke promjene, koje se pojavljuju različitom brzinom, ovisno o vrsti ribe, fiziološkom stanju, mikrobnoj kontaminaciji te temperaturi (Ocańo-Higuera i sur., 2009).

Kako bi se produžio rok trajanja ribe, poželjno je produljiti vrijeme početka i nestanka mrtvačke ukočenosti (Vidaček, 2013.), pri čemu je potrebno voditi računa o nekoliko glavnih faktora koji direktno utječu na brzinu nastanka i prestanka mrtvačke ukočenosti. Brojni su znanstvenici eksperimentalno proveli istraživanja koja su uključivala varijacije u nekim od čimbenika. Skjervold i suradnici (2001) su na atlantskom lososu ispitali odgovor na stres uslijed postepenog hlađenja morske vode, povećane gustoće riba te njihovih kombinacija. Očekivano, rigor mortis je nastupio ranije u grupama koje su bile izložene stresu uslijed gužve. Također, riba koja je bila prethodno hlađena, dosegla je maksimalni rigor mnogo kasnije. Opaženo je i kako veće ribe dosežu veću vrijednost rigora. Bagni i suradnici (2007) su ispitivanjem na oradi i brancinu potvrdili učinak gužve na ranu pojavu rigora te uočili kako ribu podvrgnutu stresu nakon smrti

zahvaća intenzivniji rigor. Brzina nastanka i prestanka mrtvačke ukočenosti ovisi i o načinu omamljivanja, aktivnosti ribe od ulova do smrti, manipulaciji nakon ulova, temperaturi mišićja u trenutku ulaska u stanje rigor mortisa, gladovanju ribe prije ulova, vrsti i veličini ribe te periodu izlova (Vidaček, 2013).

2.3 KONZERVIRANJE ZAMRZAVANJEM

Svježu riba zbog specifičnog sastava i građe ubrajamo u lako kvarljive namirnice. Kvarenje ribe je uzrokovano rastom i razvojem mikroorganizama, aktivnošću enzima iz visceralnih organa, koji vertikalno zagađuju mišićni dio ribe i dovode do negativnih senzornih promjena (Karahmet i sur., 2013). Kako bi se produžio rok trajanja i održale željena kvaliteta i nutritivna vrijednost nužno je pravilno manipulirati ribom i odgovarajuće ju skladištiti (FAO, 2016c). Kontrola temperature, uključujući zamrzavanje, jedan je od načina produljenja trajnosti ribe.
Tijekom zamrzavanja potrebno je sniziti temperaturu namirnice na minimalno -18 °C. Produljenje trajnosti hrane procesom zamrzavanja temelji se na kombiniranom efektu sniženja temperature hrane te kristalizaciji i izdvajanju kemijski čiste vode, što rezultira koncentriranjem unutarstanične i izvanstanične tekućine, smanjenjem aktiviteta vode hrane, blagim sniženjem pH – vrijednosti, inhibicijom mnogih enzimskih reakcija i inhibicijom razvitka mikroorganizama (Vidaček, 2013).

2.3.1 Promjene na ribi tijekom zamrzavanja i skladištenja

Nakon zamrzavanja ribe, bakterijsko kvarenje prouzrokovano egzogenim enzimima prestaje, a autolitičke promjene uslijed raspada kemijskih sastavnica ribe djelovanjem unutrašnjih enzima su spore i minimalno dopridonose gubitku kvalitete. No, zbog visoke nezasićenosti ribljih lipida, dolazi do njihove hidrolize i oksidacije što utječe na razvoj užeglosti, denaturaciju proteina, promjenu teksture te sveopću prihvatljivost ribe za konzumaciju (Orak i Kayısoglu, 2008). Uslijed formiranja kompleksa oksidiranih lipida i proteina dolazi do akumulacije pigmenata i posljedično do nastanka žuto – smeđe diskoloracije (Frankel, 2005, Iglesias i sur., 2009).
Zamrzavanje uzrokuje denaturaciju proteina i posljedično smanjenje njihovih funkcionalnih svojstava, što rezultira tvrdoćom teksture i gubitkom tekućine. Navedene promjene prevladavaju na ribi koja sadrži nizak udio masti, dok su masne ribe podložnije oksidaciji masti.

2.3.2 Hidroliza i oksidacija lipida

Osim u triacilglicerolima koji se nalaze u pohranjenoj masti, do oksidacije dolazi i u polinazasićenim masnim kiselinama koje se nalaze u strukturalnoj masti. Pri temperaturama nižim od 0 °C rok trajanja ribe limitiran je stvaranjem slobodnih masnih kiselina (SMK) uslijed hidrolize triacilglicerola lipazama te fosfolipida fosfolipazama. SMK nastaju prvenstveno u neeviscerirano ribi zbog utjecaja probavnih enzima. Same po sebi daju neugodan, ‘’sapunast’’ miris, a utječu i na pojačan proces oksidacije (Frankel, 2005, Huss, 1995).

Lipidna oksidacija rezultira formiranjem hidroperoksida kao primarnih produkata, koji se zatim razlažu na različite sekundarne, hlapljive komponente, uključujući aldehide, ketone i alkohole koji smanjuju senzornu kvalitetu ribe (Agustinelli i Yeannes, 2015).
Riba sadrži prirodni antioksidacijski sustav kao i prooksidanse koji generiraju slobodne radikale te djeluju kao inicijatori lipidne oksidacije (Frankel, 2005). Inicijacija proizlazi iz različitih ranih *post mortem* promjena u ribljem tkivu koje remete prirodnu ravnotežu između oksidansa i prooksidansa, a uključuju akumulaciju aktivnih kisikovih vrsta, aktivaciju hemoproteina, porast koncentracije slobodnog željeza te potrošnju antioksidansa (Ólafsdóttir i sur., 1997).
Inicijacija uključuje izdvajanje vodikovog atoma od centralnog ugljika u pentadienskoj strukturi koju možemo naći u većini acilnih lanaca masnih kiselina koje sadrže više od jedne dvostruke veze. Za razliku od nativne molekule, lipidni radikal reagira brzo s atmosferskim kisikom tvoreći peroksidni radikal koji može ukloniti vodik s drugog acilnog lanca tvoreći pritom lipidni hidroperoksid i novi radikal. Propagacija se nastavlja sve dok se jedan od radikala ne ukloni reakcijom s drugim radikalom ili pak s antioksidansom koji rezultira nastankom mnogo inertnijeg radikala. Hidroperoksidi nastali tijekom propagacije nemaju okus, no lako se raspadaju na kraće ugljikove lance, takozvane sekundarne produkte autooksidacije, a to su uglavnom aldehidi, ketoni, alkoholi, manje karboksilne kiseline i alkani. Navedeni spojevi tvore širok spektar mirisa, a ponekad i žutkastu diskoloraciju. Hidroperoksidi mogu nastati i enzimski, katalizirani lipoksigenazom koja je prisutna u različitim tkivima, najviše ispod kože i u škrgama. No, budući da enzim nije stabilan, zamrzavanjem mu se uništava aktivnost te je bitan za proces lipidne oksidacije samo u svježoj ribi (Huss, 1995).
Brzina i obujam oksidacije ovise o udjelu masti, sastavu masnih kiselina, koncentraciji kisika, aktivnoj površini, načinu provedbe zamrzavanja te temperaturi i trajanju skladištenja (Vidaček, 2013).

Lipidna se oksidacija može usporiti pomoću sintetskih ili prirodnih antioksidansa (tokoferoli, flavanoidi) te metalnih kelatora (EDTA, askorbat, fosfat). Oni su djelotvorniji na usitnjenoj ribi gdje im struktura dopušta lakšu inkorporaciju s lipidima, što nije slučaj kod cijele ribe. Razvoj užeglosti može se usporiti i smanjenjem izloženosti zraku te korištenjem vakuum pakiranja i pakiranja u kontroliranoj atmosferi (Frankel, 2005).

2.4 HLAPLJIVI SPOJEVI KAO POKAZATELJI SVJEŽINE RIBE

Miris ribe jedan je od osnovnih parametara koji se koristi za procjenu svježine. Karakteristični hlapljivi spojevi koji imaju znatan utjecaj na ukupnu aromu pogodni su za praćenje svježine ili kvarenja ribe. U Tablici 1. nalazi se detaljna klasifikacija tih spojeva te njihov doprinos aromi. Hlapljivi produkti razgradnje dugolančanih omega–3 polinezasićenih masnih kiselina imaju nisku razinu detekcije (ppb) te se mogu identificirati već pri vrlo niskom stupnju oksidacije. Različiti aldehidi prepoznati su kao nosioci karakterističnog mirisa i okusa oksidirane ribe, a opisuje se kao užagao, riblji te nalik boji i ulju bakalarove jetre. Oksidacija nezasićenih masnih kiselina tijekom skladištenja i procesiranja masnije ribe vodi do formiranja hlapljivih spojeva te je povezana s nastankom 2-pentenala, 2-heksenala, 4-heptenala, 2,4-heptadienala i 2,4,7-dekatrienala. Neki od spojeva za koje se smatra da imaju najveći utjecaj na miris uključuju 1,5-oktadien-3-on, 2,6-nonadienal, 3-heksenal i 3,6-nonadienal (Frankel, 2005, Iglesias i Medina, 2008). Hlapljiva priroda takvih spojeva čini ih prikladnima za GC i senzorsku analizu. Nedavno je evaluacija hlapljivih spojeva postala jedna od prihvaćenih metoda za mjerenje lipidne oksidacije, no valja imati na umu da nestabilnost različitih produkata utječe na teškoće u interpretaciji rezultata te može upućivati na varljive rezultate. Stoga je prilikom praćenja progresije lipidne oksidacije bitno koristiti više od jedne metode (Ólafsdóttir, 1997, Iglesias i sur., 2009).

Tablica 1. Vrste arome u ribi i primjeri spojeva odgovornih za aromu (prema Ólafsdóttir, 2015)

Riblja aroma	Klasifikacija kemijskih spojeva	Primjeri spojeva	Opis arome	Prag osjetljivosti u vodi
Svježa riblja aroma karakteristična za vrstu	**C6 - C9 alkoholi i karbonili**	Heksanal/ t-2-heksenal,	Zelena, aldehidna	4,5ppb / 17ppb
		1-okten-3-ol/1-okten-3-on	Glljive	10ppb / 0,009ppb
		1,5-oktadien-3-ol	Teška zemljana, gljive	10 ppb
		1,5-oktadien-3-on	Geranij	0,00 ppb
		2,6- nonadienal	Krastavci	0,00 ppb
		3,6-nonadienol	Krstavci,dinja	10 ppb
	Bromofenoli	2,6-dibromfenol	Jod i školjke	0,0005 μgkg^{-1}
		2,4,6- tribromfenol	Morska riba	0,6 μgkg^{-1}
		2-bromfenol	Morski,brodski miris	
	N-ciklički spojevi	Pirolidin	Zemljana	
		Piperidin		
Aroma uzrokovana mikrobiološkim kvarenjem	**Kratkolančani alkoholi, kratkolančani karbonili**	Etanol, propanol, butanol	poput otapala	1-100 ppm
		3-metil-1-butanol		
		Aceton, butanon	poput otapala	
		Etanal,propanal		
		3-metilbutanal	Slad	0,06 ppm
		2-metilbutanal	Slad	0,04 ppm
	Amini	Amonia,	Amonijak	110 ppm
		TMA	Riblja, amonijak	30 ppm
		DMA		0,6 ppm
		Histamin		
		Putrecin	Pokvarena	
		Kadevarin		
	Sumporni spojevi	Hidrogen sulfid	Sumporna,kuhana jaja	5-40 ppb
		Metilmerkaptan	Pokvareni,kupus	0,05 ppb
		Metil sulfid	Kupus	0,9 μgkg^{-1}
		Dimetil disulfid	Pokvarena, luk	12 ppb
		Dimetil trisulfid	Pokvarena,kupus i luk	0,01 ppb
		bis-metiltio metan	Češnjak	0,3 μgkg^{-1}
		Tioesteri		
	Aromatski	Fenetil alkohol	Stare ruže	
		Fenol,	Fenolna	2 ppm
		p-kresol	Konjski gnoj	300 μgkg^{-1}
	N-ciklički spojevi	Indol	Naftalin, fekalije	
		Skatol		
	Kiseline	Octena kiselina		34,2 ppm
		Maslačna kiselina	Kisela, trula	32,8 ppm
		Izomaslačna kiselina		
Oksidirana aroma	**Nezasićeni aldehidi**	Heksanal	Biljna, zelena	4,5 ppb
		c4-heptenal	Karton, krumpir	0,04 ppb
		2,4- heptadienal	Mirsi oksidirane ribe	
		2,4,7-dekatrienal	Dim,riblja,ulje bakalara	
Aroma nastala preradom		2,4-heptadienal i 3,5-oktadien-2-on	Zreli inćuni	
		Metional	Kuhane rajčice	
		2-metil-3-furantiol	Konzervirana tuna	
Aroma okoliša		Metil sulfid	Petrolej	
		Geosmin		
		2-metil-izo-borneol	Zemljana, blato	

2.5 KONTROLA KVALITETE PROIZVODA RIBARSTVA

Pojam kvalitete u ribljoj se industriji najčešće poistovjećuje s vanjskim izgledom i svježinom te se odnosi na razinu kvarenja. S druge strane, vladine organizacije, koje su prvenstveno bave zdravstvenom ispravnošću, pod pojmom kvalitete podrazumijevaju odsutnost štetnih tvari poput kemikalija, parazita ili patogenih organizama, odnosno bioloških, kemijskih i fizikalnih opasnosti. Razvijene su mnogobrojne metode za procjenjivanje različitih aspekata kvalitete (Huss, 1988).

Parametri kvalitete ribe mijenjaju se ovisno o uvjetima prilikom smrti (stres prije i nakon ulova) i skladištenja (rukovanje i temperatura). Na relativne promjene u kvaliteti ukazuju:

I. Izgled (fizičke ozljede, pucanje mesa, boja)
II. Tehnološke osobine (razvitak rigora, tekstura, sposobnost vezanja vode, skupljanje fileta)
III. Indikatori svježine (dielektrična svojstava, impedancija, K vrijednost), odnosno kvarenja (biogeni amini, produkti lipidne oksidacije)
IV. Senzorska kvaliteta sirove ribe (izgled kože, stanje rigora, oči, škrge, boja, miris, sluz, stanje mesa) i rok trajnosti (Poli i sur., 2005)

2.5.1. Organoleptička procjena

Kvarenje ribe utječe na karakteristične promjene u izgledu, mirisu, okusu i teksturi. U Europskoj Uniji za kategorizaciju svježe ribe ovisno o kvaliteti koristi se EU shema. Nedostatak metode jest taj što koristi opće parametre, neovisno o vrsti ribe te ne može odrediti rok trajanja ribe.

