

Utjecaj tretmana ozonom na parametre kvalitete srdele tijekom skladištenja u rashlađenom stanju

Kovač, Gloria

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:380526>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Gloria Kovač

**UTJECAJ TRETMANA OZONOM
NA PARAMETRE KVALITETE
SRDELE TIJEKOM
SKLADIŠTENJA U
RASHLAĐENOM 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 doc. dr. sc. Tibora Jančija.

Veliko hvala dragom mentoru doc. dr. sc. Tiboru Jančiju na usmjeravanju prilikom provedbe istraživanja, kao i na povjerenju, nesebično prenesenom znanju i motivaciji.

Posebno hvala mami, tati i seki bez čije podrške bi ovo bilo puno teže. Hvala što ste uvijek vjerovali u mene i gurali me naprijed. Ovo je za Vas!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

UTJECAJ TRETMANA OZONOM NA PARAMETRE KVALITETE SRDELE TIJEKOM SKLADIŠTENJA U RASHLAĐENOM STANJU

*Gloria Kovač, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058215703*

Sažetak:

Provedeno je istraživanje utjecaja tretmana ozonom na parametre kvalitete srdele. Testirano je 10 uzoraka od kojih je jedan bio kontrola, a ostali su tretirani s 1, 3 ili 5 mg/L ozona uz vrijeme kontakta ozona i srdele od 5, 10 ili 15 minuta. Linearni QIM model pokazao je da najduži rok trajanja ima uzorak tretiran s 1 mg/L ozona i vremenom kontakta od 5 minuta pri čemu je rok trajanja 37,2 sata duži u usporedbi s kontrolnim uzorkom srdele. Tretman ozonom nije pokazao značajan utjecaj na koncentraciju TVBN, već dolazi do povećanja proporcionalno vremenu skladištenja. Relativno nisku koncentraciju TVBN imao je uzorak tretiran s 1 mg/L ozona i vremenom kontakta od 5 minuta, a navedeno je u skladu s rezultatima QIM modela. Statistički značajan utjecaj nije primijećen ni kod stupnja proteolize. Ozon nije uzrokovao veću oksidaciju masti niti je pokazao pravilan trend kod djelovanja na oksidaciju masti te se zato pokazao kao obećavajući tretman za produljenje trajnosti srdele.

Ključne riječi: srdela, ozon, kvarenje, rok trajanja, parametri kvalitete

Rad sadrži: 45 stranica, 4 slike, 12 tablica, 67 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Tibor Janči

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Josip Ćurko (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Tibor Janči (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Nives Marušić Radovčić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Davor Valinger (zamjenski član)

Datum obrane: 26. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

THE EFFECT OF OZONE TREATMENT ON SARDINE QUALITY PARAMETERS DURING REFRIGERATED STORAGE

Gloria Kovač, univ. bacc. ing. techn. aliment
0058215703

Abstract:

A study was conducted on the effects of ozone treatment on the quality parameters of sardines. 10 samples were tested, one of which was the control and the others were treated with 1, 3 or 5 mg/L ozone at a contact time between ozone and sardine of 5, 10 or 15 minutes. The linear QIM model showed that the sample treated with 1 mg/L ozone and a contact time of 5 minutes had the longest shelf life, with a shelf life 37.2 hours longer compared to the control sardine sample. Ozone treatment showed no significant effect on TVBN concentration, but it increased proportionally with storage time. The sample treated with 1 mg/L ozone and a contact time of 5 minutes had a relatively low TVBN concentration, which is consistent with the results of the QIM model. No statistically significant effect on the degree of proteolysis was observed. Ozone did not cause more lipid oxidation, nor did it show a proper trend in the effect on lipid oxidation and therefore proved to be a promising treatment for prolonging the shelf life of sardines.

Keywords: sardine, ozone, spoilage, shelf life, quality parameters

Thesis contains: 45 pages, 4 figures, 12 tables, 67 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Tibor Janči, Assistant professor

Reviewers:

1. Josip, Ćurko, PhD, Associate professor (president)
2. Tibor, Janči, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Nives, Marušić Radovčić, PhD, Associate professor (member)
4. Davor, Valinger, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 26th, 2023

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. OPĆENITO O RIBI I SRDELI | 2 |
| 2.1.1. Nutritivni i kemijski sastav | 3 |
| 2.2. KVARENJE RIBE | 6 |
| 2.2.1. Mehanizmi kvarenja | 6 |
| 2.2.2. Gubitak svježine i kvalitete tijekom skladištenja | 9 |
| 2.3. PRODULJENJE TRAJNOSTI I PROMJENA SVJEŽINE | 10 |
| 2.4. OZON I NJEGOVA PRIMJENA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI | 11 |
| 2.4.1. Općenito | 11 |
| 2.4.2. Dobivanje ozona | 11 |
| 2.4.3. Zakonska regulativa | 12 |
| 2.4.4. Svojstva | 13 |
| 2.4.5. Primjena u prehrambenoj industriji | 14 |
| 2.5. PRIMJENA OZONA ZA PRODULJENJE TRAJNOSTI RIBE | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 17 |
| 3.1. MATERIJALI | 17 |
| 3.1.1. Uzorci | 17 |
| 3.1.2. Uređaji | 17 |
| 3.1.3. Pribor | 18 |
| 3.1.4. Kemikalije | 18 |
| 3.2. METODE | 19 |
| 3.2.1. Priprema ozonirane vode | 19 |
| 3.2.2. Senzorska ocjena svježine | 20 |
| 3.2.3. TBARS test | 22 |
| 3.2.4. pH-vrijednost | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.5. Ukupne hlapive baze dušika (TVBN) | 23 |
| 3.2.6. Stupanj proteolize..... | 24 |
| 3.2.7. Obrada podataka..... | 25 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 26 |
| 4.1. SENZORSKA OCJENA SVJEŽINE | 27 |
| 4.2. pH-VRIJEDNOST | 29 |
| 4.3. UKUPNE HLAPIVE BAZE DUŠIKA (TVBN)..... | 31 |
| 4.4. INDEKS PROTEOLIZE | 33 |
| 4.5. TBARS TEST | 35 |
| 5. ZAKLJUČCI | 38 |
| 6. LITERATURA | 39 |

1. UVOD

Europska srdela (*Sardina pilchardus*) je pelagična riba te je najviše konzumirani riblji proizvod Jadranskog mora (Šimat i sur., 2020; Cardenia i sur., 2013). Bogati je izvor raznih biomolekula poput proteina, minerala i polinezasićenih masnih kiselina, a pogotovo omega-3 masnih kiselina. Njihova konzumacija doprinosi balansiranoj prehrani i prevenciji raznih poremećaja zdravlja.

Limitirajući faktor komercijalne upotrebe srdele je otežano očuvanje kvalitete pri niskim temperaturama. Posljedično je rok trajanja vremenski ograničen djelovanjem mikroorganizama, autolizom i lipidnom oksidacijom, uzrokujući pojavu nepoželjnih organoleptičkih svojstava (Carmen i sur., 2005). Prema navedenom, produljenje trajnosti ribe je sve veća potreba društva. Dostupno je nekoliko metoda za produljenje roka trajanja svježih srdele, a prednjače brzo hlađenje, skladištenje na niskim temperaturama, tretman ionizirajućim zračenjem te primjena konzervansa. Međutim, povećana svjesnost društva o nepoželjnim posljedicama kemijskih aditiva u hrani dovela je do sve većeg interesa za razvitak nove metode koja će biti efikasna u suzbijanju specifičnih mikroorganizama kvarenja te patogenih mikroorganizama, a da je sigurna za upotrebu u prehrambenoj industriji (Gelman i sur., 2005).

Ozon je djelotvorna antimikrobna tvar koja ne ostavlja toksične ostatke u okolišu nakon upotrebe. Danas ima najveću primjenu u obradi pitke i otpadne vode te kao dezinficijens površina, a sve više se istražuje njegov utjecaj u direktnom kontaktu s hranom. Ozon je jak oksidans zbog čega može uzrokovati oksidaciju makromolekula iz hrane što je negativno svojstvo. S druge strane, pozitivno djeluje na redukciju broja mikroorganizama koji se nalaze na ribi te tako usporava njeno kvarenje (Gelman i sur., 2005). Vrijeme kontakta ozona i ribe te koncentracija ozona koja se primjenjuje utječu na promjenu broja mikroorganizama i na aktivnost proteolitičkih enzima koji također uzrokuju kvarenje ribe (Silva i Goncalves, 2016).

Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti utjecaj različitih koncentracija ozona i duljine vremena kontakta ozona i srdele na parametre kvalitete ribe, a posebno na produljenje roka trajnosti. Provedene metode su senzorska ocjena svježine srdele, mjerenje pH-vrijednosti, određivanje indeksa proteolize, mjerenje ukupnih hlapivih baza dušika (engl. *Total Volatile Basic Nitrogen, TVBN*) i određivanje stupnja oksidacije masti (engl. *Thiobarbituric acid reactive substance test, TBARS test*).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OPĆENITO O RIBI I SRDELI

Ribe su hladnokrvni vodeni kralježnjaci kojima je tijelo pokriveno ljuskama, dišu škrgama, a kreću se pomoću peraja te obitavaju u slatkoj ili slanoj vodi. Morske ribe se dijele na pelagične, litoralne i abisalne. Pelagične vrste obitavaju u vodenom sloju do same površine, litoralne žive uz obalu, dok abisalne ili dubinske obitavaju u dubinama (od 6000 m). Morske ribe se prema hrv. pučkoj terminologiji dijele na plavu i bijelu ili pridnenu. Kao plava riba se karakteriziraju pelagične vrste selice te krupna plava riba, dok je bijela riba raznovrsnija te čini 90 % morskih vrsta u Jadranskom moru.

Prema suvremenoj sistematici ribe (*Pisces*) su neformalna skupina koja obuhvaća šest razreda: *Myxini* (sljepulje), *Pteraspodomorphi* (samo izumrli oblici), *Cephalaspidomorphi* (niz fosilnih oblika i recentne paklare), *Chondrichthyes* (hrskavičnjače), *Actinopterygii* (zrakoperke) i *Sarcopterygii* (mesoperke). U užem smislu ribe obuhvaćaju razrede *Chondrichthyes*, *Actinopterygii* i *Sarcopterygii*, odnosno koštunjače i hrskavičnjače.

Srdela (*Sardina pilchardus*) je morska pelagična riba koja pripada porodici haringa (*Clupeide*). Rasprostranjena je duž obale Europe, u istočnom dijelu Atlantskog oceana (prvenstveno od Islanda do Sjevernog mora) te Sredozemnom, Crnom i Azovskom moru (slika 1) (Silva i sur., 2015). Budući da je pelagična vrsta, srdela se zadržava u epikontinentalnom pojasu na dubinama 25-55 m danju ili 15-35 m noću te se kreće u velikim plovama (Tratnik i sur., 2007).



Slika 1. Rasprostranjenost srdele (prema Silva i sur., 2015)

Izduženo tijelo srdele je bočno spljošteno s modro-zelenim dorzalnim dijelom. Na bočnim stranama se nalaze crne mrlje, dok škrge karakterizira zvjezdoliki urez. Uobičajena dužina srdele je od 15 do 20 cm. Hrani se životinjskim planktonom, ali i drugim većim organizmima poput rakova (Zorica i sur., 2021).

2.1.1. Nutritivni i kemijski sastav

Plava riba bogata je bjelančevinama što ju čini važnim izvorom proteina za prehranu ljudi (Nosić i Krešić, 2015). Lako je probavljiva te sadrži lipidnu frakciju esencijalnih omega-3 masnih kiselina. Omega-3 polinezasićene masne kiseline (engl. *omega-3 polyunsaturated fatty acids, n-3 PUFA*) su funkcionalne hranjive tvari s višestrukim učincima u prevenciji i upravljanju protuupalnim kardiometaboličkim bolestima, poput dijabetesa tipa 2, hipertenzije, bolesti maste jetre i hipertrigliceridemije (Santos i sur., 2023). Uz to, prekursori su za sintezu eikosanoida, a to su supstance slične hormonima koje imaju važnu ulogu u upalnim procesima. Nadalje, srdela sadrži niske koncentracije kolesterola, a na njegovo ukupno sniženje u krvi dodatno utječu višestruko nezasićene masne kiseline iz ribe. U srdeli prevladavaju dokozaheksaenska (engl. *docosahexaenoic acid, DHA*) i eikozapentaenska kiselina (engl. *eicosapentaenoic acid, EPA*). Skulas-Ray i sur. (2019) zaključili su da osobe bez koronarnih bolesti trebaju konzumirati 2 jedinice serviranja plave ribe tjedno, što korespondira 0,3-0,5

g/dan EPA i DHA, a osobe s poremećajima kardiovaskularnog sustava čak 1 g/dan EPA i DHA.