Određivanje indeksa kakvoće (QIM) je objektivna senzorska evaluacija koja ocjenjuje kvalitetu ribe i predviđa rok trajanja (Toldrá i Reig, 2011). Svakom se parametru pritom dodjeljuju bodovi ovisno o kriterijima koje zadovoljava.

Za procjenu svježine ribljih fileta upotrebljava se Torry – scale metoda. Temelji se na ocjenjivanju kuhanih fileta uz pomoć definirane deskriptivne ljestvice.

2.5.2 Instrumentalne metode

Najzastupljenije instrumentalne metode koje se primjenjuju za ocjenjivanje kvalitete ribljeg mesa su Trimetilamin dušik (TMA – N) i Ukupni hlapivi bazni dušik (TVB – N).
TMA je prisutan u svježoj ribi u malim količinama, ali prilikom skladištenja dolazi do porasta njegove koncentracije, uglavnom kao rezultat bakterijske redukcije trimetilamin oksida.
Analiza ovog parametra ne daje saznanja o ranim autolitičkim promjenama ili stupnju svježine, već samo bakteriološkim promjenamaa i kasnijim fazama kvarenja.
TVB ima širu primjenu od prethodne metode, budući da je prikladan i za uzorke koji ne sadrže TMAO ili ga sadrže u vrlo malim količinama. No, kao i u slučaju TMA, njegova se koncentracija povisuje tek u kasnijim fazama. To mu svojstvo daje mogućnost upotrebe kod rutinskih metoda za provjeru stupnja kvarenja ohlađene ribe (Huss, 1988, Okeyo, 2009).

2.5.3 Identifikacija i kvantifikacija hlapljivih spojeva

Miris je vrlo bitan parametar koji se koristi pri evaluaciji svježe ribe, stoga se mjerenje karakterističnih hlapljivih spojeva može koristiti za praćenje svježine, odnosno kvarenja ribe (Ólafsdóttir, 1997). Jónsdóttir i suradnici (2008) su na dimljenom lososu utvrdili kao je analiza hlapljivih komponenti koristan indikator kvalitete. U studiji su pratili hlapljive spojeve povezane s kvarenjem: etanol, 3-metil-1-butanol, 3-metil-butanal, 3-hidroksi-butanon, 2-butanon i octenu kiselinu.
Kombinacija plinske kromatografije i masene sprektrometrije (GC-MS) je jednostavna tehnika za analizu hlapljivih spojeva arome. Za razliku od ostalih instrumentalnih metoda, plinska kromatografija zahtijeva specijalne tehnike pripreme uzorka, budući da uzorak treba biti isparen u injektor. Mikroeksteakcija na čvrstoj fazi (SPME) je tehnika pripreme uzorka koja se između brojnih dostupnih tehnika istaknula vrlo širokom mogućnošću primjene (Grob i Barry, 2004).

2.5.3.1 SPME

SPME je tehnika ekstrakcije koja kombinira uzorkovanje i pripremu uzorka u jednom koraku. Metoda je ekonomična, ne zahtijeva korištenje otapala te predstavlja nekoliko prednosti u odnosu na ostale u pogledu osjetljivosti, selektivnosti te pogodnosti za rutinske analize. Korištena u *headspace* (zračni prostor iznad uzorka) načinu, posebno je pogodna za analizu hlapljivih spojeva (Iglesias i Medina, 2008).

Aparatura za SPME čini jednostavna modificirana šprica koja se sastoji od nosača, igle i tankog optičkog vlakna obavijenog tankim polimernim filmom koji apsorbira i koncentrira organske spojeve (Levaj i Repajić, n.d.).
Prilikom analize pomoću SPME, vlakno se najprije postavlja u zračni prostor iznad otopine analita, a nakon postizanja ravnoteže, vlakno se uvlači u iglu i uklanja iz bočice s uzorkom. Igla se zatim prenosi u zagrijani injektor, a analiti se termalno desorbiraju u plinski kromatograf (Grob i Barry, 2004).



Slika 4. Nosač vlakna za ručno uzorkovanje (Prema Grob i Barry, 2004)

Optimizacija i odabir različitih parametara imaju značajan utjecaj na analizu. Varijable poput vrste vlakna, količine uzorka, trajanja i temperature ekstrakcije, efekta isoljavanja i vremena desorpcije u injektor utječu na efikasnost predkoncentriranja (Iglesias i Medina, 2008).

2.5.3.2 GC-MC

Ono što je zajedničko svim kromatografskim tehnikama jest odvajanje komponenti iz smjese pomoću niza ravnotežnih operacija koje rezultiraju separacijom uslijed njihove raspodjele između dvije različite faze – stacionarne faze velike površine i mobilne faze koja je u kontaktu s prvom. U plinskoj kromatografiji mobilnu fazu čini plin, a stacionarnu adsorbens ili tekućina nanesena na kruti nosač (Grob i Barry, 2004, Anonymous 3, 2016).
Kombinacija plinske kromatografije i masene spektrometrije je vezani sustav u kojem plinski kromatograf odvaja organske komponente, a maseni spektrometar detektira njihove strukturne informacije (Levaj i Repajić, n.d.). Najprije se uzorak uvodi u struju inertnog plina, najčešće

helija ili argona, koji djeluje kao nosač. Ukoliko je uzorak tekući, prethodno se mora prevesti u plinovito stanje. Struja plina prolazi kroz kolonu te dolazi do razdvajanja komponenti uzorka različitim brzinama ovisno o stupnju interakcije svakog sastojka sa stacionarnom fazom. Oni sastojci koji imaju jače interakcije zaostaju u većoj mjeri te se posljedično odvajaju od ostalih. Separirani se uzorci uvode u maseni spektrometar gdje se ioni, ovisno o njihovom kretanju u električnom i magnetskom polju, sortiraju prema omjeru mase i naboja. Maseni se spektrometar sastoji od sustava za unošenje uzorka, izvora iona koji stvara plinovite ionske fragmente, analizatora koji ih razdvaja prema masi te detektora koji skuplja i karakterizira razdvojene ionske komponente (Anonymous 3, 2016).

3.0 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 PLAN ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je identificirati te kvantitativno analizirati hlapljive spojeve prisutne u uzorcima oslića i skuše tijekom skladištenja u zamrznutom stanju. Eksperiment se provodio u razdoblju od 10 mjeseci, a mjerenja su provedena na svježem uzorku te nakon približno 1., 2., 5. i 10. mjeseca skladištenja.

Svježa riba koja je naknadno korištena za analizu izlovljena je u Jadranskom moru, a kupljena je u trgovini veleprodaje 14. svibnja 2015. godine, kada je ujedno provedeno i prvo mjerenje. Istoga dana svi su uzorci očišćeni te podvrgnuti sporom načinu zamrzavanja na -18 ^{0}C. Dio uzorka odmah je usitnjen te zamrznut u homogeniziranom obliku. Korištena je riba karakterizana niskim udjelom masti (oslić 0,87 % , skuša 0,68 %).

Mjerenja su u svakom od navrata te za svaku ribu obuhvaćala tri paralelna uzorka – uzorak A, uzorak B i homogenizirani, odnosno skupni uzorak.

Prvi dan svakog od tri mjerenja uzorci su izvađeni iz zamrzivača i postavljeni u hladnjak na temperaturu +4 ^{0}C kako bi se odmrznuli. Iduća dva dana provodio se eksperiment, prvi dan na uzorcima oslića, a drugi dan na uzorcima skuše.

3.2 MATERIJALI

3.2.1 Priprema uzorka ribe

Prije samog zamrzavanja priprema ribe je obuhvaćala uklanjanje utrobe, glave i kralješnice te filetiranje. Masa očišćenih oslića kretala se između 120 – 170 g, a skuše su težile između 180 – 280 g. Od svake vrste ribe odvojena su po tri očišćena komada kojima su dodatno uklonjeni koža, sitne kosti i tamno mišićno tkivo. Očišćeno mišićno tkivo je homogenizirano i razdijeljeno u tri zasebna paketića, po jedno za svako od mjerenja. Preostali fileti su spremljeni u plastične vrećice te zajedno s homogeniziranim uzorcima zamrznuti na -18 ^{0}C.

Na dan provođenja svakog od mjerenja, nakon što su fileti odmrznuti, homogenizirani su na isti način kao i oni koji su bili usitnjeni prije procesa zamrzavanja. Dobiveni homogenizirani uzorci (A i B) stavljeni su u plastične kivete i čuvani u hladnjaku tijekom dana.

3.2.2 Korištena oprema

- Analitička vaga, Kern ABS, KERN & SOHN GmbH, Njemačka
- Homogenizator, Ultra turax T, 18 basic, IKA, Njemačka
- Centrifuga, Rotina 380R, HETTICH, Njemačka
- Termoblok, Reacti-Therm Dry Block, PIERCE, SAD
- Plinski kromatograf, Agilent Technologies 6890N, Network GC System, SAD

3.2.3 Korištene kemikalije

- Deionizirana voda
- Zasićena otopina NaCl-a
    - 35,9 g NaCl-a otopljeno u 100 mL deionizirane vode
- Otopina internog standarda 4-metil-2-pentanol (15 μgmL^{-1})
    - 75 mg 4-metil-2-pentanola otopljeno u 50 mL deionizirane vode
    - Iz dobivene je otopine izdvojeno 500 µL i dopunjeno do 50 mL

3.3 METODE

3.3.1 Određivanje hlapljivih spojeva HS-SPME/GC-MS metodom

Izdvajenje hlapljivih sastojaka arome provedeno je HS-SPME metodom ekstrakcije, a uslijedila je njihova identifikacija korištenjem kombinacije plinskog kromatografa 6890N (GC) i masenog spektrometara 5975i (MS).

Postupak:

a) Priprema standarda i baždarnog dijagrama

Napravljena su razrjeđenja svakog pojedinog standarda (svih 14 spojeva) na način da je 50 mg standarda otopljeno u 10 mL vode (5 $mgmL^{-1}$). U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetirano je 100 µL svake otopine te je tikvica dopunjena do oznake. Na taj je način dobivena otopina koncentracije 5 μgmL^{-1}.

Kako bi se napravila baždarna krivulja, pripremljeno je 9 otopina točno određenih koncentracija u rasponu od 0,25 $ngmL^{-1}$ do 500 $ngmL^{-1}$ na način da je otpipetiran određeni volumen otopine standarda i dodano onoliko mL zasićene otopine NaCl koliko je nedostajalo do 6 mL. Od otopina ovih koncentracija otpipetirano je 6 mL i dodano 100 µL

internog standarda, ubačen je magnetić za miješanje te je uzorak podvrgnut procesu ekstrakcije.

Ekstrakcija je izvedena pod različitim uvjetima te se pokazalo da su rezultati najbolji ako vrijeme ekstrakcije iznosi 30 min, temperatura 60 °C, a vrijeme desorpcije 1 min.

b) Priprema uzorka

U plastičnu kivetu odvagano je 6 g prethodno homogeniziranog uzorka te 16 mL zasićene otopine NaCl-a. Slijedilo je centifugiranje na 3500 rpm u trajanju od 10 min. U stakleni vial volumena 20 mL ubačen je magnetić za miješanje, 100 µL internog standarda te 6 mL otpipetiranog supernatanta iz prethodno centrifugiranog uzorka. Na stakleni vial je položen PTFE čep te je pričvršćen kliještima. Tako pripremljeni uzorak bio je spremam za proces ekstrakcije.

c) Primjena HS-SPME metode

Korišteno je vlakno obloženo DVB/CAR/PDMS punilom (divinilbenzen/karboksen/poli-dimetilsiloksan) debljine 50/30 µm. Prije ekstrakcije podvrgnuto je predkondicioniranju u injektoru na 270 °C u trajanju od sat vremena.

Termostat u termobloku prethodno je namješten na 60 °C. Pripremljeni stakleni vial postavljen je na stalak iznad termobloka na način da dijelom bude uronjen u vodu. Zatim je iglom za SPME probušen PTEF čep. Uključen je magnetski mješač te je iz igle istisnuto vlakno. Na ovaj način punilo vlakna dolazi u kontakt s prostorom iznad uzorka (eng. *headspace*) te se potpomognuta miješanjem, vrši adsorpcija hlapljivih sastojaka na polimerno vlakno. Nakon 60 minuta vlakno je uvučeno u iglu, te je igla kroz PTEF čep izvučena iz uzorka.



Slika 5. Grafički prikaz ekstrakcije pomoću SPME igle (Anonymous 4, 2015)

d) Plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS)

Vlakno izvađeno iz uzorka injektirano je u plinski kromatograf (GC) povezan s masenim spektrometrom (MS). Temperatura injektora plinskog kromatografa iznosila je 250 °C uz *splitless* radno područje. Desorpcija prethodno adsorbiranih analita pod utjecajem visoke temperature trajala je 2 minute, a zatim je vlakno ponovno uvučeno u iglu te uklonjeno iz uređaja.

Razdvajanje hlapljivih sastojaka provedeno je pomoću ZB-5 ms, 30 m × 0,25 mm kapilarne kolone debljine filma 0,25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Kao mobilna faza, odnosno plin nosioc korišten je helij, brzine protoka 1,0 mL min^{-1}.

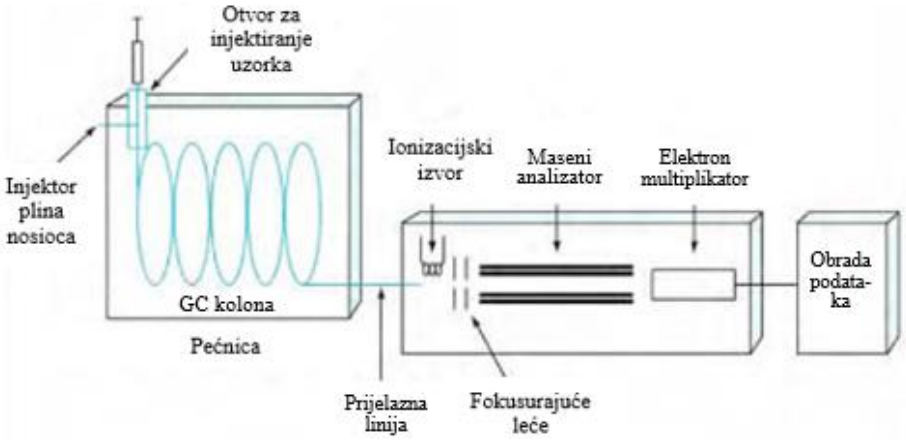
Temperatura detektora postavljena je na 250 °C, a temperatura prijelazne linije (eng. *transfer line)* na 280°C.

Temperaturni program rada podešen je na način da je prvih 10 min temperatura konstantno iznosila 40 °C, a zatim se svaku minutu podizala za 5 °C, sve dok nije dosegnula 200 °C. Na kraju je brzinom od 20 °C/min povišena na 250 °C te je održavana 5 min.

Energija elektrona za ionizaciju molekula uzoraka iznosila je 70 eV. Parametri masenog spektrometra postavljeni su na brzinu očitanja od 1 očitak/s (eng. *scan/s*), a opseg razdvajanja mase i naboja (m/z) u rasponu od 30-550.

e) Identifikacija hlapljivih spojeva

Identifikacija hlapljivih spojeva provedena je usporedbom dobivenih masenih spektara s onima sadržanima u NIST05, NIST02 i WILLEY275 bazama podataka korištenjem softvera *MSD ChemStation Data Analysis.* Prema postavkama softvera, posebno su praćeni sljedeći spojevi: 4-metil-2-pentanon, 2-butanon, 1-penten-3-ol, 2-etilfuran, 1-pentanol, heksanal, 2-heptanon, heptanal, benzaldehid, 1-okten-3-ol, oktanal, 2,4-heptadienal, 2-nonanon, nonanal i 2-undekanon.



Slika 6. Shematski prikaz rada GC-MS uređaja (FAO/WHO, 2006)

3.3.2 Statistička obrada rezultata mjerenja

Rezultati su statistički obrađeni u programu *IBM SPSS Statistics* uz graničnu p – vrijednost podešenu na 5 %, odnosno usporedbe razlika koje rezultiraju s $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnima. Statističku značajnost razlika između uzoraka provjerena je provedbom jednosmjerne analize varijance (ANOVA), a u slučajevima gdje je potvrđena proveden je *post hoc* Turkeyev test koji pokazuje koji su uzorci različiti od drugih.

4.0 REZULTATI I RASPRAVA

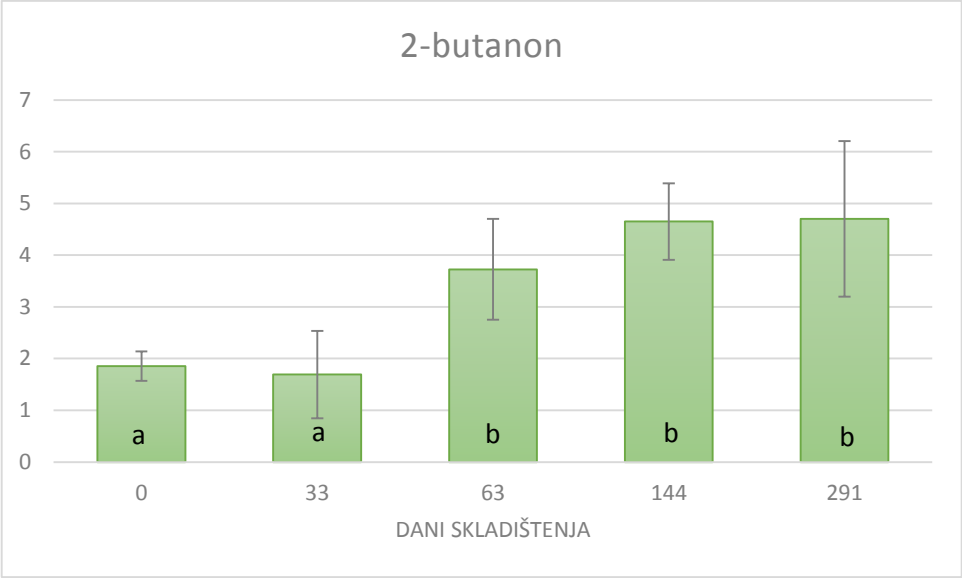
U Tablicama 2 i 3 masno otisnuti spojevi predstavljaju one spojeve čija se koncentracija značajno promijenila tijekom skladištenja, te su stoga oni obuhvaćeni daljnjom raspravom.

Tablica 2. Promjene koncentracije hlapljivih spojeva u uzorcima oslića tijekom skladištenja

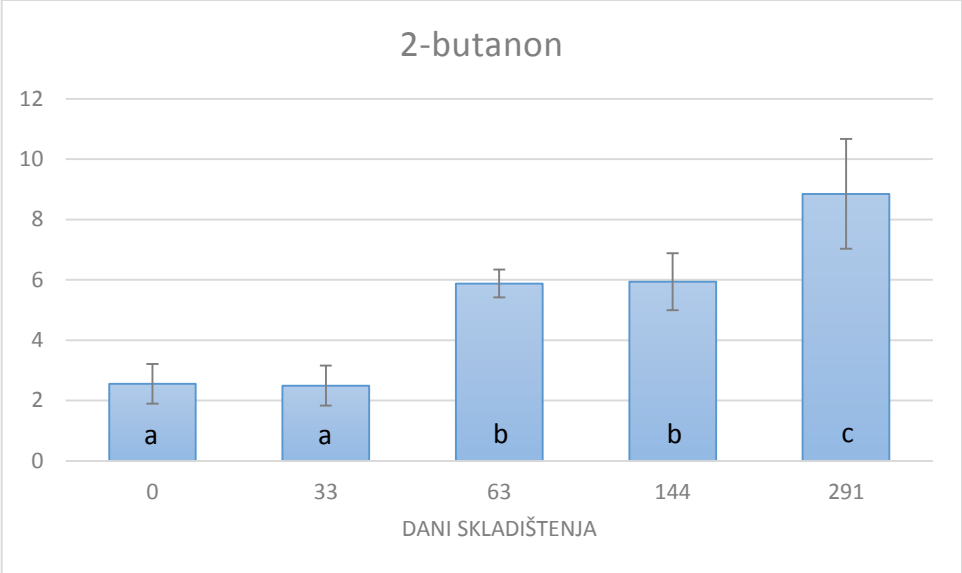
Hlapljivi spoj	Dani skladištenja ($ngmL^{-1}$: srednja vrijednost ± std. dev.)				
	0	33	63	144	291
2-butanon	1,86 ± 0,28	1,69 ± 0,84	3,73 ± 0,98	4,65 ± 0,74	4,70 ± 1,51
1-penten-3-ol	29,15 ± 4,22	34,44 ± 17,86	38,97 ± 11,76	68,81 ± 5,81	84,68 ± 10,79
2-etilfuran	8,75 ± 0,73	8,41 ± 4,42	8,99 ± 1,04	9,76 ± 0,44	12,64 ± 3,45
1-pentanol	5,18 ± 0,55	4,20 ± 2,10	6,36 ± 0,69	8,36 ± 0,66	9,77 ± 2,03
Heksanal	18,71 ± 3,55	20,80 ± 11,59	23,48 ± 4,54	32,13 ± 5,24	56,15 ± 25,93
2-heptanon	4,33 ± 0,05	3,58 ± 1,75	4,71 ± 0,33	4,65 ± 0,16	5,18 ± 1,17
Heptanal	7,69 ± 0,22	6,60 ± 3,25	8,04 ± 0,38	8,63 ± 1,62	10,81 ± 2,09
Benzaldehid	10,95 ± 0,07	9,22 ± 4,52	11,37 ± 0,10	12,33 ± 0,32	14,26 ± 2,09
1-okten-3-ol	6,86 ± 0,23	5,83 ± 2,86	7,37 ± 0,23	7,70 ± 0,29	8,30 ± 0,43
Oktanal	6,31 ± 0,48	5,32 ± 2,74	9,67 ± 1,20	8,75 ± 0,50	9,10 ± 1,12
2,4-heptadienal	8,63 ± 0,12	7,29 ± 3,57	8,74 ± 0,22	8,67 ± 0,31	9,52 ± 0,87
2-nonanon	12,83 ± 0,02	10,69 ± 5,23	12,85 ± 0,02	13,06 ± 0,23	13,17 ± 0,18
Nonanal	13,00 ± 0,37	10,52 ± 5,16	12,98 ± 0,20	13,17 ± 0,16	14,07 ± 1,03
2-undekanon	10,77 ± 0,04	8,97 ± 4,39	10,78 ± 0,02	11,05 ± 0,40	11,57 ± 0,55

Tablica 3. Promjene koncentracije hlapljivih spojeva u uzorcima skuše tijekom skladištenja

Hlapljivi spoj	Dani skladištenja ($ngmL^{-1}$: srednja vrijednost ± std. dev.)				
	0	33	63	144	291
2-butanon	2,55 ± 0,65	2,49 ± 0,67	5,88 ± 0,46	5,94 ± 0,95	8,85 ± 1,82
1-penten-3-ol	51,80 ± 9,75	82,61 ± 16,84	131,00 ± 25,63	113,35 ± 11,78	132,11 ± 23,88
2-etilfuran	10,10 ± 1,73	17,18 ± 5,40	15,10 ± 0,65	21,85 ± 3,78	26,26 ± 7,95
1-pentanol	6,17 ± 0,86	8,52 ± 1,10	13,37 ± 2,86	13,83 ± 2,56	22,63 ± 9,89
Heksanal	26,37 ± 5,08	55,22 ± 13,85	70,63 ± 4,31	78,13 ± 6,54	79,62 ± 10,23
2-heptanon	4,37 ± 0,05	4,52 ± 0,10	4,66 ± 0,22	4,81 ± 0,22	4,46 ± 0,10
Heptanal	10,13 ± 0,95	17,19 ± 2,57	16,45 ± 1,54	18,27 ± 2,13	21,51 ± 2,78
Benzaldehid	11,24 ± 0,13	12,90 ± 0,79	12,25 ± 0,27	13,83 ± 0,45	14,63 ± 0,47
1-okten-3-ol	7,01 ± 0,34	9,36 ± 0,93	8,71 ± 0,64	9,24 ± 0,91	9,49 ± 0,70
Oktanal	9,92 ± 1,47	28,42 ± 5,80	22,04 ± 4,40	22,90 ± 2,05	27,73 ± 4,78
2,4-heptadienal	8,75 ± 0,15	10,91 ± 1,51	9,86 ± 0,64	10,14 ± 0,29	9,82 ± 0,70
2-nonanon	12,92 ± 0,03	13,35 ± 0,18	13,17 ± 0,08	14,16 ± 1,07	13,42 ± 0,33
Nonanal	13,04 ± 0,26	15,51 ± 0,61	15,95 ± 1,15	16,06 ± 0,88	16,47 ± 1,17
2-undekanon	10,76 ± 0,01	11,02 ± 0,05	10,90 ± 0,06	10,86 ± 0,77	11,25 ± 0,27



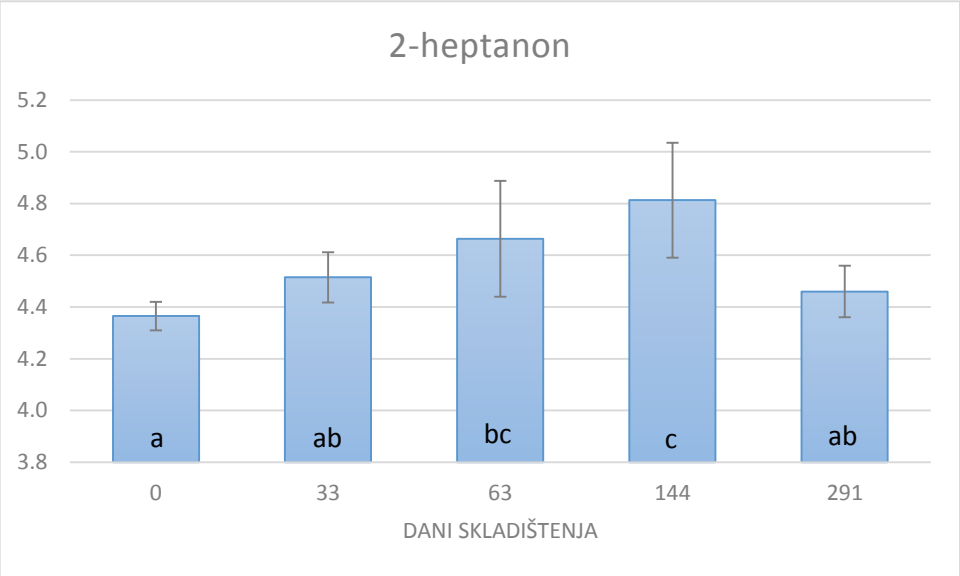
Slika 7. Promjene u koncentraciji 2-butanona ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja oslića (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)



Slika 8. Promjene u koncentraciji 2-butanona ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja skuše (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

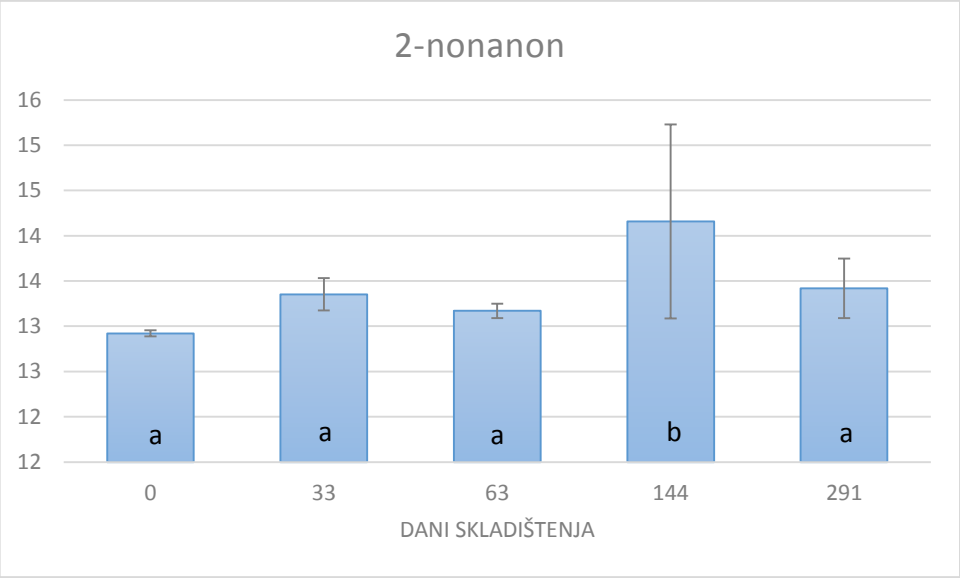
U obje je ribe do povišenja koncentracije 2-butanona došlo tijekom 2. mjeseca skladištenja (Slike 6 i 7). No, kod oslića ta vrijednost nije dodatno značajno porasla sve do kraja provođenja eksperimenta, dok je kod skuše u zadnjem mjesecu skladištenja došlo do novog rasta. Također, već su na svježem uzorku oslića postignute mnogo niže koncentracije nego što je to bio slučaj

kod oslića, a isti se trend zadržao tijekom cijelog razdoblja. Porast koncentracije može se poistovjetiti s istraživanjem kojeg su proveli Jónsdóttir i suradnici (2008) te utvrdili da je uzorak lososa kojeg karakterizira najviši stupanj kvarenja sadrži najvišu koncentraciju 2-butanona, koji doprinosi razvoju slatko/kiselog i neugodnog mirisa i okusa.