Osim n-3 PUFA, usporedno s drugim ribama, srdele imaju veću količinu kalcija. Budući da se uobičajeno konzumira s kostima, 100 g srdele sadrži količinu kalcija ekvivalentnu količini u 400 mL mlijeka što srdelu čini alternativom izvora kalcija kod ljudi intolerantnih na mliječne proizvode (Misselwiz i sur., 2013). EPA potpomaže apsorpciji i pohrani kalcija zbog čega dolazi do očvršćivanja kostiju. Uz kalcij, srdele su bogate magnezijem, cinkom i kalijem koji pozitivno utječu na krvni tlak. Nutrijent koji srdele sadrže više od drugih često konzumiranih riba je željezo. Njegova količina usporediva je s onom u mesu (Czerwonka i Tokarz, 2017). Nutritivni sastav srdele prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Nutritivna vrijednost srdele (prema Czerwonka i Tokarz, 2017)

| Nutritivna vrijednost | Srdela, kuhana |
|------------------------------|-----------------------|
| Energija, kcal | 208 |
| Proteini, g | 24,6 |
| Ukupni lipidi, g | 11,5 |
| Kalcij, mg | 382 |
| Željezo, mg | 2,9 |
| Magnezij, mg | 39 |
| Fosfor, mg | 490 |
| Kalij, mg | 397 |
| Natrij, mg | 307 |
| Cink, mg | 1,3 |
| Bakar, mg | 0,186 |
| Selen, mg | 52,7 |
| Vitamini B-12, µg | 8,9 |
| Vitamin A, µg | 32 |
| Vitamin E, µg | 0 |
| Vitamin D, µg | 4,8 |
| Zasićene masti, g | 1,5 |
| PUFA 2:5 n-3 (EPA), g | 0,473 |
| PUFA 22:5 n-3 (DPA), g | 0 |
| PUFA 22:6 n-3 (DHA), g | 0,509 |
| Kolesterol, mg | 142 |

Caponio i sur.(2004) proveli su istraživanje o udjelu masti u jedinkama srdele ovisno o dužini i spolu. Zaključeno je kako spol ne utječe na navedeno, no da se povećanjem dužine jedinke povećava i udio masti. Razlike u muškim i ženskim srdelama vidljive su na vrstama masnih kiselina. Tako ženke imaju veći udio zasićenih masnih kiselina i mononezasićenih masnih kiselina, a muške jedinke veći udio polinezasićenih. U tablici 2 prikazani su neki od rezultata ovog istraživanja. Vidljivo je da je kod ženki primjećen viši udio omega-6 polinezasićene linolne i linolenske masne kiseline, a kod muških jedinki viši udio dokozaheksaenske i arahidonske kiseline.

Tablica 2. Razlike u sastavu masnih kiselina muških i ženskih jedinki srdele (*prema* Caponio i sur., 2004)

| Masna kiselina | Muške jedinke | Ženske jedinke |
|--|----------------------|-----------------------|
| Zasićene masne kiseline (SFA) | | |
| C _{14:0} miristinska | 9,2-10,4 | 16,2-21,8 |
| C _{16:0} palmitinska | 148,4-196,1 | 156,4-223,6 |
| C _{18:0} stearinska | 34,0-49,3 | 34,4-58,0 |
| Ukupno SFA | 217,0-285,8 | 231,5-340,0 |
| Mononezasićene masne kiseline (MUFA) | | |
| Ukupno MUFA | 70,0-71,3 | 85,4-111,5 |
| Polinezasićene masne kiseline (PUFA, omega-6) | | |
| C _{18:2} | 5,1-8,1 | 6,2-9,4 |
| C _{18:3} | 1,6-2,8 | 2,9-4,1 |
| C _{20:4} | 9,3-17,1 | 8,3-14,9 |
| C _{22:5} | 8,4-11,8 | 6,2-10,2 |
| Ukupno PUFA omega-6 | 26,9-44,5 | 23,3-43,0 |
| Polinezasićene masne kiseline (PUFA, omega-3) | | |
| Ukupno PUFA omega-3 | 198,8-308,3 | 194,2-307,0 |

2.2. KVARENJE RIBE

2.2.1. Mehanizmi kvarenja

Neposredno nakon uginuća u tkivu ribe počinju se odvijati kemijski i biokemijski procesi koji dovode do gubitka svježine tj. promjena kvalitete ribe tijekom skladištenja. Najočitija promjena u početnim fazama je pojava *rigor mortisa* koja se javlja nekoliko sati nakon uginuća, ovisno o vrsti, fiziološkom stanju te uvjetima prije uginuća (Ghaly i sur., 2010). Mikrobnе, enzimskе i kemijskе reakcije uzrok su kvarenja ribe i dekompozicije ribljeg mesa nakon ugibanja (Gökoğlu i Yerlikaya, 2015). One su uzrok gubitku svježine i kvalitete ribe. Kako bi se to spriječilo, ili barem usporilo, potrebno je poznavati 3 glavna mehanizma odgovorna za kvarenje ribe. Ti mehanizmi su autoliza, oksidacija i mikrobiološka aktivnost.

Autoliza (raspad proteina, lipida i ugljikohidrata) uzrokovana enzimskom aktivnošću uzrokuje prvotni gubitak kvalitete ribe. Razlog je što enzimi ostaju aktivni i nakon uginuća, a najviše utjecaja vidljivo je u promjeni okusa. Iako u nekim enzimskim reakcijama nastaju spojevi poželjni za aromu, njihovom daljnjom razgradnjom opet nastaju oni koji uzrokuju gubitak kvalitete ribe te su stoga navedene promjene nepoželjne od strane potrošača. (Gökoğlu i Yerlikaya, 2015). Ubrzo nakon ulova dolazi do kemijskih i bioloških promjena uzrokovanih enzimskom autolizom makromolekula, a prednjače glikoliza, raspad ATP-a, proteoliza, lipidna hidroliza i oksidacija (Murthy i Jeyakumari, 2019). U tablici 3 prikazane su enzimskе promjene koje se javljaju u ribi.

Hansen i sur. (1996) proveli su istraživanje o autolitičkim enzimima i promjenama koje uzrokuju na ribi neposredno nakon uginuća. Njihova aktivnost imala je veliki utjecaj na smanjenje kvalitete teksture, no u tom periodu nije došlo do pojave karakterističnih neugodnih okusa i mirisa kvarenja. Rezultati upućuju na činjenicu da kvaliteta ribe može biti narušena, a time i rok trajanja, čak pri relativno niskom broju mikroorganizama kvarenja. Osim uslijed aktivnosti enzima prisutnih u stanicama, promjene teksture mogu biti posljedica djelovanja probavnih enzima koji uzrokuju mekšanje i rupturu trbušnog zida (Ghaly i sur., 2010).

Tablica 3. Sažetak post mortem promjena u ribi uzrokovanih enzimim (*prema* Ghaly i sur., 2010)

| Enzim | Supstrat | Efekt |
|--|------------------------|--|
| Glikolitički enzimi | Glikogen | Sinteza mliječne kiseline- pad pH vrijednosti |
| Autolitički enzimi odgovorni za raspad nukleotida | ATO, ADP, AMP, IMP | Proizvodnja hipoksantina |
| Katepsini | Proteini, peptidi | Omekšavanje tkiva |
| Kimotripsin, tripsin, karboksi-peptidaze | Proteini, peptidi | Puknuće trbušne stijenke |
| Kalpain | Miofibrilarni proteini | Omekšavanje |
| Kolagenaze | Vezivno tkivo | Omekšavanje i zjapljenje tkiva |
| TMAO demetilaza | TMAO | Tvorba formaldehida |

Proteolitički enzimi iz mišićja i viscere doprinose post mortem degradaciji tijekom skladištenja i prerade ribe. Ukoliko se riba ne skladišti primjereno, proteolizom dolazi do degradacije proteina te slijedi solubilizacija. Uz to, peptidi i slobodne aminokiseline nastali autolizom proteina ribljeg mišićja dovode do kvarenja ribe jer se pospješuje mikrobn rast. Aktivnost proteolitičkih enzima se može usporiti hlađenjem ribe nakon ulova, odnosno skladištenjem na temperaturi 0 °C (Ghaly i sur., 2010). Endogeni enzimi svojim reakcijama omogućuju supstrate potrebne za rast bakterija, koje su pak glavni uzročnik smanjenja kvalitete ribe i neprikladnosti za konzumaciju (Shawyer i Pizzali, 2003).

Kao što je već navedeno, pojavom rigor mortisa počinje kvarenje ribe. Nakon uginuća riblje stanice prelaze na anaerobni put proizvodnje ATP-a. U takvim uvjetima glikolizom se dobiva mliječna kiselina koja uzrokuje snižavanje pH vrijednosti u mišićima zbog akumulacije navedenog produkta. Navedeno uzrokuje pojavu rigor mortisa (Šimat i sur., 2019). Količina proizvedene mliječne kiseline ovisi o količini glikogena, odnosno ugljikohidrata, pohranjenog u ribljim tkivima. Viša koncentracija glikogena dovodi do sinteze veće količine mliječne kiseline. Posljedično snižavanje pH-vrijednosti pak utječe na denaturaciju proteina i smanjuje se sposobnost vezanja vode, što pak znači da prilikom termičke obrade dolazi do gubitka na vlažnosti i kao rezultat dobivamo tvrđu teksturu ribljeg mesa (Huss, 1995).

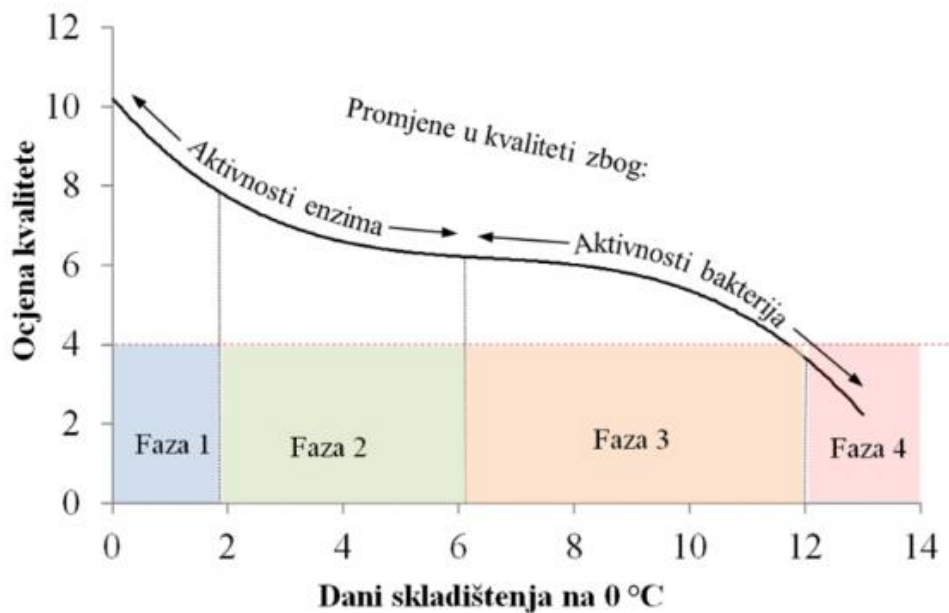
Drugi mehanizam kvarenja koji je potrebno razumjeti je oksidacija. Kod riba je najznačajnija lipidna oksidacija, a uzrokuju je lipaze iz kože, krvi i tkiva ribe. Oksidacija lipida

dovodi do gubitka esencijalnih masnih kiselina i posljedično do smanjenja nutritivne vrijednosti ribe, a produkti uzrokuju negativne organoleptičke promjene poput neugodnog mirisa (Aubourg, 2001). Kompleksna reakcija oksidacije lipida započinje primarnom oksidacijom s nestabilnim lipidnim hidroperoksidima kao produktima. Sekundarnom oksidacijom dobivaju se sekundarni produkti oksidacije (aldehidi, ketoni, epoksidi, alkoholi, kiseline, ugljikovodik) koji uzrokuju promjenu kvalitete ribe mijenjajući okus, miris, teksturu i boju (Šimat i sur, 2009). Lipidnu oksidaciju moguće je usporiti smrzavanjem ribe, no nije ju moguće u potpunosti zaustaviti (Secci i Parisi, 2016).