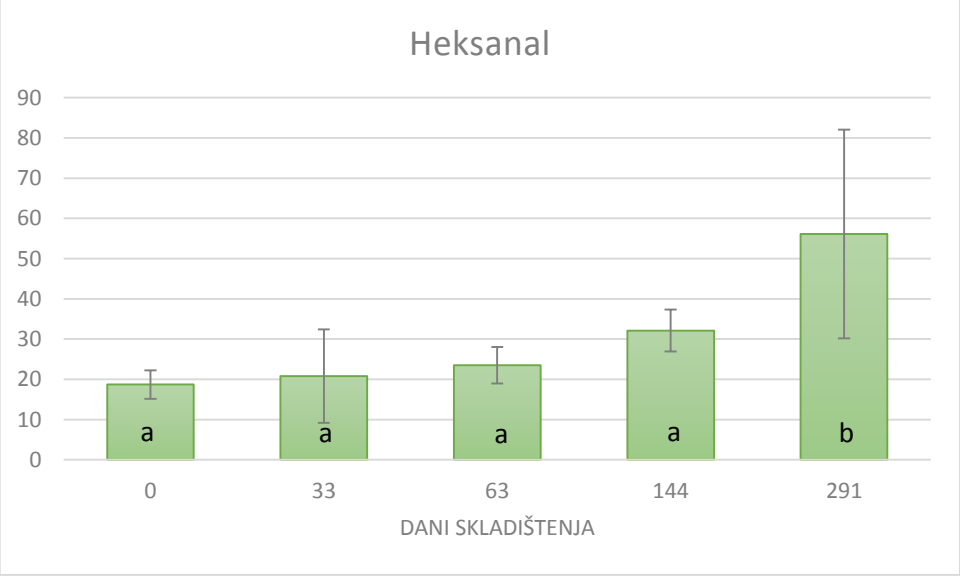
Slika 9. Promjene u koncentraciji 2-heptanona ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja skuše (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

Statističkom je analizom utvrđeno kako kod oslića nije došlo da značajne promjene u koncentraciji 2-heptanona tijekom skladištenja, dok kod skuše (Slika 8) to nije slučaj. Naime, slične su vrijednosti zabilježene na svježem uzorku te nakon 10-omjesečnog skladištenja, dok je u periodu između koncentracija bila u stalnom porastu, a značajno je porasla nakon dva mjeseca.

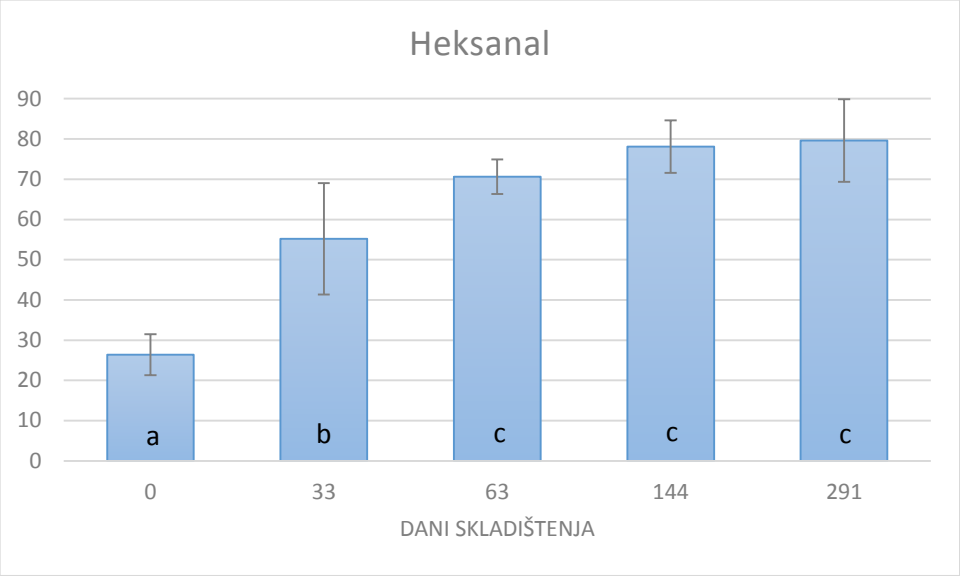


Slika 10. Promjene u koncentraciji 2-nonanaona ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja skuše (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

Iako su pojedinačne vrijednosti koncentracije 2-nonanona u obje vrste ribe bile slične, pokazalo se da u uzorku oslića nije došlo do značajnih promjena. U slučaju skuše (Slika 9), tek je u 4. mjerenju detektiran značajniji porast koncentracije, da bi se tijekom idućih 4 mjeseca ta vrijednost snizila na vrijednost sličnu početnoj koncentraciji. Trend pada koncentracije u 10. mjesecu skladištenja skuše možemo usporediti s 2-heptanonom.



Slika 11. Promjene u koncentraciji heksanala ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja oslića (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)



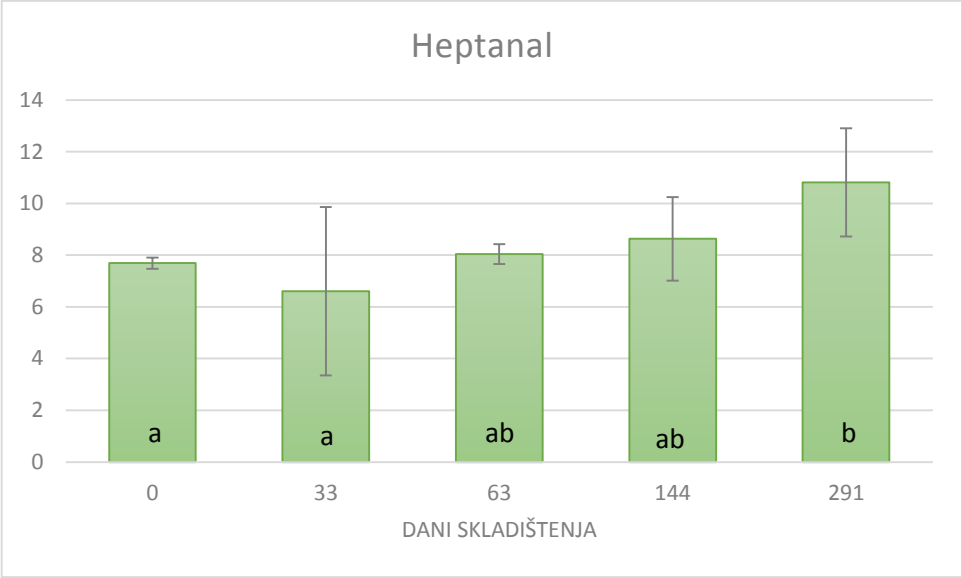
Slika 12. Promjene u koncentraciji heksanala ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja skuše (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

U osliću (Slika 10) tijekom prvih 144 dana koncentracija heksanala nije značajno varirala, a do većeg je porasta došlo u 10. mjesecu. Kod skuše (Slika 11) je koncentracija znatno porasla odmah tijekom prvog mjeseca, dodatan se rast dogodio tijekom drugog mjeseca te se izmjerene vrijednosti nisu bitno promijenile do kraja eksperimenta. U Tablicama 2 i 3 možemo uočiti kako u oba slučaja koncentracije ovog spoja veoma odskaču od ostalih, što se dogodilo i kod baltičke haringe (Aro, 2003), bakalara (Kawai, 1996) i orade (Igleasias sur., 2009).

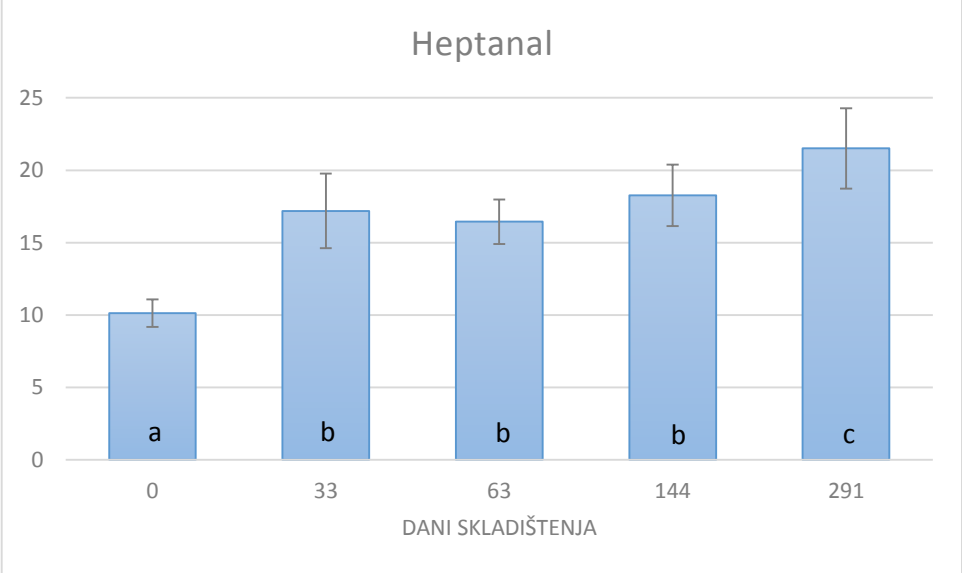
Heksanal u svježoj ribi potječe od enzimskog mehanizma, budući da se njegova koncentracija smanjuje ukoliko se primjene inhibitori lipoksigenaze. Isto tako, tijekom skladištenja na ledu ili zamrzivaču, dolazi do porasta koncentracije uslijed autooksidacijskih procesa. Može nastati preko 13-hidroperoksida linolne kiseline, a smatra se i degradacijom hlapljivih spojeva poput 2,4-dekadienala i 2-oktenala (Duflos i sur, 2005, Iglesias i Medina, 2008).

Najvjerojatnije objašnjenje visoke koncentracije leži u činjenici da se u uzorcima nalazi mnogo linolne kiseline, koja je supstrat oksidacijske reakcije čiji je produkt heksanal. Aro (2003) je u svom istraživanju zamijetio jasan porast u koncentraciji već nakon 4. dana. Manji je udio heksanala detektiran u osliću, koji se ubraja u bijelu ribu, a isto su dokazali i Giri i sur. (2010) usporedbom nekoliko vrsta ribe.

Miris heksanala je umjeren i zemljani, a može se osjetiti pri relativno visokim koncentracijama (4,5 ppb).



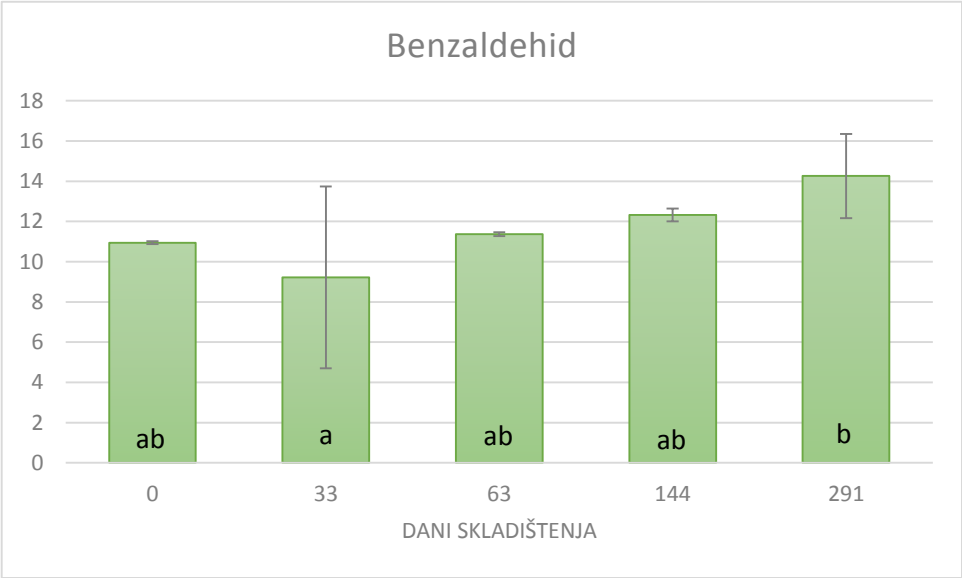
Slika 13. Promjene u koncentraciji heptanala ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja oslića (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)



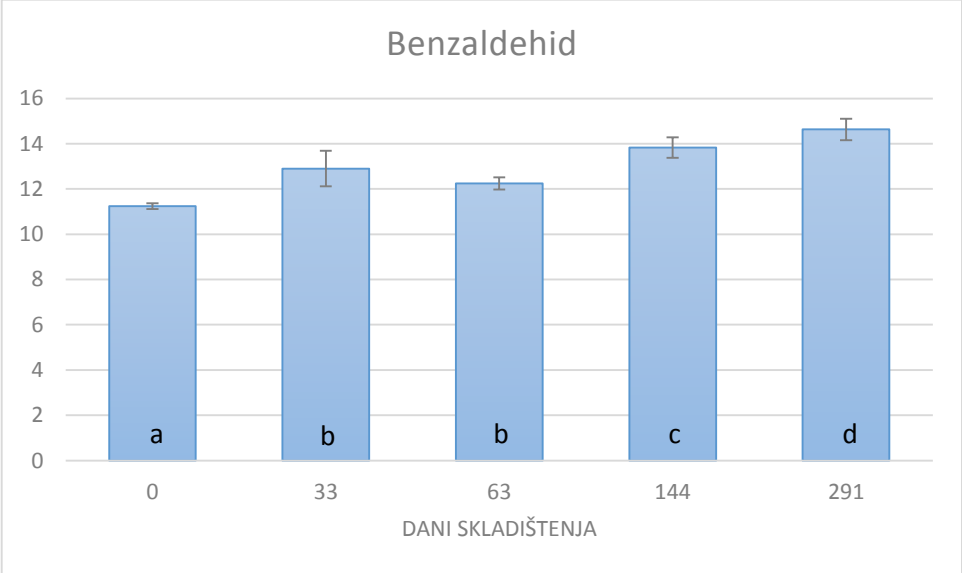
Slika 14. Promjene u koncentraciji heptanala ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja skuše (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

Rast koncentracije heptanala u osliću (Slika 12) zbivao se uglavnom kroz cijelo vrijeme skladištenja, dok je tek u 10. mjesecu intenzivnije porastao. Kod skuše (Slika 13) već su u svježem uzorku izmjerene vrlo visoke vrijednosti, koje su značajno porasle već u idućem mjesecu te stagnirale do 10. mjeseca, kada je zabilježen novi porast.