Mikroorganizmi su prirodno prisutni na koži i u unutarnjim organima ribe, no ne utječu na njezinu kvalitetu zbog obrambenog mehanizma živućih jedinki. Međutim, mikroorganizmi napadaju riblja tkiva nakon njezina uginuća pri čemu najveći utjecaj imaju bakterije. Na bakterijsku mikrofloru utječe nekolicina faktora, a prednjači mikrobna populacija vode u kojoj je riba živjela. Prema tome, na kvarenje ribe nakon uginuća ne utječu samo mikroorganizmi prirodno prisutni na/u njoj, već i mikroflora vodenog okoliša koja dospijeva u nju preko škrge, krvnih žila, trbušne stjenke i kože, a pogotovo oštećenog tkiva.

Kvarenje uzrokuju psihofilni i mezofilni mikroorganizmi, a očitava se kao pojava nepoželjnog okusa i mirisa mesa ribe te dolazi do vizualno uočljivih promjena i do promjene fizikalnih karakteristika. Dolazi do raspada neproteinskih spojeva s dušikom, proteini se degradiraju do peptida, aminokiselina, amonijaka i drugih nisko molekularnih dušikovih spojeva. Uz to, nastaju organske kiseline, sulfidi, alkoholi, aldehidi i ketoni. Ovi se spojevi kvarenjem ribe postepeno akumuliraju u organizmu što uzrokuje navedene organoleptičke promjene. Riblja mikroflora uključuje vrste *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Serratia*, i *Micrococcus* (Ikape i Cheikyula, 2017). Gram i Huss (2000) utvrdili su da kvarenje svježe ribe najčešće uzrokuju Gram negativne fermentativne bakterije (npr. *Vibrionaceae*), dok su psihrotolerantne Gram negativne bakterije (npr. *Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp.) odgovorne za isto kod hladene ribe. Zbog navedenog je bitno odrediti specifične mikroorganizme odgovorne za kvarenje jer jedan dio prisutne mikroflore nema utjecaja na sintezu spojeva koji su indikatori kvarenja.

Razina trimetilamina (TMA) govori o mikrobnom propadanju koje dovodi do kvarenja ribe. TMA ima neugodan miris (slično amonijaku), a nastaje mikrobiološkom razgradnjom trimetilamin oksida (TMAO) koji se nalazi u tkivu ribe i ima funkciju osmoregulatora za sprečavanje dehidracije. Ovom reakcijom, bakterije *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas* spp., psihrotolerantan *Enterobacteriaceae*, *Photobacterium phosphoreum* i *Vibrio* spp. dobivaju energiju (Ikape i Cheikyula, 2017). Tijek procesa kvarenja ribe prikazan je na slici 2.



Slika 2. Tijek procesa kvarenja ohlađene ribe (prema Shawyer i Pizzali, 2003)

2.2.2. Gubitak svježine i kvalitete tijekom skladištenja

Gubitak svježine i kvalitete ribe tijekom skladištenja usko je povezano s gore navedenim mehanizmima kvarenja. Svaki od njih podrazumijeva različite kemijske i biokemijske reakcije kojima nastaje velik broj različitih spojeva od kojih neki mogu biti štetni za zdravlje potrošača, kao što je to slučaj sa nastankom biogenih amina. Ako se radi o navedenom, zakonski je određena maksimalna dopuštena koncentracija u proizvodu. Erkan i Ozden (2008) proveli su istraživanje o promjeni svježine i kvalitete ribe skladištene na +4 °C. Senzorskom ocjenom svježine utvrđen je rok trajanja od 7 dana nakon uginuća u navedenim uvjetima. Nakon tog perioda riba postaje neprikladna za prehranu ljudi zbog spojeva koji se formiraju zahvaljujući čimbenicima kvarenja.

Nakon ulova dolazi do smanjenja pH-vrijednosti zbog nastanka mliječne kiseline, no kako nestaje glikogena u tkivu tako se i pH povećava. Uz to, dolazi do akumulacije lužnatih tvari, poput amonijaka, djelovanjem mikroorganizma koji povećavaju pH. Iako pH-vrijednost upućuje da je došlo do nastanka tvari koje negativno utječu na organoleptička svojstva, ona nije pokazatelj kvarenja ribe te se zato moraju testirati nastale supstance kako bi se utvrdilo da je riba nezadovoljavajuće kvalitete (Erkan i Ozden, 2008). Jedna od metoda je utvrđivanje ukupnih hlapivih baza dušika (TVBN) kojom se analizira prisustvo dušikovih spojeva (amonijak, dimetilamin i trimetilamin). Kod nekih vrsta ribe, poput srdele, vrijedi

proporcionalni odnos vrijednosti TVBN i svježine. (Castro i sur., 2012). Najviša dopuštena količina TVBN kod neprerađenih proizvoda ribarstva, uključujući srdelu, iznosi između 25 i 35 mg na 100 g proizvoda (Gauta, 2020).

Druga metoda koja se koristi kao pokazatelj gubitka svježine je metoda reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS). Mjeri se malondialdehid (MDA) kao produkt oksidacije lipidnih supstrata. Znači, TBARS test pokazuje stupanj lipidne oksidacije u ribi. Postoji nekolicina drugih metoda za provjeru kvalitete ribe, a sve se temelje na mjerenju koncentracije tvari nastalih pomoću mehanizama kvarenja.

Senzorsko određivanje svježine ribe može se provesti pomoću nekoliko metoda, no najvažnije su EU shema i metoda indeksa kvalitete (engl. *Quality Indeks Method, QIM*) pomoću kojih se utvrđuje rok, odnosno istek roka trajanja ribe. Prema EU shemi, riba se svrstava u kategorije svježine E, A ili B. Ekstra kategorija označava svježiju ribu, dok riba ispod kategorije B nije za ljudsku upotrebu. Metodom se ocjenjuje izgled, miris i tekstura. Određivanje indeksa kakvoće ribe je deskriptivna metoda razvijena za gotovo sve komercijalno važne ribe te obuhvaća senzorske osobine značajne za određenu vrstu. Ova metoda je osobito korisna jer postoji linearna ovisnost između ocjena i dana skladištenja na ledu pa se može utvrditi rok trajanja ribe.

2.3. PRODULJENJE TRAJNOSTI I PROMJENA SVJEŽINE

Adekvatno skladištenje ribe nakon ulova je kritično za zadržavanje kvalitete, a time i roka trajanja. Najbitniji parametar je brzo hlađenje ribe na temperature bliske točki smrzavanja vode, no potrebno je i zadržati ih u hladnom lancu do njihove prerade ili konzumacije. Osim navedenog, na trajnost ribe utječu i metoda korištena za hlađenje, vrijeme između ulova i prerade, postojanje fizičkih oštećenja na tkivima, oprema korištena pri ulovu te pre-mortem stres koji utječe na biokemijske procese i parametre kvalitete u post-mortem periodu. Svi navedeni faktori su ireverzibilni i međusobno povezani što znači da, ukoliko samo jedan od njih nije ispunjen, smanjuje se trajnost, kvaliteta, svježina te sigurnost konzumacije ribe.

Rok trajanja ribe smanjuje se ukoliko se ona ne ohladi adekvatno nakon ulova. Hlađenje je postupak snižavanja temperature do 0 °C kako bi se produljila trajnost ribe. Nakon ulova se treba ohladi što prije, a ne kasnije od 9 sati (FDA, 2020). Šimat i sur. (2019) navode kako riba izgubi cijeli jedan dan roka trajanja za svaki sat koji nije ohlađena nakon uginuća. Ukoliko se riba ohladi odmah nakon ulova, *rigor mortis* javlja se kasnije. Ovo je izuzetno bitno jer njegovom pojavom počinje kvarenje ribe što znači da momentalno hlađenje nakon uginuća

produžuje rok trajanja (Prout i Misson, 2004). Isto se događa i ukoliko dođe do porasta temperature za 4 °C. U ovom slučaju se rok trajanja čak prepolovi. Na ovaj način se smanjuje aktivnost enzima i mikroorganizama te se usporavaju kemijski procesi odgovorni za kvarenje ribe. Produljenje roka trajanja možemo postići i vrstom leda korištenom za hlađenje. Najprikladnije rješenje hlađenja pokazao se tekući rashladni medij, odnosno mješavina morske vode i leda ili pahuljasti led (Janči i Vidaček Filipec, 2019; Prout i Misson, 2004). Tekući medij ima još jednu prednost, a to je da ne uzrokuje oštećenja na tkivima riba i tako ne ubrzava njihovo kvarenje. Ovakav rashladni medij je također optimalan pri transportu i skladištenju ribe. Umanjuje mogućnost fizičkih oštećenja te dolazi do minimalnih fluktuacija temperature. Najprikladnije sredstvo u kojemu se riba hladi, transportira i skladišti su izotermički sanduci koji potpomažu navedenim svojstvima opreme (Losada i sur., 2005).

2.4. OZON I NJEGOVA PRIMJENA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

2.4.1. Općenito

Ozon je alotropska modifikacija kisika koja sadrži tri atoma kisika (O₃). Do -111,9 °C je plavo-ljubičasta kapljevinna, a iznad plin karakterističnog mirisa. Na sobnoj i višim temperaturama se raspada pri čemu se oslobađa jedan kisikov atom ($O_3 \rightarrow O_2 + O$) što ga čini najjačim poznatim oksidacijskim sredstvom. Reagira sa svim metalima osim iridija, platine i zlata tako što ih oksidira, zatim ubija bakterije, oksidira mnoge organske tvari te uništava organske boje. Iz tog razloga najveću primjenu ima kao izbjeljivač tkanina, papira, ulja i drugih materijala, koristi se kao dezinfekcijsko sredstvo pitke vode i zraka, a ima i primjenu u prehrambenoj industriji.

2.4.2. Dobivanje ozona

Ozon se dobiva korištenjem energije koja uzrokuje raspad molekule kisika na dva atoma kisika. Takav atom se ubrzo spaja s dostupnom molekulom kisika i tvori O₃. Izvori visoke energije su najčešće elektrokemijski, ultraljubičasto zračenje ili električno pražnjenje (Miller i sur., 2013). Energija dobivena elektrokemijski se rijetko koristi zbog svoje visoke cijene. Ozon se dobiva stvaranjem električne struje između anode i katode u otopini vode i elektronegativnih aniona pri čemu se dobiva mješavina kisika i ozona na anodi (Mahapatra i sur., 2005). Metoda koja koristi ultraljubičasto zračenje se bazira na tvorbi ozona tako što se molekula kisika izloži

djelovanju UV zraka valnih duljina 140-190 nm. Njena primjena također nije visoko rasprostranjena jer su prinosi ozona mali (Miller i sur., 2013). Električno pražnjenje je najčešće korištena metoda koja, unatoč velikim količinama struje koja je potrebna, generira dovoljnu količinu ozona za komercijalnu upotrebu. Koristi se plin (kisik ili sintetski zrak) između dvije elektrode odvojene dielektričnim materijalom kako bi se dobio ozon. Za veći prinos ozona potrebno je koristiti kisik umjesto zraka.

2.4.3. Zakonska regulativa

Institut za istraživanje električne energije (engl., *Electric Power Research Institute, EPRI*) je 1997. godine sazvao Stručno vijeće znanstvenika za hranu koji su klasificirali ozon generalno prepoznat kao siguran (GRAS status) kada se koristi kao dezinfekcijsko sredstvo za hranu prema metodama primjene u skladu s dobrom proizvodnom praksom. EPRI je 2001 zatražio Administraciju za hranu i lijekove (engl., *Food and Drug Administration, FDA*) da odobri i direktan kontakt ozona s hranom pri njenoj obradi i skladištenju u plinovitom i tekućem stanju (Miller i sur., 2013). FDA je odobrila moguću primjenu ozona u dva oblika:

- (1) ozon u plinovitom stanju se dodaje u atmosferu u kojoj se hrana skladišti
- (2) ozon u plinovitom stanju se otapa u vodi u koju se uranja hrana ili se hrana pomoću ozonirane vode čisti (FDA, 2001a).

Europska Unija nema specifičnu zakonsku regulativu vezanu uz korištenje ozona u prehrambenoj industriji, no potrebno je poštivati sljedeće direktive koje se, uz druge metode i vrste prehrambenih proizvoda, odnose i na ozon:

- (1) Direktiva 2000/13/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 20. ožujka 2000. o usklađivanju zakonodavstava država članica o označivanju, prezentiranju i oglašavanju hrane- potrebno je označiti na deklaraciji kojom metodom je proizvod obrađivan ukoliko bi nedostatak ove informacije zavaralo potrošača (Direktiva 2000/13, 2013)
- (2) Uredba (EZ) br. 258/97 Europskog parlamenta i Vijeća od 27. siječnja 1997. o novoj hrani i sastojcima nove hrane- potrebno je autorizirati proizvod prije izlaska na tržište ukoliko je korištena nova proizvodna operacija (Uredba 258/97, 1997).

2.4.4. Svojstva

Ozon je izrazito topljiv u vodi, a točna količina koja se može otopiti ovisi o tlaku, temperaturi, pH-vrijednosti, radijusu mjehurića ozona, protoku ozona, kontaktnom vremenu vodene faze i ozona te čistoći vode (Khadre i sur., 2001). Što su vrijednosti temperature i pH veće, to je ozon manje stabilan u vodenom okruženju, odnosno kraće mu je vrijeme poluraspada. Prisustvo minerala i organskih tvari u vodi katalizira raspad ozona pa se prema tome topljivost povećava kako se povećava čistoća vode. Što je radijus mjehurića ozona manji, to je veća i njegova topljivost zbog veće kontaktne površine između dviju faza. Ukoliko se takva otopina miješa također se ostvaruje bolji kontakt, a time i topljivost ozona u vodenoj fazi (Schulz i Bellamy, 2000). Zbog svojih fizikalnih svojstva (tablica 4), ozon je jedan od najjačih i najreaktivnijih dezinficijensa. Njegovo djelovanje moguće je na tri načina:

- (1) Atom kisika potiče direktnu reakciju oksidacije ozona
- (2) Indirektna oksidacija ozona kod koje dolazi do raspada molekule do slobodnih radikala koji onda oksidiraju organski i anorganski materijal
- (3) Reakcija ozonoliza- organska reakcija u kojoj ozon oksidacijski cijepa nezasićene ugljik-ugljik veze u alkenima i alkinima (Goncalves, 2009).

Tablica 4. Fizikalna svojstva ozona (prema Miller i sur., 2013)

| Fizikalno svojstvo | Tekuća faza | Plinovita faza |
|---------------------------|--------------------------------------|---|
| Molekularna masa | 47,98 g/mol | |
| Gustoća | 1,352 kg/m ³ (na -112 °C) | 2,141 kg/m ³ (na 1,013 bar i 0 °C) |
| Vrelište | -111,3 °C (1,1013 bar) | - |
| Talište | -192,5 °C | - |
| Kritična temperatura | -12,2 °C | |
| Kritični tlak | 55,73 bar | |
| Kritična gustoća | 540 kg/m ³ | |
| Boja | Tamno plava | Svijetlo plava |

2.4.5. Primjena u prehrambenoj industriji

Postoje validirane metode za korištenje ozona za dezinfekciju i čišćenje površina u pogonima prehrambene industrije. Uz to, i činjenicu da nema rezidualnog traga ozona, idealan je za korištenje kao alternativni agent pri sanitaciji. O'Donnell i sur. (2012) navode kako je ozon efikasan kod fizikalnog, kemijskog i biološkog čišćenja prehrambenih pogona, a najizraženije djelovanje ima na organske tvari. Ozon reagira sa staničnim membranama mikroorganizama i denaturira njihove enzime pri čemu veliki utjecaj na djelotvornost imaju koncentracija ozona, pH-vrijednost, temperatura, relativna vlažnost te količina organske tvari oko stanica mikroorganizama. Direktni kontakt ozona i hrane moguć je u nekoliko operacija: pranje u ozoniranoj vodi, skladištenje u atmosferi obogaćenoj ozonom te direktnim dodatkom ozona u tekuće proizvode. Na ovakav je način moguće tretirati različite vrste namirnica (voće i povrće, žitarice, hidrokoloidi, mesni proizvodi, riba).

Kod voća i povrća je primarno minimizirati patogene bakterije i mikroorganizme kvarenja jer oni predstavljaju glavni problem za zdravstvenu ispravnost. Ozon je djelotvoran protiv bakterija, gljivica, virusa i bakterijskih spora što znači da ima veliki spektar mikrobiološke inaktivacije, a uz to degradira mikotoksine i može ubiti štetočine koje se nalaze u skladištima. FDA (2001b) je zbog navedenih svojstava odobrila njegovo korištenje kao antimikrobnog aditiva hrani. Kod obrade voća i povrća nakon branja glavna mu je uloga inaktivacija patogenih bakterija, mikroorganizama krivih za kvarenje te uništenje ostataka pesticida i kemijskih rezidua. Najčešće se koristi otopljen u vodi prilikom pranja. Achen i Yousef, (2001) navode da je jabukama i narančama pranim takvom otopinom produžen rok trajanja kao posljedica oksidacije etilena. Nadalje, zelenoj salati su se poboljšale vizualne karakteristike te se produžio rok trajanja (Gil i su., 2006), korijanderu sveukupna kvaliteta (Wang i sur., 2004) te krumpiru trajnost (Beltran i sur., 2005). Osim kao otopina, ozon se kod obrade voća i povrća koristi i kod skladištenja gdje obogaćuje atmosferu, a učinci su također pozitivni (Hildebrand i sur., 2008).

Kod obrade žitarica ozon ima ulogu dezinficirati brašno i degradirati potencijalno toksične molekule. Graham (1997) je demonstrirao da je ozon učinkovit minimalno onoliko koliko i klor, no ne ostavlja rezidualne tragove jer brzo reagira dajući kisik. Zbog gljivičnih infekcija žitarica gubitci prinosa iznose 3-10 %, a u manje razvijenim državama čak do 50 %. Primjena ozona ima mogućnost smanjiti navedene postotke, a zbog novih regulacija o upotrebi fungicida, ozon predstavlja odličnu alternativu (Fleurat-Lessard, 2004).

U prehrambenoj industriji ozon se može koristiti kod prerade hidrokoloida. Njihova svrha je povećavanje viskoznosti i gustoće te kontrola teksture u prisustvu vode. Najčešće korišteni hidrokoloidi jesu škrob, želatina, alginati i pektin. Njihova mogućnost povećanja gustoće usko je povezana sa strukturnim svojstvima koja su zaslužna za mehanizme tvorbe gelova i povećanje gustoće. Ukoliko se kod modificiranja škroba koriste kemikalije, one ostavljaju tragove te postoje sumnje o zdravstvenoj sigurnosti proizvoda (O'Donnell i sur., 2012). Svojstva je moguće modificirati upotrebom ozona i dobiti škrob koji zahtijeva kraće vrijeme kuhanja, ima veću stabilnost, bolju bistrinu i reduciranu retrogradaciju, a koristi se kod proizvodnje pudinga, umaka i marmelada. Huang i Draget (2009) navode da ozoniranje povećava prinos želatine ujedno modificirajući njenu strukturu čineći ju boljim emulgatorom.

2.5. PRIMJENA OZONA ZA PRODULJENJE TRAJNOSTI RIBE

Industrija prerade ribe ističe prednosti ozona, koje osim sigurnosti hrane, obuhvaćaju poboljšani uzgoj i skladištenje, kontrolu mirisa tijekom procesa prerade te korištenje ozoniranog leda. Do nedavno se u industriji koristio isključivo klor, no zbog mogućeg razvitka nepoželjnih organoleptičkih svojstava i sumnji o zdravstvenim efektima uzrokovanih nusproizvodima klora, potrebno je bilo istražiti nove metode sanitacije i zadržavanja kvalitete (Okpala, 2017). Pakiranje u modificiranoj atmosferi (korištenje plinova u ambalaži s hranom), zračenje (upotreba ionizirajuće energije zračenja slobodnih elektrona), ozon (upotreba generiranog ozona otopljenog u vodi ili u smjesi plinova) i mikrovalovi (korištenje elektromagnetskih valova pretvorenih u toplinu) su prema Okpali (2017) neke od metoda koje su dobile ogroman istraživački interes diljem svijeta zbog mogućeg doprinosa u razvoju ribljih proizvoda.

Upotreba ozona u preradi ribe smanjuje potrebu za vodom, odnosno voda se reciklira unutar pogona te je potrošnja manja čineći proces više održivim.

Gelman i sur. (2005) navode da korištenje ozonirane vode za pranje ribe rezultira smanjenjem mikrobiološke flore, a da pri tome nema utjecaja na promjenu sastava ribe. Mikrobiocidni efekt ozona odvija se u prvih 5 sekundi od početka tretmana (Yamayoshi i Tatsumi, 1993).

Gelman i sur. (2005) proveli su istraživanje s ciljem utvrđivanja posljedica tretmana žive ribe ozonom na rok trajanja i promjene tijekom skladištenja na 0 i 5 °C. Koristili su koncentraciju ozona od 6 mg/L otopljenog u vodi u kojoj su se nalazile ribe. Rezultati senzorske analize ne pokazuju promjene tijekom prvih 4 dana, dok nakon toga ozonirana riba pokazuje

bolja organoleptička svojstva usporedno kontrolnoj skupini. Kontrolna skupina je imala bodove iznad limita prihvatljivosti 18 dana, a ozonirana riba 30. Prema tome, tretman ozonom produžio je rok trajanja ribe za 40 % kod 0 °C. Ista senzorska metoda pri 5 °C pokazuje produženje trajnosti za 3 dana. TVBN vrijednosti kontrolne i ozonirane skupine nisu se međusobno značajno razlikovale ni pri 0 °C ni pri 5 °C. Broj bakterija rastao je sporije kod ozonirane ribe s 5 puta manjom vrijednosti na kraju skladištenja. Zaključeno je da na učinkovitost tretmana ozonom utjecaj ima temperatura skladištenja.

Silva i Goncalves (2016) testirali su utjecaj različitih koncentracija ozona te vremena kontakta na ribu. Najdjelotvornijom koncentracijom pokazala se ona od 1,5 mg/L pri 15 minuta kontakta ribe sa ozonom. Pri toj koncentraciji smanjio se broj mikroorganizama za 79,49 % u usporedbi s kontrolnom skupinom te nije došlo do promjena u boji ili pH-vrijednosti tretirane ribe. TBARS test pokazao je veće vrijednosti nego kod kontrolne skupine što upućuje da je došlo do oksidacije lipida ozonom. Zaključeno je da ovakav tretman zadržava kvalitetu ribe potrebnu za konzumaciju s prihvatljivim stupnjem oksidacije.

Okpala (2018) je proveo istraživanje o utjecaju ozona na račiće tretirane prije i tijekom skladištenja na ledu. TBARS vrijednosti tijekom skladištenja bila je najveća kod račića tretiranih ozonom s vremenom kontakta od 5 minuta prije skladištenja. Slično istraživanje (Campos i sur., 2006) pokazalo je drugačije rezultate, no provedeno na ribi romb. Analizom sastava masnih kiselina zaključeno je da stupanj lipidne oksidacije može varirati pri istim uvjetima procesa ovisno o karakteristikama masnih kiselina u uzorku.

Tretiranje ribe ozonom pokazalo je potencijal pri zadržavanju kvalitete i produženju roka trajanja. Budući da je ozon izrazito jak oksidans, potrebno je naći optimalan omjer njegove koncentracije i vremena kontakta s ribom. U tom slučaju ozon će djelovati na mikrobnu populaciju pri čemu će oksidacija masnih kiselina biti minimalna.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

Istraživanje je provedeno na uzorcima srdele ulovljenima u sjevernom Jadranu (zapadna obala Istre). Uzorci su poleđeni neposredno nakon ulova na ribarskom plovilu te su pokriveni ljuškastim ledom u prijenosnom hladnjaku preneseni do laboratorija. U laboratoriju su uzorci podijeljeni u 10 skupina koje su tretirane vodenom otopinom ozona u koncentracijama 1, 3 i 5 mg/L u vremenu od 5, 10 i 15 minuta (broj tretiranih skupina, $n = 9$). Kontrolna skupina uzoraka tretirana je vodom bez ozona u trajanju 10 min.

Nakon tretmana, uzorci su pakirani u sterilne vrećice, poleđeni te skladišteni u hladnjaku na temperaturi $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do isteka roka trajanja koji je određen senzorskom ocjenom svježine tj. metodom indeksa kvalitete (QIM). Svakog dana tijekom skladištenja iz svake skupine izdvojeni su uzorci kojima je određen indeks kvalitete, nakon čega su uklonjene ljuske, glava, unutarnji organi i kralješnica te su dobiveni fileti s kožom usitnjeni pomoću ručnog sjekača.