Heptanal nastaje oksidacijom n-9 mononezasićenih masnih kiselina te n–6 polinezasićenih masnih kiselina (Duflos i sur., 2006). Kao i u slučaju heksanala, njegova je koncentracija izravno ovisna o odjelu masti.

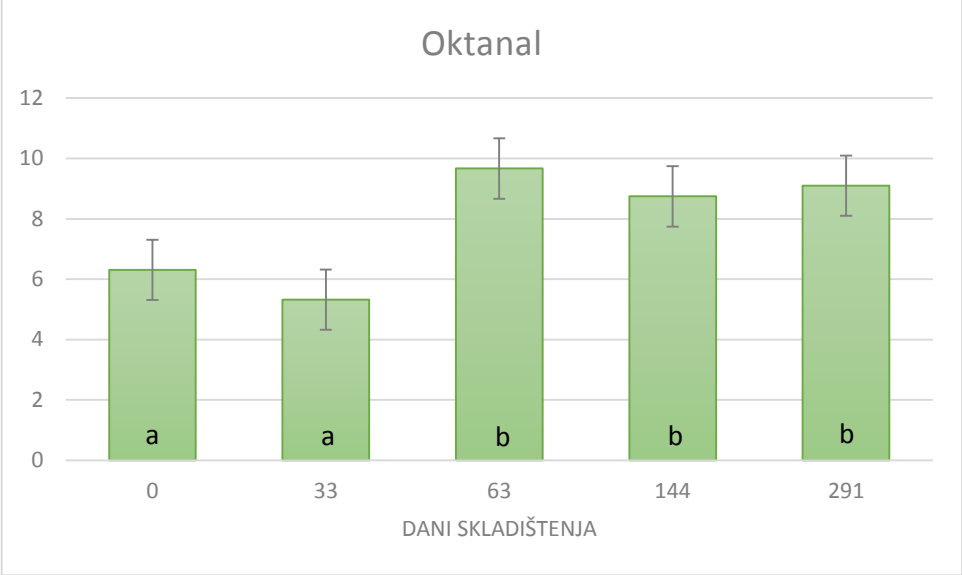


Slika 15. Promjene u koncentraciji benzaldehida ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja oslića (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

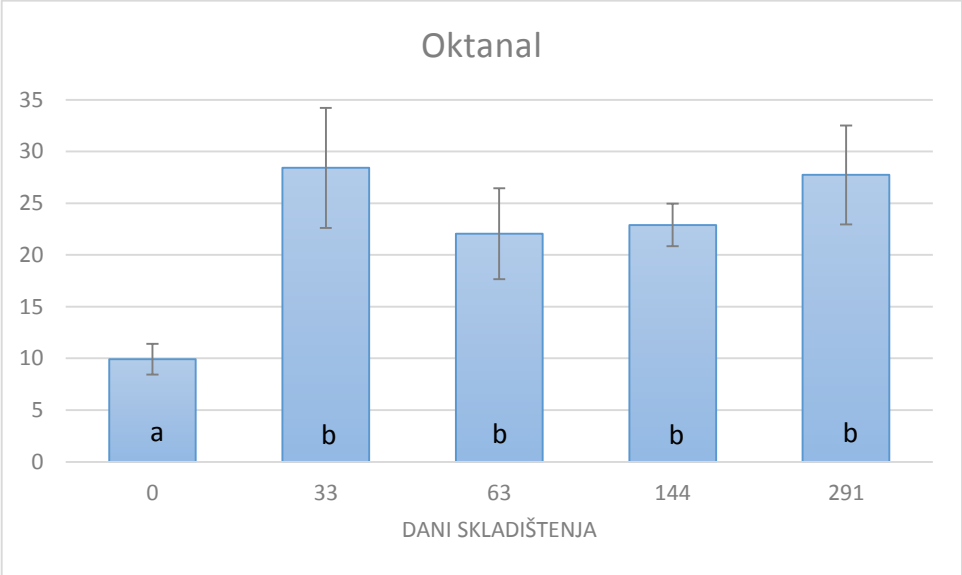


Slika 16. Promjene u koncentraciji benzaldehida ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja skuše (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

Benzaldehid, kao predstavnik aromatskih spojeva, u osliću (Slika 14) je pokazao značajan je porast u koncentraciji tek nakon 10 mjeseci, dok je kod skuše (Slika 15) nastupio već u prvom mjesecu skladištenja. Kroz 3. su mjesec zadržane slične vrijednosti, a porast je ponovno uslijedio u 6. mjesecu, kao i u 10. mjesecu skladištenja. U oba su se uzorka vrijednosti zadržale u približno istom rasponu, dok je inicijalno u osliću izmjerena nešto viša koncentracija (Tablice 2 i 3).



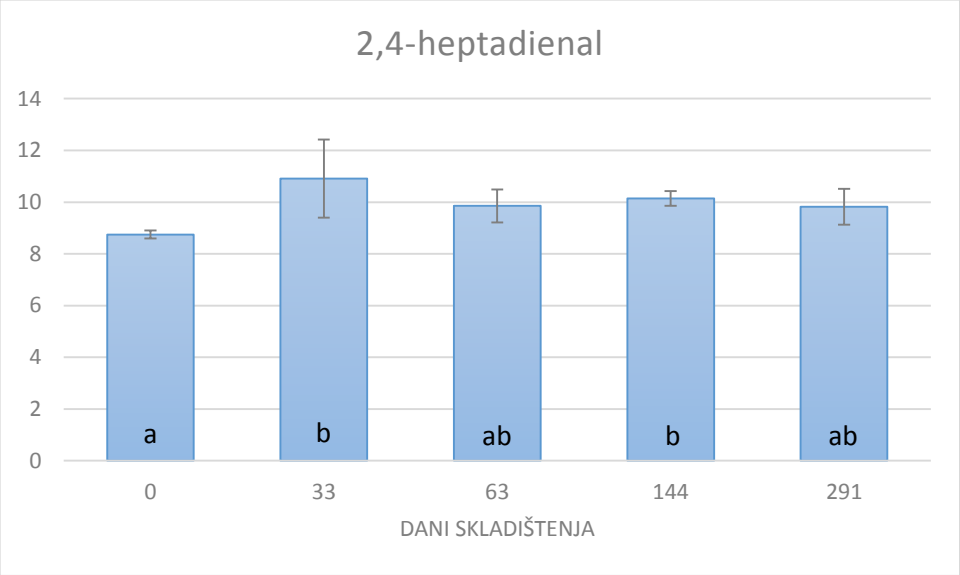
Slika 17. Promjene u koncentraciji oktanala (ngmL^{-1}) tijekom skladištenja oslića (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)



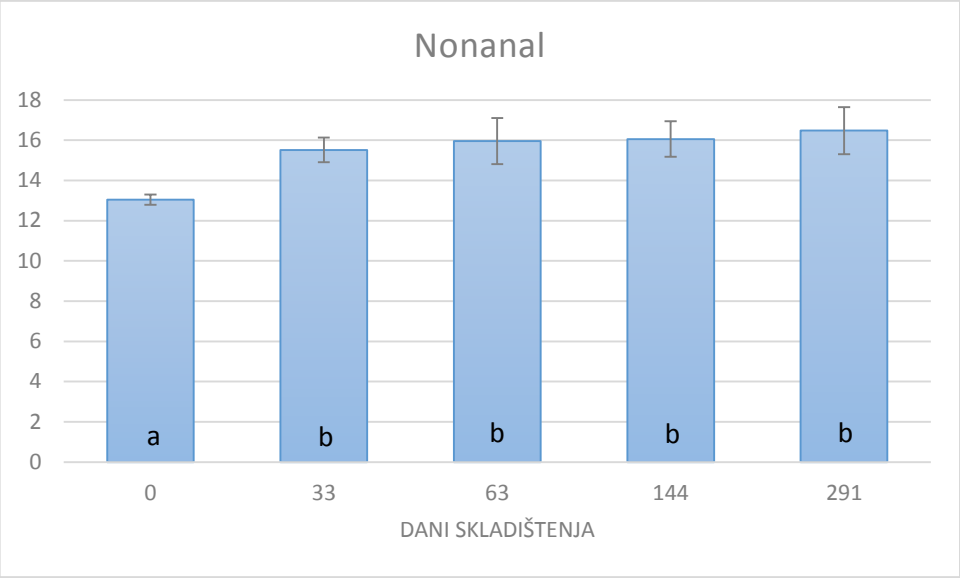
Slika 18. Promjene u koncentraciji oktanala (ngmL^{-1}) tijekom skladištenja skuše (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

Koncentracija oktanala u osliću (Slika 15) je porasla tek tijekom drugog mjeseca te se nije bitno promijenila do kraja eksperimenta. U skuši (Slika 16) je porast koncentracije nastupio prvog mjeseca skladištenja i zadržao se na sličnoj razini do kraja. U 10. su mjesecu kod skuše dobivene vrijednosti bile čak 4 puta više nego u osliću.

Kao i ostali aldehidi, oktanal se može formirati uslijed raspada lipidnih hidroperoksida i peroksi radikala (Giri i sur., 2010), a karakterizira ga vrlo niska razina detekcije (0,7 ppb) (Ólafsdóttir, 2005).



Slika 19. Promjene u koncentraciji 2,4-heptadienala ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja skuše (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

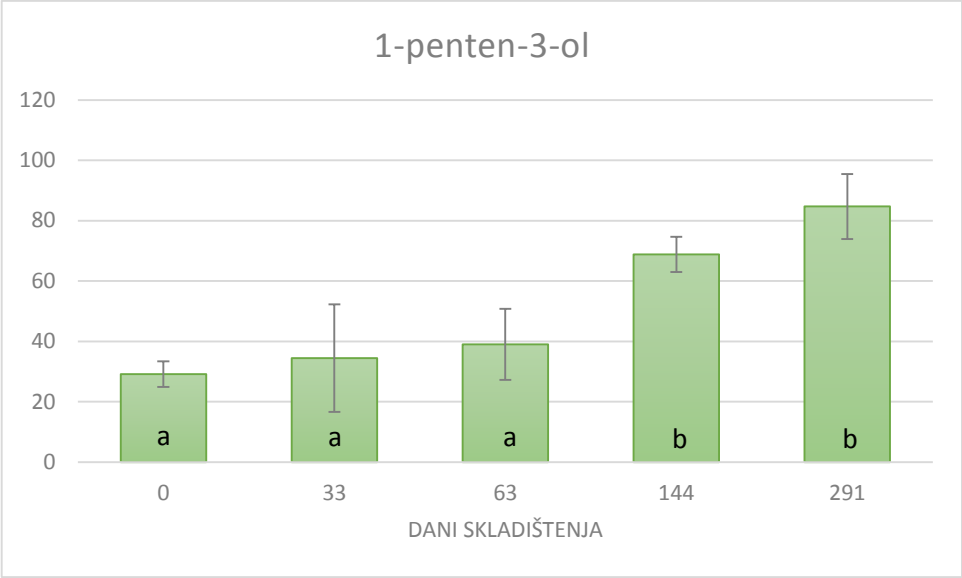


Slika 20. Promjene u koncentraciji nonanala (ngmL-1) tijekom skladištenja skuše (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

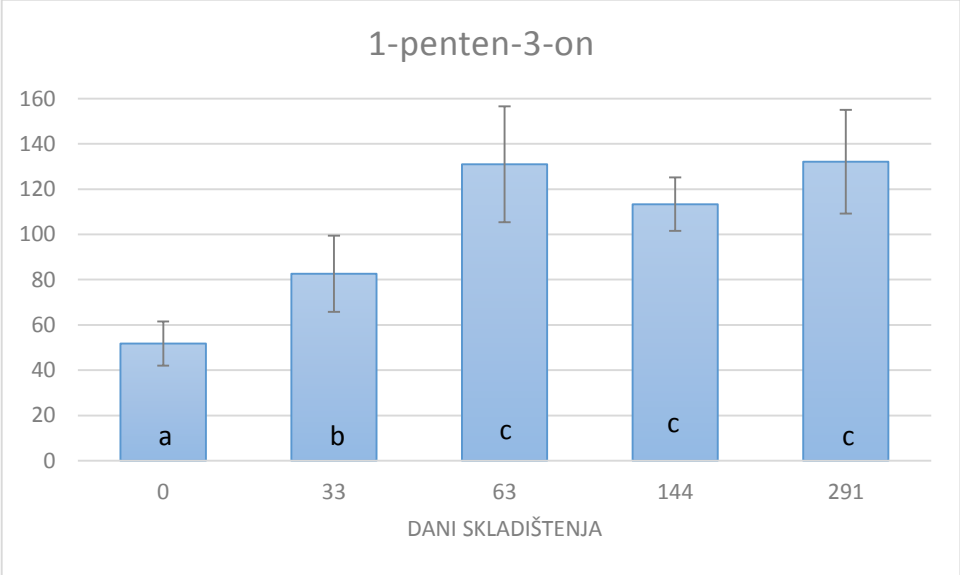
Aldehidi poput 2,4-heptadienala i nonanala samo su u uzorcima skuše značajnije mijenjali svoje koncentracije tijekom vremena, dok se postignute vrijednosti nisu znatno razlikovale između dvije vrste ribe. Pritom je porast kod 2,4-heptadienala (Slika 17) zamijećen u 1. mjesecu, te se nakon toga uglavnom snižavao, da bi najniža koncentracija postignuta u zadnjem mjesecu skladištenja.