Neposredno nakon usitnjavanja uzorcima je analiziran stupanj oksidacije masti TBARS metodom te je ostatak uzoraka zamrznut na temperaturi $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do provođenja ostalih analiza. Sve fizikalno kemijske analize provedene su u 2 paralelna mjerenja.

3.1.2. Uređaji

- Analitička vaga, ABT 220-4M (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Centrifuga, Rotina 380 R (Hettich LabTechnology, Tuttlingen, Njemačka)
- Digitalni pH metar, 7110 (WTW, Xylem Analytics, Weilheim, Njemačka)
- Električni grijač, EKA- 10LS (Končar, Zagreb, Hrvatska)
- Hladnjak sa zamrzivačem, GTS 42120 (Liebherr, Bischofshofen, Austrija)
- Homogenizator, Ultra Turrax T18 basic (IKA Werke GmbH & Co. KG, Baden Württemberg, Njemačka)
- Kjeltec System 1002 (Foss, Höganäs, Švedska)
- Ozone generator "S-10G Industrial Ozone Generator" (A2Z Ozone, Inc. Louisville, Kentucky, SAD)
- Spektrofotometar, Specord 50 Plus (AnalytikJena, Jena, Germany)
- Tehnička vaga, PFB (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)

- Termoblok, Stuart SBH130D (Cole-Parmer Ltd., Stone, Engleska)
- Vibromješač („vorteks“), Hula Dancer Digital (IKA Werke GmbH & Co. KG, Baden Württemberg, Njemačka)
- Vodena kupelj, Rotavapor R-250 (Büchi Labortechnik, Flawil, Švicarska)

3.1.3. Pribor

- Automatske pipete Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Eppendorf tube (od 1,5 ml i 2 ml) (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Filter papir, Whatman (n° 54) (Whatman Ltd, Madstone, Engleska)
- Kjeldahl kivete (Duran Life Sciences, Milville, NJ, SAD)
- Kvarcne kivete za spektrofotometrijsko mjerenje (Hellma Analytics, Njemačka)
- Laboratorijske špatule za vaganje od nehrđajućeg čelika
- Laboratorijski stakleni pribor (čaše, štapići, lijevci, Erlenmeyerove tikvice, odmjerne tikvice) (TLOS, Zagreb, Hrvatska)
- Plastične epruvete (10 mL) (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Staklene kivete za spektrofotometrijsko mjerenje (Yixing Zhicheng Material, Yixing, Kina)
- Tikvice s okruglim dnom (TLOS, Zagreb, Hrvatska)
- Tube za centrifugu (50 mL) Falcon (ThermoFisher, Waltham, MA, SAD)

3.1.4. Kemikalije

- 1,1,3,3-tetrametoksiopropanol (TMP), 99 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- 2-tiobarbiturna kiselina (TBA), > 98 % (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Borna kiselina p.a. (H₃BO₃) (Kemika, Zagreb)
- Butilirani hidroksitoluen (BHT), 99,8 % (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Demineralizirana voda (c < 10 μS/cm), PBF
- Etanol 96 % (EtOH) (Gram-Mol, Zagreb, Croatia)
- Kadmij diklorid hemipentahidrat (CdCl₂·21/2 H₂O) (Acros Organics, Geel, Belgija)
- Kisik, Messer 2.6, Hrvatska
- Klorovodična kiselina (HCl) 37 % (Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska)

- L-Leucin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Sintetski zrak, Messer 2.6, Hrvatska
- Trikloroetena kiselina p.a. (TCA) (Acros Organics, Geel, Belgija)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema ozonirane vode

Generator ozona je korišten prilikom metode ozoniranja s ciljem dobivanja ozona pretvorbom sintetskog zraka ili kisika. Za doze od 1 i 3 mg/L rezidualnog ozona u vodi je korišten sintetski zrak, dok je za koncentraciju od 5 mg/L korišten kisik. Kontinuiran protok plinova kroz generator ozona bio je 4 L/min. Budući da je bila potrebna određena koncentracija rezidualnog ozona (1, 3 i 5 mg/L), na crijevo kojim se upuhivao ozon u vodu je bio spojen mjerač protoka plina. Kontrolom njegovog protoka, kao i kontrolom intenziteta proizvodnje ozona na generatoru, dobivena je željena koncentracija rezidualnog ozona. Na ovaj je način pripremljeno 3 L ozonirane vode za svaku od navedenih koncentracija rezidualnog ozona, što znači ukupno 9 L ozonirane vodovodne vode. Tijekom ovog dijela eksperimenta je temperatura vode održavana između 4 i 8 °C tako što se dodavao usitnjeni led u kolonu u kojoj se nalazila voda za ozoniranje.

U ovako pripremljenu vodu uronjeni su uzorci srdele u trajanju od 5, 10 i 15 minuta pri svakoj koncentraciji rezidualnog ozona. Prema tome, u tablici 5 su prikazane razlike među uzorcima obzirom na koncentraciju rezidualnog ozona u vodi u koju je uzorak uronjen i vremenu kojem je uzorak bio uronjen u vodu s rezidualnim ozonom.

Na ovaj je način dobiveno 9 grupa uzoraka koji su prošli različiti tretman ozonom koji su, zajedno s kontrolnim uzorkom, korišteni za daljnje analize opisanim eksperimentalnim metodama.

Tablica 5. Razlike u pripremljenim uzorcima ovisno o koncentraciji rezidualnog ozona u vodi i vremenu kojem su srdele bile uronjene u pripremljenu ozoniranu vodu

| Oznaka uzorka | Koncentracija rezidualnog ozona u vodi (mg/L) | Vrijeme uranjanja (min) |
|---------------|---|-------------------------|
| kontrola | 0 | 10 |
| 1*5 | 1 | 5 |
| 1*10 | 1 | 10 |
| 1*15 | 1 | 15 |
| 3*5 | 3 | 5 |
| 3*10 | 3 | 10 |
| 3*15 | 3 | 15 |
| 5*5 | 5 | 5 |
| 5*10 | 5 | 10 |
| 5*15 | 5 | 15 |

3.2.2. Senzorska ocjena svježine

Tasmanian Food Research centar je osmislio i opisao deskriptivnu metodu za senzorsku ocjenu svježine ribe, a ona se naziva određivanje indeksa kvalitete ribe. Metoda je razvijena za svaku vrstu ribe zasebno, a među koje spada i srdela. QIM, prema tome, uključuje jedinstvene senzorske pokazatelje svježine ribe određene vrste koji se procjenjuju bodovima od 0 do 3. Pri tome je bodom 0 ocijenjena najsvježija riba (ili jedan od pokazatelja), a porast bodova je proporcionalan opadanju kvalitete (Kozačinski i sur., 2006).

Za senzorsku ocjenu svježine svakoga dana je iz svake skupine uzoraka izuzeto 5 jedinki srdele. Svaka od 5 jedinki ocjenjivana je zasebno, prema kriterijima prikazanima u tablici 6 (Garcia i Careche, 2002), te je za određivanje teoretskog roka trajanja metodom linearne regresije korištena aritmetička sredina zbroja bodova jedinki iz iste skupine.

Tablica 6. Bodovni sustav određivanja indeksa kakvoće ribe za srdelu

| Parametri | | Kriterij | Bodovi |
|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------|
| Opće karakteristike | Površinski izgled (koža) | Vrlo svijetla, iridescentna | 0 |
| | | Svijetla | 1 |
| | | Manje svijetla | 2 |
| | | Pomalo mutna, slabe boje | 3 |
| | Ukočenost tijela | Fleksibilno (pre rigor) | 0 |
| | | Kruto (rigor) | 1 |
| | | Manje kruto | 2 |
| | | Mekano | 3 |
| | Čvrstoća mesa | Čvrsto, elastično | 0 |
| | | Čvrsto, tvrdo | 1 |
| | | Elastično | 2 |
| | | Mekano | 3 |
| Oči | Prozirnost (rožnica) | Prozirna, čista | 0 |
| | | Pomalo opalescentna | 1 |
| | | Opalescentna ili krvava | 2 |
| | Zjenica | Kružnog oblika, pravilna, crna | 0 |
| | | Nepravilnog oblika, crna | 1 |
| | | Nepravilnog oblika, siva ili krvava | 2 |
| | Oblik | Pomalo konveksne | 0 |
| Ravne | | 1 | |
| Konkavne, utonule | | 2 | |
| Škrge | Poklopac (krv) | Srebrno sivi | 0 |
| | | Pomalo kvavi < 10% | 1 |
| | | Više krvavi < 50% | 2 |
| | | Krvavi | 3 |
| | Boja | Crvene / tamno crvene | 0 |
| | | Smeđe crvene | 1 |
| | | Blijede | 2 |
| | Miris | Svjež, po morskoj travi | 0 |
| Neutralan | | 1 | |
| Pomalo kiselkast ili užegao | | 2 | |
| Kiseo, užegao, po amonijaku | | 3 | |
| Abdomen | Oštećenja | Čvrst, neoštećen | 0 |
| | | Mekan, lagano oštećen | 1 |
| | | Oštećen, rastrgan | 2 |
| Kralježnica | Otpornost na lom | Lomi se, a ne razdvaja | 0 |
| | | Savitljiva, drži se u komadu | 1 |
| | | Savitljiva, slabije se drži | 2 |
| | | Razdvaja se | 3 |
| Meso | Izgled i boja | Svjež, pomalo prozirno | 0 |
| | | Neprozirno, pomalo mutno | 1 |
| | | Spljošteno, krvavo | 2 |

3.2.3. TBARS test

Stupanj oksidacije masnih kiselina u uzorcima mišića određen je metodom prema Bruni i sur. (2001). Metoda se temelji na reakciji tiobarbiturne kiseline (TBA) sa malondialdehidom (MDA) koji je sekundarni produkt oksidacije polinezasićenih masnih kiselina. Ovom reakcijom nastaje ružičasto-crveno obojenje čiji intenzitet se zatim mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini 532 nm. Kao rezultat se dobiva stupanj oksidacije masti te se definira kao TBA vrijednost izražena kao mg MDA/kg uzorka.

Izvagano je 5 g uzorka u Falcon tubama za centrifugu te dodano 10 mg butiliranog hidroksitoluena (BHT) i 20 mL 5 %-tne otopine trikloroctene kiseline (TCA). Svaki uzorak je homogeniziran 3 puta po 20 sekundi i odmah stavljen u led. Slijedila je ekvilibracija tubi za centrifugu tako da imaju jednaku težinu te zatim centrifugiranje 10 minuta na 12000 o/min na 4 °C u centrifugi. Uzorci su filtrirani preko filter papira Watman (n^o 54) u zasebne epruvete. 4 mL filtrata je pipetirano u nove epruvete te je dodano 4 mL 0,02 M TBA i ostavljeno da teče reakcija 1 h na 100 °C u termobloku. Reakcija je prekinuta vađenjem uzoraka iz sušionika te im je očitana apsorbancija na valnoj duljini od 532 nm na spektrofotometru.

Pripremljena je kalibracijska krivulja u koncentracijskom području od 0.75-12.5 μM 1,1,3,3-tetrametoxipropanola (TMP) u 5 %-tnoj otopini TCA kako bi se izračunala koncentracija malondialdehida (MDA). Rezultati su izraženi kao mg MDA/kg uzorka srdele. Račun je izrađen prema formuli:

$$\frac{mg\ MDA}{kg\ uzorka} = \mu M\ MDA * M\ (MDA) * V_E \quad [1]$$

$$\frac{mg\ MDA}{kg\ uzorka} = \mu M\ MDA * 0.2888 \quad [2]$$

gdje je:

μM MDA - μmol MDA dobivenog mjerenjem apsorbancije u uzorku

M (MDA) – faktor konverzije μmol MDA/g u mg MDA/kg = 72 (prema molarnoj masi MDA (72 g/mol))

V_E – volumen ekstrakta za kolorimetrijsku reakciju (u L) (4 mL = 0,004 L)

3.2.4. pH-vrijednost

Elektroda pH metra je kalibrirana standardnim puferima pH 4,01 i 7,00 temperature 25 °C nakon čega je pH-vrijednost određena metodom prema Vyncke (1981). 3 g uzorka homogenizirano je s 30 mL destilirane vode u homogenizatoru Ultra Turrax tijekom 60 s kako bi se dobila suspenzija za određivanje pH vrijednosti. Korišten je digitalni pH metar pa je rezultat očitao direktno s ekrana pH metra. Svakom uzorku pH-vrijednost mjerena je dva puta u razmaku od 5 minuta te je srednja vrijednost tih mjerenja uzeta kao konačan rezultat.

3.2.5. Ukupne hlapive baze dušika (TVBN)

Ukupne hlapive baze dušika određivane su metodom direktne destilacije vodenom parom iz uzorka ribljeg mesa na aparaturi za destilaciju vodenom parom Kjeltex 2100 metodom prema Antonacopoulosu i Vyncku (1989). Uzorak bez većih komada kože i kostiju usitnjen je na homogenizatoru. 10 g tako pripremljenog uzorka je izvagano na aluminijskoj foliji i preneseno u tubu za destilaciju. Dodano je 50 mL destilirane vode, 1 g MgO i 1 kap sredstva protiv stvaranja pjene te je tuba umetnuta u aparat za destilaciju. Destilat je sakupljan u Erlenmayerovu tikvicu u koju je prethodno odmjerenom 25 mL 4 % otopine borne kiseline sa indikatorima metil-crveno i bromkrezol-zeleno koja je također bila postavljena u aparat za destilaciju. Uzorak je destilirano 4 minute do volumena destilata od 200 mL. Dobiveni destilat je titriran 0,1 M otopinom HCl do promjene boje. Prije destilacije uzorka potrebno je destilirati slijepu probu (pripremljena na isti način samo bez dodatka uzorka).

Sadržaj ukupnih hlapivih baza dušika izračunat je prema formuli:

$$\text{mg TVBN}/100 \text{ g} = \frac{(T-B) \cdot N \cdot 14,007 \cdot 100}{m(\text{uzorak})} \quad [3]$$

gdje je:

T = volumen 0,1 M HCl utrošen za titraciju uzorka

B = volumen 0,1 M HCl utrošen za titraciju slijepe probe

N = normalitet titranta (N(HCl)=0,1)

3.2.6. Stupanj proteolize

Metoda određivanja indeksa proteolize temelji se na reakciji derivatizacije sa Cd-ninhidrinom (Doi i sur., 1981). Ovom metodom kvantificira se ukupan broj aminokiselina izraženih na bazi leucina prisutnih u uzorcima srdele. Izvagano je 2 g uzorka u tube za centrifugu i dodano 20 mL hladnog 0,01 M HCl-a. Smjesa je homogenizirana 3 puta po 20 sekundi na Ultraturaxu u ledu te potom centrifugirana 20 min na 4 °C pri 7500 o/min. Supernatant je filtriran preko staklene vune. 400 µL dobivene otopine pipetirano je u Eppendorff tube od 1,5 mL te je dodano 800 µL 96 % etanola. Nakon miješanja na vortexu, uzorci su ostavljeni 30 min na sobnoj temperaturi da proteini precipitiraju. Zatim je ponovno centrifugirano 5 min pri 4 °C na 12000 o/min. 400 µL supernatanta je promiješano sa 800 µL Cd-ninhidrin reagensa na vortexu. Uzorci su stavljeni u termoblok na 84 °C tijekom 5 min i potom u led tijekom 15 min. Uzorci su ponovno centrifugirani 5 min pri 4 °C na 12000 o/min te je nakon toga izmjerena absorbancija na valnoj duljini 490 nm.

Kalibracijska krivulja izrađena je pomoću otopina leucina različitih koncentracija pripremljenih iz 1 mM otopine leucina pripremljene otapanjem 13,3 mg Leu u 100 mL destilirane vode te naknadnim miješanjem s različitim količinama otopine etanola u vodi (2:1) kako je prikazano u tablici 7.

Tablica 7. Koncentracije za pripremu kalibracijske krivulje

| | Leu 1 mM | EtOH:voda | | |
|----------------------|-----------------|------------------|------|-------|
| Kalibracija | mL | mL | mM | µg/mL |
| Leu 06 | 0,6 | 0,4 | 0,60 | 79,80 |
| Leu 04 | 0,4 | 0,6 | 0,40 | 53,20 |
| Leu 02 | 0,2 | 0,8 | 0,20 | 26,60 |
| Leu 01 | 0,1 | 0,9 | 0,10 | 13,30 |
| Slijepa proba | 0 | 1 | 0,00 | 0,00 |

Ukupna količina slobodnih aminokiselina u uzorcima izračunata je iz vrijednosti očitanih iz pripremljenog baždarnog pravca te preračunatih u skladu s razrjeđenjima pripremljenih otopina uzorka za analizu:

Pomnožiti: x 10 (ekstrakcija)

x 3 (deprotenizacija)

x specifična otopina svakog uzorka (3, 5, 10, 20, 50, 100)

te podijeliti sa 1 000 da se dobije mg aminokiselina u 1 g uzorka.

3.2.7. Obrada podataka

Rezultati dobiveni u istraživanju pripremljeni su u programu Microsoft Office Excel 365 i izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška. Statistička značajnost razlika između pojedinih skupina uzoraka utvrđena je metodom jednosmjerne analize varijanci (one-way ANOVA) u kombinaciji s *post-hoc* Tukey testom pomoću programa SPSS Statistica 17.0 (StatSoft Inc, Tulsa, Oklahoma, SAD) pri razini statističke značajnosti od 0,05.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Eksperimentalni dio istraživanja je proveden s ciljem utvrđivanja kako tretman ozonom utječe na parametre kvalitete srdele. Točnije, istražen je utjecaj koncentracije ozona i vremena trajanja kontakta ozona i srdele na rok trajanja svježe ribe.

Istraživanje je obuhvatilo 10 vrsta uzoraka. Jedna vrsta je bila kontrolni uzorak, dok su ostale bile kombinacija koncentracije od 1, 3 ili 5 mg/L ozona i vremena trajanja kontakta od 5, 10 ili 15 minuta.

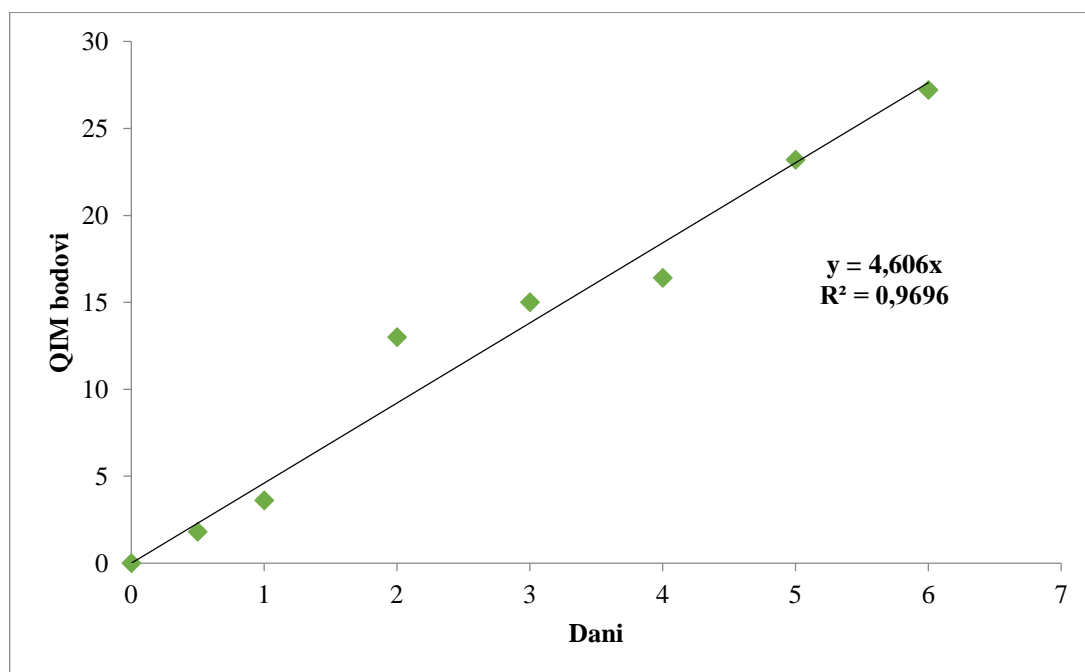
Eksperiment je započeo generiranjem ozona i njegovim otapanjem u vodi u koju su zatim uronjeni uzorci. Nakon isteka vremena kontakta ozona i srdele, riba je pohranjena u hladnjak u kojem se skladištila do kraja roka trajanja. Trajnost je određena senzorskom ocjenom kvalitete. Po završetku svakog dana skladištenja uzorci su homogenizirani kako bi bili pripremljeni za analize drugih parametara kvalitete te skladišteni u zamrzivaču kako bi se minimizirale promjene sastava srdele.

Usljedilo je mjerenje pH-vrijednosti, udio hlapivih baza dušika, indeksa proteolize te je proveden TBARS test. Za svaku metodu radile su se 2 paralele jednakog uzorka.

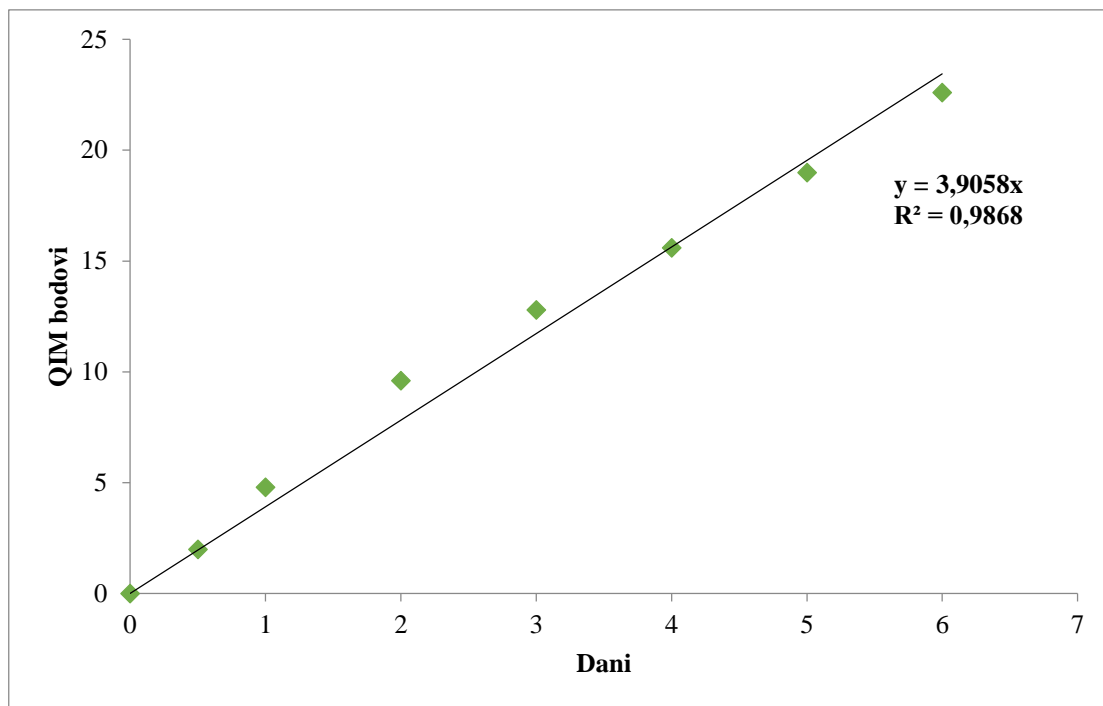
Dobiveni rezultati svih provedenih metoda (senzorska ocjena kvalitete, mjerenje pH-vrijednosti, udio hlapivih baza dušika, indeks proteolize i TBARS test) su statistički obrađeni i prikazani na slikama 3 i 4 te u tablicama 8-12 kao srednja vrijednost ispitivanog parametra sa standardnom devijacijom i statistički značajnom razlikom između uzoraka.

4.1. SENZORSKA OCJENA SVJEŽINE

Senzorska ocjena svježine provedena je kako bi se utvrdio teoretski rok trajanja različito tretiranih uzoraka te kako bi se utvrdio utjecaj tretmana ozonom na svježinu sredele. Uzorci su skladišteni sve dok senzorska analiza nije pokazala da je jedna skupina, u ovom slučaju kontrolna, neprikladna za konzumaciju. Potom su metodom linearne regresije konstruirani QIM modeli za svaku skupinu uzoraka te je teoretski rok trajanja izračunat iz jednadžbe modela kao vrijeme potrebno da uzorci postignu maksimalan broj bodova. Slike 3 i 4 prikazuju linearni QIM model za kontrolni uzorak koji je imao najkraći rok trajanja (6,60 dana) te uzorak tretiran s 1 mg/L ozona s vremenom kontakta od 5 minuta koji je imao najdulji teoretski rok trajanja od 8,15 dana.