2,4-heptadienal nastaje autooksidacijom EPA, a hidratacijom dvostruke veza i retroaldolnom kondenzacijom može se pregraditi u 2-pentenal (Kawai, 1996). Jedno od mogućih objašnjenja sniženja koncentracije u našem eksperimentu može biti upravo formiranje 2-pentenala. Uspoređujući vrijednosti s onima dobivenim u radu Iglesiasa i suradnika (2009), sličnost koja postoji je sniženje koncentracije nakon približno 60 dana te ponovni porast u razdoblju imeđu 120. i 266. dana skladištenja.

Kod nonanala (Slika 18) dolazi do porasta koncentracije u 1. mjesecu, a daljnjim skladištenjem vrijednosti nisu bitno promijenjene. Da koncentracija nonanala poraste unutar prvih mjesec dana pokazali su i Jónsdóttir i sur. (2007), gdje je do porasta došlo već unutar prvih 2 tjedna, a do 4. tjedna nije uslijedila bitna promjena u koncentraciji. Prema istim znanstvenicima, unatoč visokom pragu osjetljicosti mirisa, nonanal značajno doprinosi ukupnoj aromi.



Slika 21. Promjene u koncentraciji 1-penten-3-ola ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja oslića (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)



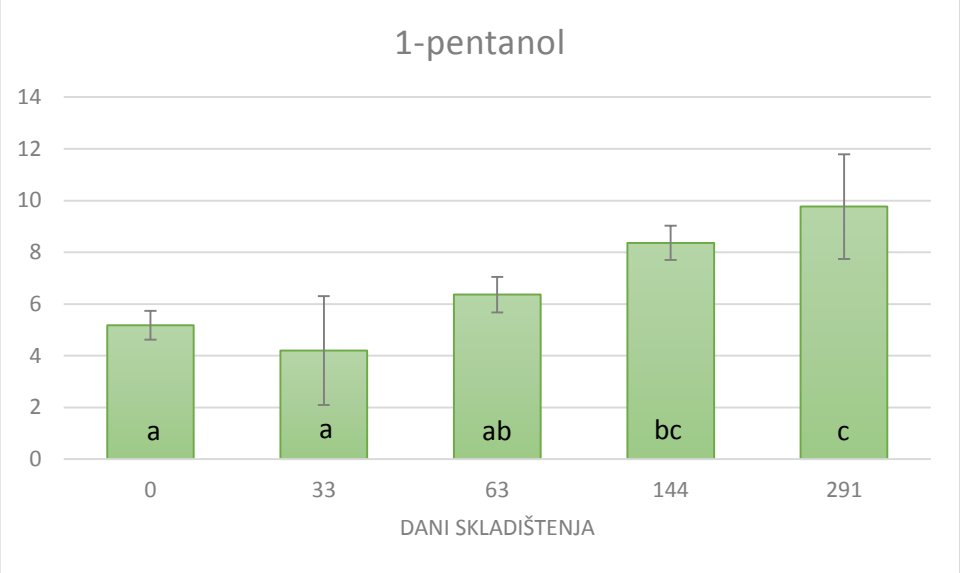
Slika 22. Promjene u koncentraciji 1-penten-3-ona ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja skuše (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

Porast u koncentraciji 1-penten-3-ola u osliću (Slika 19) detektiran je u 4. mjerenju te se vrijednost održala sličnom i u posljednjem mjesecu mjerenja.

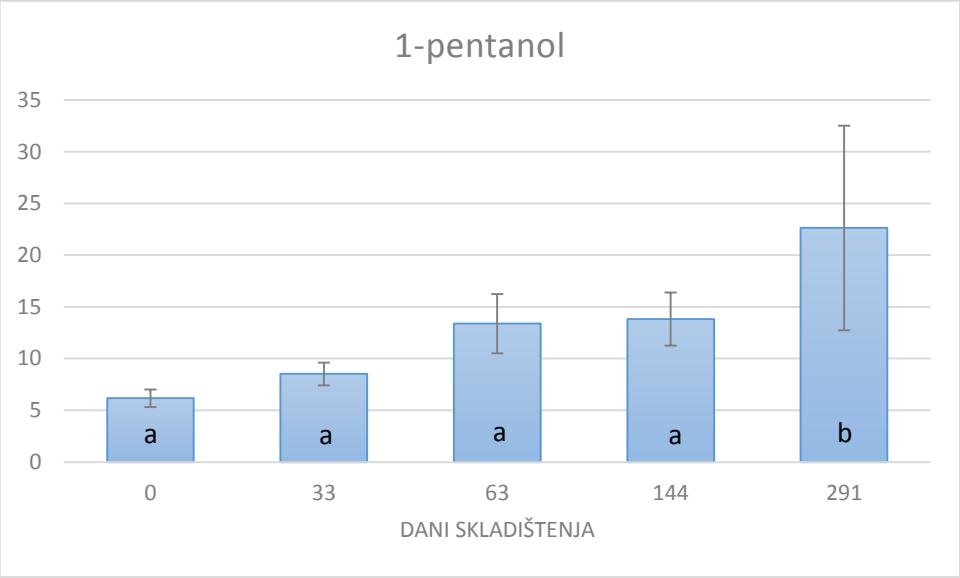
Već i početna koncentracija 1-penten-3-ona u svježoj skuši (Slika 20) bila je vrlo visoka, a značajno je porasla odmah tijekom prvog mjeseca skladištenja. Slijedio je daljnji porast u 2. mjesecu te su se slične vrijednosti zadržale do samoga kraja.

Iglesias i Medina (2008) i Iglesias i suradnici (2009) također ističu kako koncentracija ovog spoja u ribi doseže vrlo visoke vrijednosti. Kao i kod Iglesiasa i suradnika (2009), penten-3-ol je spoj koji u svježoj ribi doseže najviše vrijednosti u usporedbi s ostalim praćenim spojevima. Njegovu visoku koncentraciju objašnjavaju djelovanjem 15-lipoksigenaze na EPA, kao i 12-lipoksigenaze na arahidonsku kiselinu. Porast u koncentraciji 1-penten-3-ola evidentiran je i u drugim radovima (Eymard i sur., 2009, Alasalvar i sur., 2005, Iglesias i Medina, 2008).

Kawai (1996) ističe kako 1-penten-3-ol karakterizira opor miris nalik senfu sa specifičnim ukusom koji zaostaje u ustima, a budući da se može osjetiti već pri niskim koncentracijama, značajno doprinosi ukupnoj aromi ribe (Giri i sur., 2010).

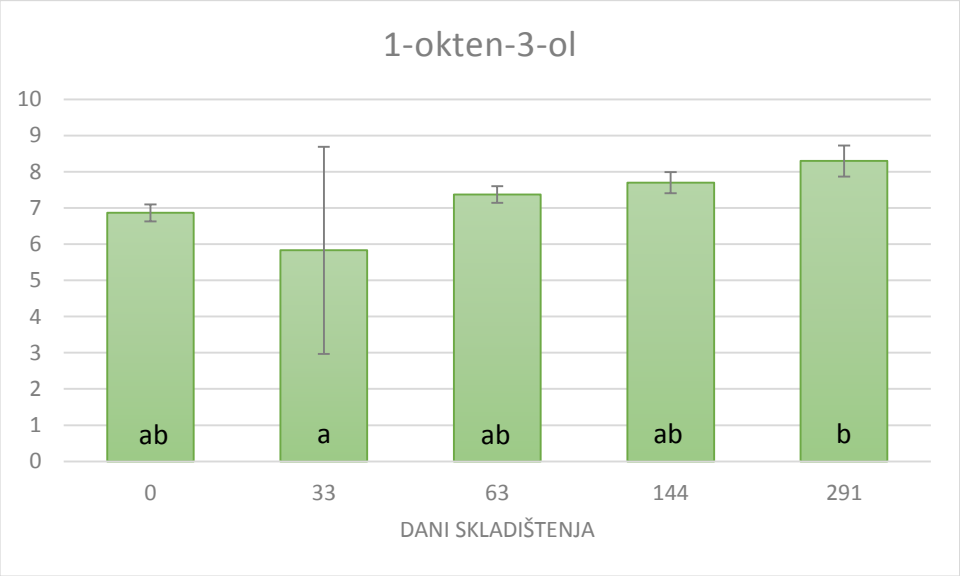


Slika 23. Promjene u koncentraciji 1-pentanola ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja oslića (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

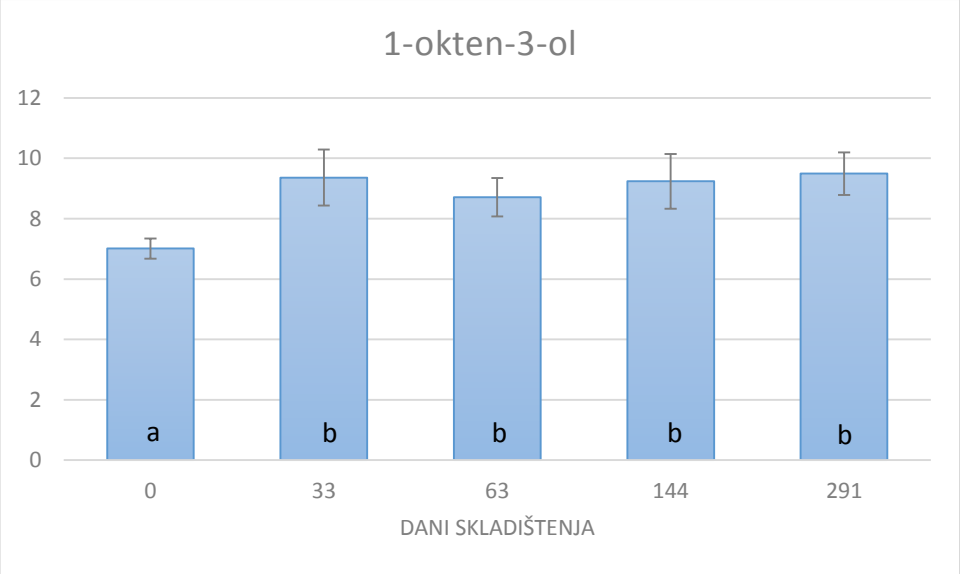


Slika 24. Promjene u koncentraciji 1-pentanola ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja skuše (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

U prvih 63 dana skladištenja oslića (Slika 21), nije došlo do značajne promjene u koncentraciji 1-pentanola. No, porast u koncentraciji dogodio se nakon drugog mjerenja, a nastavljen je rast i u 10. mjesecu. Kod skuše (Slika 22) je jedina razlika bila u tome što su vrijednosti slične početnima zadržane sve do zadnjeg mjeseca, a tada je uslijedio nagli porast. Na kraju skladištenja dosegnuta je i visoka vrijednost koncentracije, što su pokazali i Duflos i suradnici (2006).



Slika 25. Promjene u koncentraciji 1-okten-3-ola ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja oslića (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)



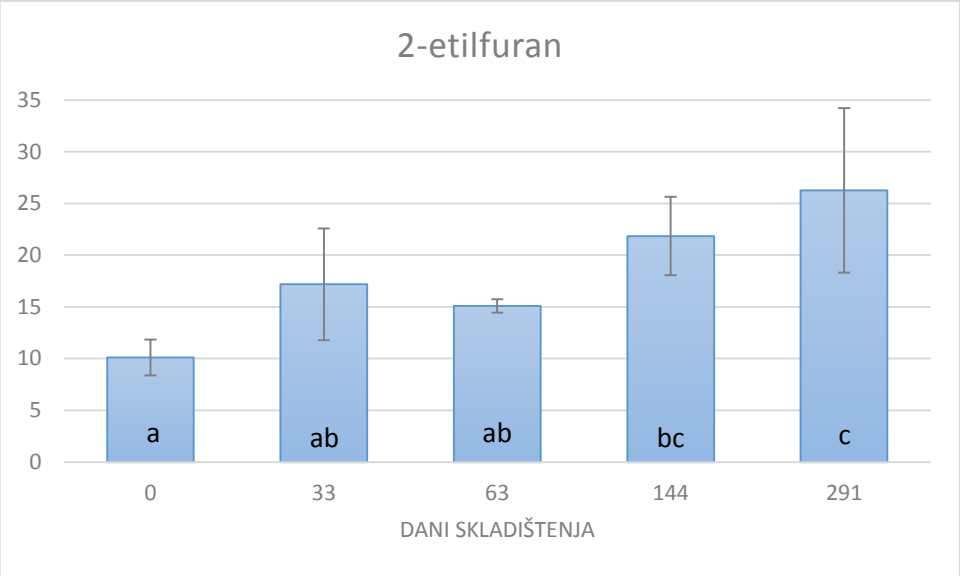
Slika 26. Promjene u koncentraciji 1-okten-3-ola ($ngmL^{-1}$) tijekom skladištenja skuše(različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

Koncentracija 1-okten-3-ola izmjerena u svježem uzorku oslića (Slika 23) lagano je rasla tijekom skladištenja, no značajan je porast uslijedio tek u 10. mjesecu.

U skuši je rast zabilježen u 1. mjesecu, a daljnjim skladištenjem vrijednosti nisu bitno promijenjene. Pri tome se 1-okten-3-ol u skuši ponašao na isti način kao što su i nonanal te oktanal.

Oko 60. dana skladištenja skuše, došlo je do malog pada koncentracije, a uslijedio je rast do kraja skladištenja. Isto su pokazali i Igleasias i suradnici (2009).

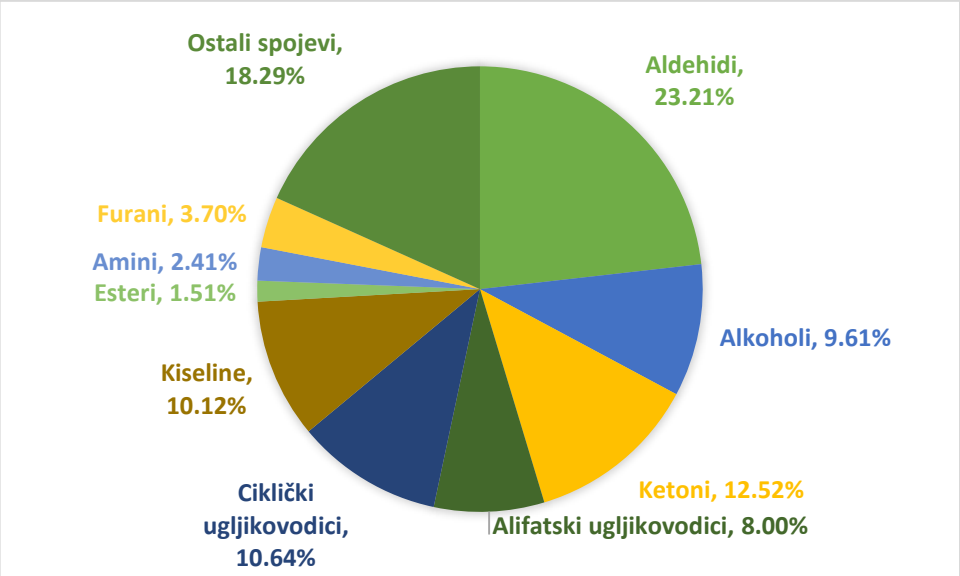
1-okten-3-ol nastaje oksidacijom arahidonske kiseline djelovanjem 12-lipoksigenaze (Duflos i sur., 2006). Iglesias i Medina (2008) ističu kako značajno utječe na razvoj neugodnih mirisa.



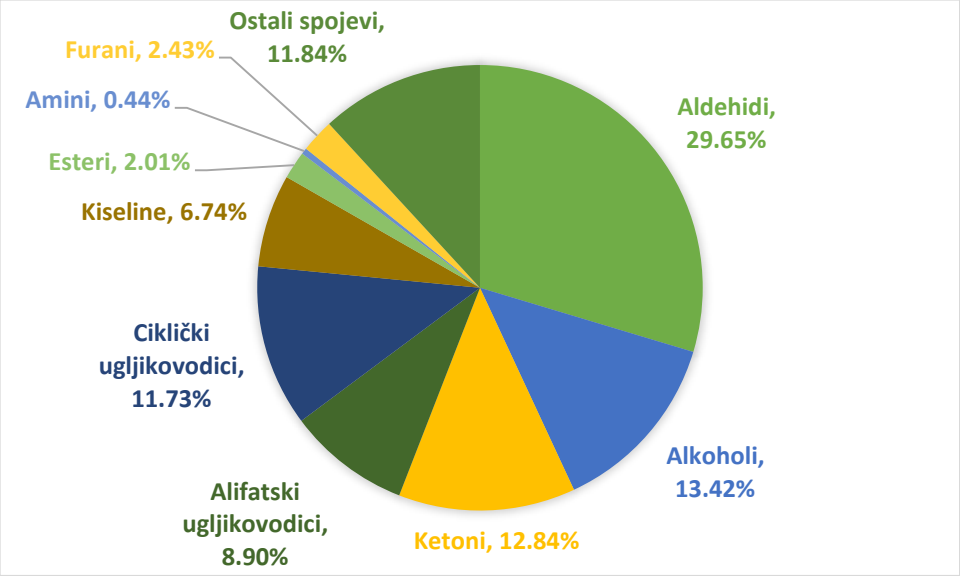
Slika 27. Promjene u koncentraciji 2-etilfurana (ngmL-1) tijekom skladištenja skuše (različita slova u stupcima označavaju statistički različite koncentracije spoja)

Koncentracija 2-etil-furana se značajno promijenila samo u uzorku skuše (Slika 25), a veći je porast zabilježen tijekom 4. mjerenja te je dodatno uznapredovao i tijekom posljednjeg, 5. mjerenja. Iglesias i sur. (2009) njegovu formaciju objašnjavaju time što se 12-hidroperoksid linoleata (18:3n-3), 14-hydroperoksid EPA (20:5n-3) i 16-hidroperoksid DHA mogu podvrgnuti beta raspadu te proizvesti konjugirani dien radikal koji reagira s kisikom stvarajući pritom vinil hidroperoksid. Raspad vinil hidroperoksida, na način da dođe do gubitka hidroksi radikala, dovodi do nastanka alkoksi radikala koji se podvrgava ciklizaciji tvoreći 2-etilfuran.

U ovom radu osim što je identificirano i kvantificirano 14 ciljnih spojeva, isto je napravljeno i sa svim spojevima koji su bili prisutni tijekom 10 mjeseci provođenja eksperimenta. Nakon što su svrstani u grupe spojeva (aldehidi, ketoni, alkoholi, alifatski i ciklički ugljikovodici, kiseline esteri i ostali spojevi) omogućeno je praćenje promjena njihovih udjela tijekom skladištenja.

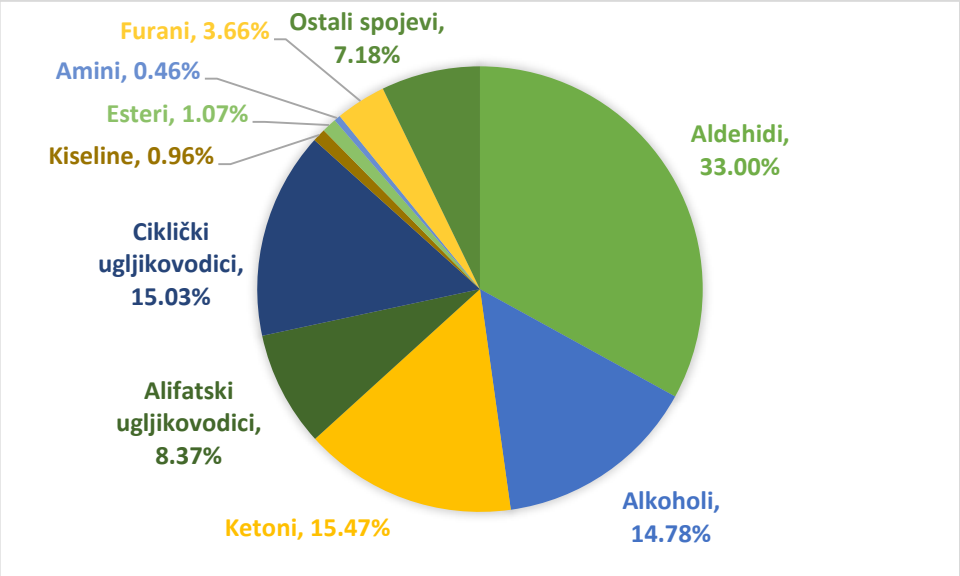


Slika 28. Udjeli pojedinih grupa spojeva u svježem osliću

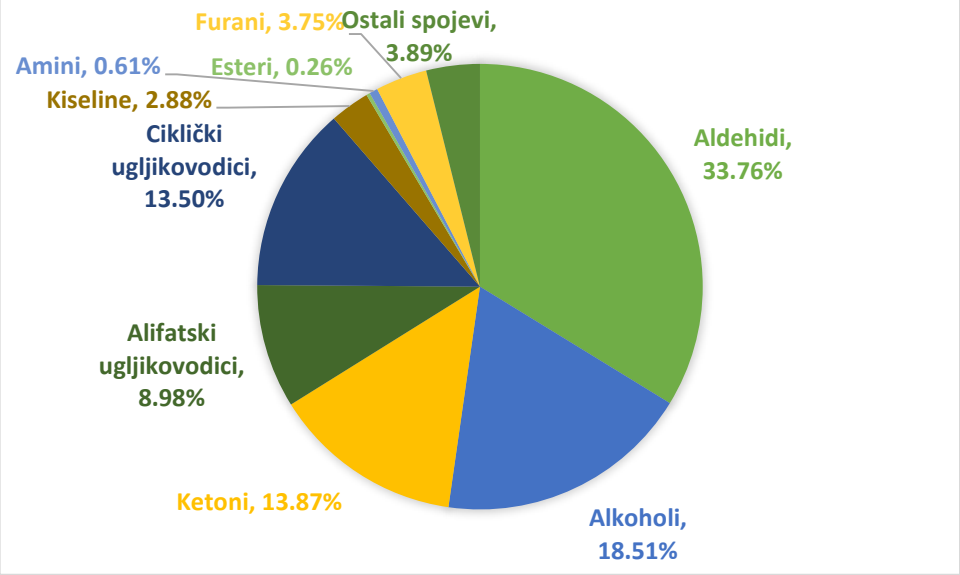


Slika 29. Udjeli pojedinih grupa spojeva nakon skladištenja oslića u trajanju od 291 dan

Udio pojedinih grupa spojeva mijenjao se tijekom skladištenja. Ono što razlikuje svježi oslić (Slika 26) od oslića koji je bio skladišten 291 dan (Slika 27) jest prvenstveno promjena udjela aldehida, alkohola, kiselina i amina. Pritom je došlo do porasta udjela kod aldehida za 6,4 % i kod alkohola za 3,8 %. Udio kiselina i amina se snizio za 3,4 %, odnosno 2,0 %.



Slika 30. Udjeli pojedinih grupa spojeva u svježoj skuši



Slika 31. Udjeli pojedinih grupa spojeva nakon skladištenja skuše u trajanju od 291 dan

Za razliku od oslića, u skuši su promjene u udjelima glavnih skupina spojeva bile još manje izražene. Najveća promjena se zbila u alkoholima koji su porasli za 3,8 %.

Prema Ólafsdóttiru (2005) senzorski neprihvatljivi fileti bakalara sadrže najviši udio ketona (33 %), slijede alkoholi s 15 %, a udio aldehida iznosi 3 %.

Od posebnog su značaja spojevi koji se pojavljuju i u svježoj ribi i nakon 10 mjeseci skladištenja. Budući da do oksidacije u većoj mjeri dolazi u kasnijim mjesecima skladištenja, ti bi se spojevi mogli pokazati kao potencijalni indikatori oksidativnih promjena tijekom zamrzavanja. Poznavanje tih spojeva u kontekstu parametara kvalitete određene ribe može biti predmet za buduća istraživanja u kojima je moguća korelaciju s ostalim dostupnim metodama za kontrolu kvalitete ribe.

Tablica 4. Popis spojeva koji su prisutni u svježem osliću i nakon 10 mjeseci skladištenja (masno otisnuti spojevi nisu kvantitativno obrađeni u ovome radu)

ALDEHIDI	**KETONI**	**ALKOHOLI**	**ALIFATSKI UGLJIKOVODICI**	**CIKLIČKI UGLJIKOVODICI**
Heksanal	2-undekanon	1-penten-3-ol	**1-penten**	**1,3-ciklooktadien**
Heptanal	**3,5-oktadien-2-on**	1-okten-3-ol	**1,1-oksibis-oktan**	**Ciklooktan**
Benzaldehid	**2,3-oktandion**	**1-butoksi-2-propanol**	**2-tetradeken**	**Ciklododekan**
Oktanal	**2-metil-3-pentanon**	**2-etil-heksanol**	**Heptadekan**	**1,2-diklorobenzen**
Nonanal	**6,10-dimetil-5,9-undekadien-2-on**	**1-oktanol**	**1-nonadeken**	**Tricikloheptan**
2,4-heptadienal		**2-penten-1-ol**	**3,7-dimetil-1,6-oktadien**	**OSTALI SPOJEVI**
Propanal	**ESTERI**	**FURANI**		
Tetradekanal			**KISELINE**	**Metoksi-fenil-oksim**
2-(fenilmetilen)-oktanal	**Izopropil miristat**	2-etilfuran		**Mentol**
	Butilizocijanat	**AMINI**	**1-metiletil ester dodekanska kiselina**	**2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-oksopropil) fenol**
Cis-4-heptenal				
Dekanal		**Trimetilamin**	**Bis(2-metilpropil) ester-1,2-benzen dikarboksilna kiselina**	
				5,6,7-trimetoksi-1-indanon
				2-fluoro-acetamid

Tablica 5. Popis spojeva koji su prisutni u svježoj skuši i nakon 10 mjeseci skladištenja (masno otisnuti spojevi nisu kvantitativno obrađeni u ovome radu)

ALDEHIDI	KETONI	ALKOHOLI	ALIFATSKI UGLJIKOVODICI	CIKLIČKI UGLJIKOVODICI
Heksanal	2-undekanon	1-penten-3-ol	**1-penten**	**1,3-ciklooktadien**
Heptanal	2-nonanon	1-okten-3-ol	**1,4-oktadien**	**Ciklooktan**
benzaldehid	**Acetofenon**	Heptanol	**3-oktin**	**1,2-dikloro-benzen**
Oktanal	**3,5-oktadien-2-on**	**2-penten-1-ol**	**2-pentadeken-4-in**	**Tricikloheptan**
Nonanal	**3-deken-2-on**	**1-nonanol**	**2,6,10,14-tetrametil-pentadekan**	**1,2,3,3a,4,6a-heksahidro-pentalen**
2,4-heptadienal	**2,3-oktandion**	**Benzenmetanol**		
Cis-4-heptenal	**5-heptildihidro-2(3H)-furanon**	**FURANI**	**2-(1,2-epoksicikloheksil)-1-penten**	**1-hidroksimetil-2-vinilciklopentan**
Propanal				
4-etil-benzaldehid	**1-(3-butiloksiranil)-etanon**	2-etil-furan		**1,2,4,5-tetraetil-cikloheksan**
Dekanal		**AMINI**	**OSTALI SPOJEVI**	
				1,2-dimetil-cikloheksen
		Trimetilamin	**2-fluoro-acetamid**	
			Metoksi-fenil-oksim	

5.0 ZAKLJUČCI

I. Na osnovi porasta koncentracije karakterističnih spojeva pokazatelja kvarenja može se zaključiti da je i u osliću i u skuši došlo do oksidacije masnih kiselina. U osliću je značajniji porast zapažen između 2. i 5. mjeseca skladištenja, a u skuši je već 1. mjeseca skladištenja došlo do porasta koncentracije glavnine spojeva: 1-penten-3-ola, heksanala, heptanala, benzaldehida, 1-okten-3-ola, oktanala, 2,4-heptadienala, oktanala i nonanala.