Slika 3. Prikaz linearnog QIM modela za kontrolni uzorak



Slika 4. Prikaz QIM modela za uzorak tretiran s 1 mg/L ozona s vremenom kontakta ozona i srdele od 5 minuta

Tablica 8. Nagib (a), koeficijent determinacije (R^2) i teoretski rok trajanja prema linearnom QIM modelu za svaku vrstu uzorka

| Uzorak | a | R^2 | Teoretski rok trajanja (dani) |
|-----------------|--------|--------|-------------------------------|
| Kontrola | 4,2429 | 0,9643 | 6,60 |
| 1*5 | 3,4357 | 0,9963 | 8,15 |
| 1*10 | 3,7071 | 0,9702 | 7,55 |
| 1*15 | 3,5143 | 0,9822 | 7,97 |
| 3*5 | 3,9714 | 0,9899 | 7,05 |
| 3*10 | 4,1500 | 0,9920 | 6,75 |
| 3*15 | 3,8929 | 0,9788 | 7,19 |
| 5*5 | 3,7429 | 0,9750 | 7,48 |
| 5*10 | 3,9214 | 0,9811 | 7,14 |
| 5*15 | 3,5143 | 0,9890 | 7,97 |

Parametri svih modela (nagib i koeficijent determinacije) i teoretski rok trajanja, izračunat kao vrijeme potrebno svakom uzorku da dosegne maksimalnih 29 bodova prema QIM metodi prikazani su u tablici 8.

Gelman i sur. (2005), Silva i Goncalves (2016), Rice i Wrenn (2007) te Okpala (2018) u svojim istraživanjima navode rezultate koji se slažu s navedenim. Uzorak tretiran ozonom koncentracije 1 mg/L i vremenom kontakta srdele i ozona od 5 minuta pokazuje najduži teoretski rok trajanja, čak 37, 2 sata duži nego kod kontrolnog uzorka. Silva i Goncalves (2016) navode da povećanjem kontaktnog vremena ozona i ribe dolazi do smanjenja efektivnosti ozona, odnosno da slabi moć oksidacije. Do toga dovodi nestabilnost molekule ozona i njegov raspad pri čemu se kisik otpušta u vodu. Prema tome, učinak smanjenja broja bakterija je najjači tijekom prvih 5 minuta kontakta ozona i ribe. Kako je broj mikroorganizama usko povezan s trajnosti ribe (manji broj mikroorganizama, duži rok trajanja), dobiveni podaci sugeriraju sličnost s rezultatima ovog istraživanja.

4.2. pH-VRIJEDNOST

pH-vrijednosti svih skupina uzoraka na 0. dan skladištenja variraju između $5,872 \pm 0,023^a$ i $6,061 \pm 0,001^f$. Ovdje valja istaknuti da su razlike između inicijalnih pH-vrijednosti različitih uzoraka, iako statistički značajne, vrlo male te bez osobitog praktičnog značaja. Kako pH-vrijednost mišićja prvenstveno ovisi o stresu i fizičkoj aktivnosti neposredno prije uginuća, razlike u inicijalnim vrijednostima vjerojatno su posljedica različitog intenziteta stresa kojem su bile izložene jedinke uključene u pojedini skupni uzorak.

Ne može se isključiti niti mogućnost da je utjecaj na inicijalne razlike u pH vrijednosti imao i tretman ozonom, budući da se u dostupnoj literaturi mogu naći podaci da dekompozicija molekula ozona u vodenoj otopini može dovesti do promjene tj. smanjenja pH-vrijednosti u ribljim proizvodima (Naito, 2012; Okpala, 2014a; Okpala, 2014b). Kod sedam različitih uzoraka neposredno nakon tretmana ozonom zabilježene su niže pH-vrijednosti u odnosu na kontrolni uzorak što korespondira s navedenim istraživanjima, dok uzorci tretirani s 1 mg/L ozona i vremenom kontakta od 5 minuta te 5 mg/L ozona i vremenom kontakta od 5 minuta pokazuju suprotan trend. Kod uzorka 1*5 razlog može biti inicijalno veća mikrobiološka aktivnost kojom dolazi do akumulacije lužnatih tvari (degradacijom aminokiselina i nukleotida) i posljedično do povećanja pH-vrijednosti. U prilog ovoj pretpostavci govore i rezultati analize ukupnih hlapivih baza dušika pri čemu je najviša inicijalna TVBN vrijednost izmjerena upravo kod uzorka 1*5. Okpala (2018) je zabilježio korespondirajuće rezultate. Kod uzorka 5*5

izmjerena je najniža inicijalna TVBN vrijednost te se može zaključiti da je viša inicijalna pH-vrijednost posljedica različitog *ante mortem* stresa kod jedinki iz kojih je formiran skupni uzorak.

Obzirom na minimalne razlike u pH-vrijednosti između svih skupina uzoraka neposredno nakon tretmana ozonom, nepostojanje jasnog trenda i činjenicu da tretman ozonom djeluje samo na površinu ribe izloženu vodenoj otopini ozona, nije moguće sa sigurnošću utvrditi da su opisane razlike u pH-vrijednosti posljedica djelovanja ozona ili drugih opisanih faktora.

Promjene pH-vrijednosti tijekom 6 dana skladištenja pokazuju varijacije kod svih uzoraka bez očitog trenda, no usporedbom 0. i 6. dana skladištenja vidljivo je kako je kod svih uzoraka došlo do povećanja pH-vrijednosti, iako povećanje nije proporcionalno vremenu skladištenja. Najveći pH zabilježen je kod uzorka tretiranim s 3 mg/L ozona i vremenom kontakta od 15 minuta, a iznosio je $6,253 \pm 0,001^f$. Razlika u vrijednostima je dovoljno bliska pa je vrlo vjerojatno da je pH-vrijednost stabilna nakon tretmana ozonom. Isto sugeriraju Zhao i sur. (2017) te Silva i Goncalves (2016). Veće pH-vrijednosti mogu biti povezane s procesom kvarenja ribe, odnosno razgradnjom proteinskih tvari čime nastaju lužnate supstance koje, neovisno o ozonu, povećavaju pH ribe. Na ovakav proces autolize ozon ima vrlo mali utjecaj. pH-vrijednosti svih uzoraka kroz 6 dana skladištenja prikazane su u tablici 9.

Tablica 9. pH vrijednosti uzoraka tretiranih ozonom tijekom skladištenja

| Uzorak | 0. dan | 1. dan | 2. dan | 3. dan | 4. dan | 5. dan | 6. dan |
|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Kontrola | 5,999 ± 0,017 ^{d,e} | 6,018 ± 0,011 ^{c,d} | 6,128 ± 0,013 ^f | 6,071 ± 0,006 ^a | 6,256 ± 0,007 ^f | 6,142 ± 0,006 ^a | 6,202 ± 0,017 ^{c,d} |
| 1*5 | 6,011 ± 0,006 ^e | 6,110 ± 0,001 ^f | 6,091 ± 0,004 ^e | 6,193 ± 0,011 ^{c,d} | 6,044 ± 0,003 ^f | 6,184 ± 0,002 ^c | 6,169 ± 0,012 ^{b,c} |
| 1*10 | 5,970 ± 0,001 ^{c,d} | 6,019 ± 0,001 ^{c,d} | 6,021 ± 0,006 ^{a,b} | 6,176 ± 0,006 ^c | 6,162 ± 0,004 ^{a,b} | 6,181 ± 0,000 ^c | 6,226 ± 0,008 ^{e,f} |
| 1*15 | 5,942 ± 0,004 ^{b,c} | 6,048 ± 0,004 ^e | 6,023 ± 0,009 ^{a,b} | 6,198 ± 0,002 ^d | 6,175 ± 0,004 ^{b,c} | 6,150 ± 0,011 ^{a,b} | 6,207 ± 0,010 ^{d,e} |
| 3*5 | 5,942 ± 0,006 ^{b,c} | 5,987 ± 0,001 ^b | 6,066 ± 0,004 ^{d,e} | 6,144 ± 0,001 ^b | 6,200 ± 0,001 ^d | 6,217 ± 0,002 ^{d,e} | 6,177 ± 0,006 ^{c,d} |
| 3*10 | 5,983 ± 0,006 ^{d,e} | 5,964 ± 0,006 ^a | 6,153 ± 0,001 ^f | 6,198 ± 0,006 ^d | 6,201 ± 0,001 ^d | 6,202 ± 0,001 ^d | 6,219 ± 0,008 ^{e,f} |
| 3*15 | 5,872 ± 0,023 ^a | 5,956 ± 0,001 ^a | 6,049 ± 0,004 ^{b,c,d} | 6,139 ± 0,000 ^b | 6,182 ± 0,004 ^c | 6,185 ± 0,002 ^c | 6,253 ± 0,001 ^f |
| 5*5 | 6,061 ± 0,001 ^f | 5,983 ± 0,003 ^b | 6,031 ± 0,001 ^{b,c} | 6,128 ± 0,004 ^b | 6,216 ± 0,003 ^e | 6,163 ± 0,001 ^b | 6,142 ± 0,005 ^b |
| 5*10 | 5,979 ± 0,003 ^{c,d,e} | 6,032 ± 0,005 ^{d,e} | 5,999 ± 0,013 ^a | 6,179 ± 0,004 ^{c,d} | 6,048 ± 0,004 ^f | 6,221 ± 0,001 ^e | 6,101 ± 0,002 ^a |
| 5*15 | 5,918 ± 0,005 ^b | 6,014 ± 0,001 ^c | 6,052 ± 0,003 ^{c,d} | 6,195 ± 0,002 ^{c,d} | 6,156 ± 0,002 ^a | 6,215 ± 0,002 ^{d,e} | 6,173 ± 0,001 ^{b,c} |

Prikazane vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti rezultata svih analiziranih uzoraka srdele i standardnu devijaciju. ^{a-f} Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između tipova uzoraka ($p < 0,05$; Tukey HSD test).

4.3. UKUPNE HLAPIVE BAZE DUŠIKA (TVBN)

Ukupne hlapive baze dušika indikator su svježine i kvalitete ribe. Veća koncentracija označava da u ribi ima više dušikovitih spojeva poput amonijaka koji negativno utječu na organoleptička svojstva i kvalitetu. Udio TVBN povećao se tijekom skladištenja uzoraka s

početne vrijednosti 15,99- 18,17 mg TVBN/100 g do 22,43-32,31 mg TVBN/100 g zadnjeg dana skladištenja (tablica 10) pri čemu je najmanji rezultat zabilježen kod uzorka tretiranim s 1 mg/L ozona i vremenom zadržavanja od 15 minuta, a najveći kod uzorka tretiranim s 3 mg/L ozona i vremenom kontakta od 5 minuta.

Između svih skupina uzoraka nema statistički značajnih razlika u sadržaju TVBN tijekom prva 3 dana skladištenja. Četvrtog dana skladištenja pojavljuju se statistički značajne razlike pri čemu su kontrolni uzorak i uzorci 1*5 i 3*5 imali najviše koncentracije TVBN, a uzorci 5*5, 5*10 i 5*15 najmanje. Peti dan su uzorci 3*5, 3*15 i 3*10 imali najviše, a kontrola, 5*10 i 1*15 najmanje koncentracije TVBN pri čemu ima statistički značajnih razlika u sadržaju TVBN. Zadnji dan skladištenja također ima statistički značajnih razlika u sadržaju TVBN s tim da su najveću koncentraciju TVBN imali uzorci 3*5, 3*10 i 3*15, a najmanju 1*15, 5*5 i 5*15. Uzorak 1*5 također pokazuje relativno nisku koncentraciju TVBN, a nema statistički značajne razlike između skupina uzoraka tretiranih s koncentracijom ozona od 1 i 5 mg/L.

Udio ukupnih hlapivih baza dušika je uglavnom posljedica djelovanja mikroorganizama te se može pretpostaviti da je ozon utjecao na njihovu aktivnost što za posljedicu ima sporije nastajanje produkata njihovog metabolizma. Tretman ozonom nije imao utjecaj na trend proporcionalnog povećanja koncentracije TVBN s vremenom skladištenja što je u skladu s postojećim istraživanjima (Garcia i Careche, 2002; Gökodlu i sur., 1998; Marrakchi i sur., 1990), a eventualne razlike ovise o kemijskom sastavu (Aponte i sur., 2018) i ukupnom broju mikroorganizama koji se nazale na jedinki srdele.