II. U uzorku skuše su koncentracije hlapljivih spojeva u kasnijim mjesecima skladištenja značajnije porasle u odnosu na svježi uzorak, stoga se zaključuje da je stupanj oksidacije masnih kiselina u skuši veći nego u osliću, iako uzorak oslića karakterizira nešto viši udio masti. Potencijalni razlog tome je razlika u sastavu masnih kiselina.

III. Zbog linearnog porasta koncentracije tijekom vremena, 2-butanon, heksanal, heptanal i benzaldehid su se pokazali kao pogodni spojevi za praćenje oksidacije masnih kiselina u skuši.

IV. Udjeli glavnih skupina spojeva nisu se bitno mijenjali tijekom vremena. Kod oba je uzorka ribe najveća razlika zabilježena u udjelu alkohola, i to porast za 3,8 %. Odsustvo značajnijih varijacija upućuje na blage oksidacijske promjene.

6.0 LITERATURA

Anonymous 1 (n.d.) Oslić, <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=45702>. Pristupljeno 10. kolovoza 2016.

Anonymous 2 (n.d.) Skuša, <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=45702>. Pristupljeno 11. kolovoza 2016.

Anonymous 3 (2016) Gas chromatography, <http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/gas_chromatography/mass_spectrometry.html>. Pristupljeno 9. kolovoza 2016.

Anonymous 4 (2015) Low-Cost Technique to Monitor Organophosphate Pesticides in Copeland Creek, <https://www.sonoma.edu/waters/projects/water_quality/organophosphate.html>. Pristupljeno 21. kolovoza 2016.

Anonymous 5 (n.d.) Scomber Scombrus, <http://www.hafsasamac.com/en/produit-categorie.php?categorie=4>. Pristupljeno 21. kolovoza 2016.

Agustinelli, S. P., Yeannes, M. I. (2015) Effect of Frozen Storage on Biochemical Changes and Fatty Acid Composition of Mackerel (*Scomber japonicus*) Muscle. *JFR.* **4**, 135-147. <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/jfr/article/view/41336>. Pristupljeno 12. kolovoza 2016.

Aro, T., Tahvonen, R., Koskinen, L., Kallio, H. (2003) Volatile compounds of Baltic herring analysed by dynamic headspace sampling–gas chromatography–mass spectrometry. *Eur. Food. Res. Technol*. **216**, 483–488. <https://www.researchgate.net/publication/227338480_Volatile_compounds_of_Baltic_herring_analysed_by_dynamic_headspace_sampling-gas_chromatography-mass_spectrometry>. Pristupljeno 23. kolovoza 2016.

Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finoia, M., Brambilla, G., Marino, G. (2007) Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **263**, 52-60. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848606006387>. Pristupljeno 8. kolovoza 2016.

Boran, G., Karaçam, H. (2011) Seasonal Changes in Proximate Composition of Some Fish Species from the Black Sea. *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.* **11**, ISSN: 1303-2712, 1-5. doi: 10.4194/trjfas.2011.0101.

Cohen, D. M., Inada, T., Iwamoto T., Scialabba N. (1990) FAO species catalogue. Vol. 10. Gadiform fishes of the world (Order Gadiformes). An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date [online], FAO, Rome, str 336-345, <http://www.fao.org/3/a-t0243e.pdf>. Pristupljeno 11. kolovoza 2016.

Collette, B. B., Nauen, C. E. (1983) FAO species catalogue. Vol.2. Scombrids of the world. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date [online], FAO, Rome, <http://www.fao.org/docrep/009/t0243e/t0243e00.htm>. Pristupljeno 11. kolovoza 2016.

Cvrtila, Ž., Kozačinski, L. (2006, prosinac) Kemijski sastav mesa riba. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* **7**, 365-370. <http://hrcak.srce.hr/22462>. Pristupljeno 12. kolovoza 2016.

FAO/WHO (2006) *Combined Compendium of Food Addiitive Specifications*, Food and Agriculture Organization of the United Nations i World Health Organization, Rome, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0691e/a0691e.pdf>. Pristupljeno 21. kolovoza 2016.

FAO (2016a) Species Fact Sheets – *Merluccius merluccius,* FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/fishery/species/2238/en>. Pristupljeno 11. kolovoza 2016.

FAO (2016b) Species Fact Sheets – *Scomber scombrus*, FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/fishery/species/2473/en>. Pristupljeno 11. kolovoza 2016.

FAO (2016c) Utilization and trade, FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/fishery/utilization_trade/en>. Pristupljeno 10. kolovoza 2016.

Frankel, E. N. (2005) Lipid Oxidation, 2. izd., The Oily Press, Bridgewater, UK, str. 338-345.

Giri, A., Osaka, K., Ohshima, T. (2010) Identification and characterisation of headspace volatiles of fish *miso*, a Japanese fish meat based fermented paste, with special emphasis on effect of fish species and meat washing. *Food Chem*. **120**, 621–631. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609012291>. Pristupljeno 23. kolovoza 2016.

Grob, R. L., Barry, E. F. (2004) Gas Chromatography, 4. izd., John Wiley & Sons, Inc, New Yersey, str. 26, 574-575.

Guizani, SEO, Moujahed, N. (2015, 10. lipnja) Seasonal Variation of Chemical and Fatty Acids Composition in Atlantic Mackerel from the Tunisian Northern-East Coast. *J. Food. Process. Technol*. **6**, ISSN: 2157-7110 JFPT, 487. doi: 10.4172/2157-7110.1000487.

Huss, H. H. (1988) *Fresh Fish Quality And Quality Changes* [online], FAO, Rome, str. 61, <https://ia802607.us.archive.org/9/items/freshfishquality034842mbp/freshfishquality034842mbp.pdf>. Pristupljeno 9. kolovoza 2016.

Huss, H. H. (1995). *Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical Paper* [online], FAO, Rome. <http://www.fao.org/docrep/V7180E/V7180E06.htm>. Pristupljeno 10. kolovoza 2016.

Iglesias, J., Medina, I. (2008) Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *J. Chromatogr. A.* **1192**, 9-16. < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308004998>. Pristupljeno 18. kolovoza 2016.

Iglesias, J., Medina, I., Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Musci, M. (2009) Study of the volatile compounds useful for the characterisation of fresh and frozen-thawed cultured gilthead sea bream fish by solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* **115**, 1473-1478. < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460900137X>. Pristupljeno 19. kolovoza 2016.

Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., Chanie, E., Haugen, J.E. (2008) Volatile compounds suitable for rapid detection as quality indicators of cold smoked salmon (*Salmo salar*). *Food Chem*. **109**, 184-195. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607012629>. Pristupljeno 10. kolovoza 2016.

Karahmet, E., Vileš, A., Muhamedagić, S., Omanović, H., Toroman, A., Omanović, N. (2013) Usporedno ispitivanje senzornih svojstava tri vrste pastrmke čuvanih u istim uslovima. *Veterinaria* **62**, 93-103. < https://www.researchgate.net/publication/270822872_Karahmet_STRUCNI_RAD_-_Professional_Paper_UPOREDNO_ISPITIVANJE_SENZORNIH_SVOJSTAVA_TRI_VRSTE_PASTRMKE_CUVANIH_U_ISTIM_USLOVIMA_THE_COMPARATIVE_ASSESSMENT_OF_SENSORIAL_FEATURES_OF_THREE_SALMONIDAE_SPEC>. Pristupljeno 16. kolovoza 2016.

Katsuya, F., Sachiyo, I., Hitoshi, Y., Takuya, M., Yoshimitu, N., Kenichi, E., Mitsuya, S. (2002) Identification of distinctive volatile compounds in fish sauce. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5412–5416. < http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf020405y>. Pristupljeno 23. kolovoza 2016.

Kawai, T. (1996) Fish flavour. *Crit. Rev. Food. Sci.* **36**, 257–298. < http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408399609527725?journalCode=bfsn20>. Pristupljeno 23. kolovoza 2016.

Korta, M., García, D., Santurtún, M., Goikoetxea, N., Andonegi, E., Murua, H., Álvarez, P., Cerviño, S., Castro, J., Murillas, A. (2015) European hake (Merluccius merluccius) in the Northeast Atlantic Ocean. U: *Hakes: Biology and Exploitation* [online] (Arancibia, H.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, str. 1-37, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118568262.ch1/summary>. Pristupljeno 11. kolovoza 2016.

Küçükgülmez, A, Çelik, M., Ersoy, B., Yanar, Y., Sangün, L. (2007) Seasonal variations in proximate and fatty acid compositions of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and lizardfish (*Saurida undosquamis*), from the northeastern Mediterranean Sea. *J. Muscle Foods*. **19**, 352-361. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf026033a>. Pristupljeno 12. kolovoza 2016.

Levaj, B., Repajić, M. (n.d.) Optimiranje metode za određivanje aromatičnog profila višnje maraske. <http://www.ipa-marasca.com/downloads/dat30.pdf>. Pristupljeno 9. kolovoza 2016

Moradi, Y., Bakar, J., Motalebi, A. A., Syed Muhamad, S. H., Che Man, Y. (2011) A Review on Fish Lipid: Composition and Changes During Cooking Methods. *J Aquat Food Prod. T.* **20**, 379-390. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10498850.2011.576449?journalCode=wafp20>. Pristupljeno 11.kolovoza 2016.

Murray, J., Burt, J. R. (2001) The composition of fish. FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x5916e01.htm>. Pristupljeno 11. kolovoza 2016.

Ocańo-Higuera V. M., Marquez-Ríos, E., Canizales-Dávila, M., Castillo-Yáñez, F. J., Pacheco-Aguilar, Lugo-Sánchez, M. E., García-Orozco, K. D., Graciano-Verdugo, A. Z. (2009) Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. *Food Chem*. **116**, 933-938. <https://www.researchgate.net/publication/229200515_Post-mortem_changes_in_cazon_fish_stored_in_ice >. Pristupljeno 10. Kolovoza 2016.

Okeyo, G. O. (2009), Development of a Quality Index Method (QIM) Scheme to Evaluate Freshness of Ice Stored Lake Victoria Nile Perch (*Lates niloticus*), diplomski rad, Food Science, Egerton University. < http://ir-library.egerton.ac.ke/jspui/bitstream/123456789/117/1/DEVELOPMENT%20OF%20A%20QUALITY%20INDEX%20METHOD%20(QIM)%20SCHEME%20TO%20EVALUATE.pdf>. Pristupljeno 8. kolovoza 2016.

Ólafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I. M., Henehan, G., Nielsen, J., Nilsen, H. (1997) Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Sci. Tech.* **8,** 258-265. < https://www.researchgate.net/publication/221999919_Method_to_evaluate_fish_freshness_in_research_and_industry>. Pristupljeno 5. kolovoza 2016.

Ólafsdóttir. G. (2015), Volatile compounds as quality indicators in chilled fish: Evaluation of microbial metabolites by an electronic nose, doktorski rad, Faculty of Science, University of Iceland. <http://skemman.is/stream/get/1946/11706/29427/1/Volatile_compounds_as_quality_indicators_of_fish_GO2005.pdf>. Pristupljeno 8. kolovoza 2016.

Orak, H. H., Kayısoglu, S. (2008) Quality changes in whole, gutted and filleted three fish species (*Gadus euxinus, Mugil Cephalus, Engraulis Encrasicholus*) at frozen storage period (-26°C). *Acta Sci. Pol*. **7**, 15-28. <jml2012.indexcopernicus.com/fulltxt.php?ICID=882262>. Pristupljeno 10. kolovoza 2016.

Poli, B. M., Parisi, G., Scappini, F., Zampacavallo, G. (2005) Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquacult. Int.* **13,** 29-59. < http://link.springer.com/article/10.1007/s10499-004-9035-1>. Pristupljeno 9. kolovoza 2016.

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

Skjervold, P. A., Fjæra, S. O., Østby, P. B., Einen, O. (2001) Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquacult.* **192**, 265-280. < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848600004476>. Pristupljeno 12 kolovoza 2016.

Swanson, D., Block, R., Mousa, S. A. (2012, siječanj) Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Adv Nutr* [online]. <http://advances.nutrition.org/content/3/1/1.full >. Pristupljeno 13. kolovoza 2016.

Šimat, V., Maršić-Lučić, J., Bogdanović, T., Dokoza, M. (2009, prosinac) Oksidacija masti u ribi i ribljim proizvodima. *Meso : prvi hrvatski časopis o mesu* **11**, 345-351. <https://www.researchgate.net/publication/43811367_Oksidacija_masti_u_ribi_i_ribljim_proizvodima>. Pristupljeno 9. kolovoza 2016.

Toldrá, F., Reig, M. (2011) The stability and shelf life of seafood. U: *Food and Beverage Stability and Shelf Life* [online] (Kilcast, D., Subramaniam, P.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 779-792, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845697013500281>. Pristupljeno 10. kolovoza 2016.

Ungaro, N., Vrgoč, N., Mannini, P. (2001*) The Biology and Stock Assessment of Merluccius merluccius (L.) in the Adriatic Sea: an Historical Review by Geographical Management Units,* Food and Agriculture Organization of the United Nations i Italian Ministry of Agriculture and Forestry Policies, Tunis, <http://www.faoadriamed.org/pdf/publications/OP-03.pdf>. Pristupljeno 11. kolovoza 2016.

Vidaček, S. (2013) Tehnologija ribe, Interna skripta, Sveučilište Zagrebu: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Vrablík, M., Prusíková, M., Šnejdrlová, M., Zlatohlávek, L. (2009) Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease Risk: Do We Understand the Relationship? *Physiol. Res*. **58**, 19-26. < http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/58%20Suppl%201/58_S19.pdf>. Pristupljeno 16. kolovoza 2016.