Učinkovitost ozona ovisi o vrsti mikroorganizma, koncentraciji ozona te vremenu tretiranja. Prema mojem saznanju, ne postoje rezultati istraživanja provedena na srdeli koja ispituju utjecaj navedenih koncentracija ozona te nije moguće literaturno potkrijepiti najmanju efikasnu koncentraciju ozona. Kim i sur. (1999) navode da koncentracija ozona od 1 do 1,5 mg/L i vrijeme kontakta od 15 s rezultira inaktivacijom mikroorganizama od 1,5 do 5 log u vodi. U slučaju vodenog medija ozon djeluje samo na mikroorganizme, dok kod tretmana ribe ozon djeluje drugačije zbog prisustva organske tvari. Rezultati TVBN su donekle u skladu s rezultatima senzorske ocjene svježine. Kod QIM je uzorak tretiran s 1 mg/L ozona i vremenom kontakta od 5 minuta pokazao najbolja svojstva. Budući da nema statistički značajne razlike u odnosu na uzorke 1*15, 5*5 i 5*15 koji su pokazali najbolje rezultate TVBN metode, uzorak 1*5 je pokazao dobre rezultate kod određivanja TVBN.

Tablica 10. Udio ukupnih hlapivih baza dušika u uzorcima srdele tretiranima ozonom tijekom skladištenja (mg TVBN/ 100 g uzorka)

| Uzorak | 0. dan | 1. dan | 2. dan | 3. dan | 4. dan | 5. dan | 6. dan |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Kontrola | 16,01± 0,94 ^a | 15,99± 0,95 ^a | 18,22± 0,09 ^a | 19,54± 0,10 ^a | 25,29± 2,02 ^c | 21,67± 1,11 ^a | 27,35± 0,93 ^{b,c} |
| 1*5 | 18,17± 0,10 ^a | 16,82± 0,08 ^a | 18,25± 0,21 ^a | 19,52± 1,81 ^a | 23,73± 0,18 ^c | 25,29± 2,22 ^{a,b,c} | 24,49± 0,85 ^{a,b} |
| 1*10 | 16,07± 0,93 ^a | 16,19± 0,93 ^a | 16,72± 0,08 ^a | 18,83± 0,85 ^a | 21,63± 0,94 ^{a,b,c} | 23,92± 0,19 ^{a,b} | 24,70± 1,05 ^{a,b} |
| 1*15 | 16,10± 1,05 ^a | 15,43± 2,15 ^a | 18,14± 0,05 ^a | 18,77± 0,94 ^a | 19,68± 0,13 ^{a,b} | 22,42± 0,02 ^a | 22,43± 0,00 ^a |
| 3*5 | 16,10± 0,85 ^a | 16,75± 1,90 ^a | 19,00± 0,91 ^a | 20,98± 0,04 ^a | 23,09± 0,89 ^{b,c} | 29,53± 1,82 ^c | 32,31± 1,89 ^d |
| 3*10 | 16,16± 0,95 ^a | 16,75± 0,13 ^a | 18,19± 0,18 ^a | 20,36± 1,22 ^a | 22,97± 0,92 ^{b,c} | 26,68± 2,21 ^{a,b,c} | 32,28± 0,37 ^d |
| 3*15 | 16,16± 0,97 ^a | 16,80± 0,20 ^a | 18,22± 0,09 ^a | 19,53± 0,14 ^a | 22,28± 0,03 ^{a,b,c} | 28,04± 0,20 ^{b,c} | 30,79± 0,26 ^{c,d} |
| 5*5 | 15,99± 2,92 ^a | 16,13± 0,84 ^a | 16,83± 0,12 ^a | 19,47± 2,01 ^a | 19,00± 0,97 ^a | 23,20± 0,83 ^{a,b} | 23,75± 2,18 ^{a,b} |
| 5*10 | 16,56± 1,58 ^a | 17,60± 0,96 ^a | 18,23± 2,23 ^a | 18,98± 1,09 ^a | 18,92± 0,95 ^a | 21,69± 0,96 ^a | 25,30± 0,09 ^{a,b} |
| 5*15 | 16,89± 0,07 ^a | 16,11± 1,14 ^a | 17,46± 1,04 ^a | 18,96± 0,83 ^a | 19,00± 1,14 ^a | 23,20± 0,93 ^{a,b} | 24,44± 1,13 ^{a,b} |

Prikazane vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti rezultata svih analiziranih uzoraka srdele i standardnu devijaciju. ^{a-f} Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između tipova uzoraka ($p < 0,05$; Tukey HSD test).

4.4. INDEKS PROTEOLIZE

Određivanje indeksa proteolize nije pokazalo značajnu statističku razliku između različitih uzoraka ribe na 0. dan skladištenja, a vrijednosti se kreću između 3,94 - 4,76 mg Leu/g kao što je prikazano u tablici 11. Proteoliza se odvija u post mortem fazi djelovanjem endogenih enzima (Roth i Skara, 2021; Sone i sur., 2019; Sato i sur., 2002; Ando i sur., 2001) i proteolitičkih mikroorganizama (Campos i sur., 2005) koji djeluju određenom brzinom na tkivo

ribe od uginuća pa do kraja roka trajanja. Rezultati određivanja indeksa proteolize na nulti dan skladištenja su u skladu s onima iz istraživanja Jančija i suradnika (2022), s time da su vrijednosti u ovom eksperimentu nešto više.

Nultog dana skladištenja 8 uzoraka imalo je manji udio slobodnih aminokiselina od kontrolnog uzorka, dok je uzorak tretiran s 3 mg/L ozona i vremenom kontakta od 15 minuta imao nešto veći. Opisane razlike između različitih grupa uzoraka minimalne su te nemaju statističkog značaja. Iako u dostupnoj literaturi postoje dokazi da tretman ozonom ima baktericidno djelovanje te može inhibirati enzimsku aktivnost (Silva i Goncalves, 2016), ovakvi rezultati su očekivani budući da proces proteolize pod utjecajem navedenih faktora napreduje tijekom skladištenja te tretman ozonom ne bi trebao imati utjecaj na inicijalne vrijednosti stupnja proteolize.

Tijekom skladištenja kod svih grupa uzoraka dolazi do povećanja vrijednosti indeksa proteolize što je očekivano te u skladu s prethodno provedenim istraživanjima (Janči i sur., 2022). Povećanje vrijednosti indeksa proteolize posljedica je djelovanja endogenih i mikrobnih proteaza prisutnih u uzorcima tijekom skladištenja. Tijekom prva tri dana skladištenja nisu detektirane statistički značajne razlike između analiziranih grupa uzoraka, dok su četvrtog dana skladištenja detektirane statistički značajne razlike u vrijednostima kod uzoraka 1*15 (5,50 mg Leu/g) i 3*5 (7,85 mg Leu/g). Vrijednosti indeksa proteolize kod ostalih uzoraka nisu pokazale statistički značajne razlike četvrtog dana skladištenja. Od četvrtog dana skladištenja do isteka roka trajanja više nisu detektirane statistički značajne razlike između analiziranih skupina uzoraka te se unatoč statistički značajnim razlikama četvrtog dana skladištenja može zaključiti da tretman ozonom nije imao značajan utjecaj na brzinu procesa proteolize kod različitih grupa uzoraka.

Ovakvi rezultati mogu se objasniti činjenicom da je u ovom pokusu tretirana cijela riba te je tretman mogao imati utjecaja jedino na mikroorganizme na površini kože i škrge koji su bili u direktnom doticaju s vodenom otopinom ozona. Obzirom na velik broj mikroorganizama u probavnom traktu ribe koji nisu bili izloženi djelovanju ozona te činjenici da su mišićno tkivo i endogeni enzimi u njegovom sastavu bili kožom zaštićeni od djelovanja ozona, ne mogu se očekivati značajne razlike u brzini procesa proteolize kod različitih tretmana ozonom. Značajne razlike mogle bi se očekivati kod očišćene ribe ili ribljih fileta, gdje se većina mikroorganizama nalazi na otvorenim površinama proizvoda te su izloženi djelovanju ozona.

Tablica 11. Indeks proteolize (mg Leu/g) uzoraka tretiranih ozonom tijekom skladištenja

| Uzorak | 0. dan | 1. dan | 2. dan | 3. dan | 4. dan | 5. dan | 6. dan |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Kontrola | 4,72 ±0,03 ^a | 4,82 ±0,15 ^a | 5,52 ±0,06 ^a | 5,29 ±0,15 ^a | 6,82 ±0,29 ^{a,b} | 7,07 ±0,65 ^a | 8,62 ±0,18 ^a |
| 1*5 | 4,54 ±0,16 ^a | 4,36 ±0,66 ^a | 4,92 ±0,49 ^a | 5,43 ±0,02 ^a | 6,18 ±0,54 ^{a,b} | 7,68 ±0,10 ^a | 7,48 ±0,92 ^a |
| 1*10 | 3,98 ±0,30 ^a | 4,66 ±0,02 ^a | 5,22 ±0,04 ^a | 5,87 ±0,00 ^a | 6,61 ±0,05 ^{a,b} | 8,00 ±0,23 ^a | 8,55 ±0,43 ^a |
| 1*15 | 4,47 ±0,01 ^a | 4,45 ±0,65 ^a | 5,64 ±0,29 ^a | 5,59 ±0,32 ^a | 5,50 ±0,92 ^a | 6,93 ±0,05 ^a | 7,68 ±0,65 ^a |
| 3*5 | 4,48 ±0,60 ^a | 5,08 ±0,15 ^a | 5,23 ±0,35 ^a | 6,52 ±0,34 ^a | 7,85 ±0,56 ^b | 7,18 ±0,51 ^a | 8,03 ±0,12 ^a |
| 3*10 | 3,94 ±0,15 ^a | 5,03 ±0,04 ^a | 5,79 ±0,18 ^a | 6,71 ±1,02 ^a | 6,99 ±0,33 ^{a,b} | 7,02 ±0,89 ^a | 8,15 ±0,51 ^a |
| 3*15 | 4,76 ±0,17 ^a | 4,78 ±0,05 ^a | 5,27 ±0,32 ^a | 5,91 ±0,54 ^a | 5,73 ±0,36 ^{a,b} | 7,52 ±1,09 ^a | 8,17 ±0,27 ^a |
| 5*5 | 3,95 ±0,23 ^a | 4,74 ±0,09 ^a | 5,10 ±0,45 ^a | 5,79 ±0,10 ^a | 6,05 ±0,81 ^{a,b} | 6,86 ±0,37 ^a | 8,29 ±0,35 ^a |
| 5*10 | 4,24 ±0,49 ^a | 4,59 ±0,33 ^a | 4,72 ±0,28 ^a | 5,16 ±0,37 ^a | 5,37 ±0,39 ^a | 6,31 ±0,10 ^a | 7,30 ±0,90 ^a |
| 5*15 | 4,29 ±0,11 ^a | 4,55 ±0,15 ^a | 5,60 ±0,36 ^a | 5,34 ±0,41 ^a | 5,75 ±0,66 ^{a,b} | 6,94 ±1,02 ^a | 7,39 ±0,02 ^a |

Prikazane vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti rezultata svih analiziranih uzoraka srdele i standardnu devijaciju. ^{a,b} Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između tipova uzoraka ($p < 0,05$; Tukey HSD test).

4.5. TBARS TEST

Udio sekundarnih produkata oksidacije polinezasićenih masnih kiselina značajno se povećao tijekom skladištenja uzoraka kao što je prikazano u tablici 12. Ovo je za očekivati jer srdela ima veliku koncentraciju PUFA. Početne TBARS vrijednosti varirale su između 0,33 i 1,42 mg MDA/kg pri čemu je najniža vrijednost zabilježena kod kontrolnog uzorka, no nisu utvrđene statistički značajne razlike između kontrolnog uzorka i uzoraka 1*5, 3*5, 5*5,

tretiranih različitim koncentracijama ozona u trajanju 5 min. Statistički značajno više inicijalne vrijednosti TBARS izmjerene su kod uzoraka 1*10, 1*15, 3*15, 5*15, koje su tretirane ozonom u trajanju 10 i 15 minuta. Iz navedenog se može zaključiti da trajanje tretmana ozonom ima značajniji utjecaj na stupanj oksidacije masti od upotrijebljene koncentracije ozona. Rezultati se slažu s onima iz dostupne literature (Okpala, 2018; Silva i Goncalves, 2016).

TBARS vrijednosti idućih dana skladištenja pokazale su neregularno smanjenje s povećanjem koncentracije ozona. Ovakvi nelinearni rezultati TBARS testa primijećeni su i u drugim istraživanjima (Aponte, 2018; Okpala, 2018; Bono i sur., 2016). Razlog ovome je nastanak hlapivih spojeva koji mogu hlapiti iz uzorka, ali i reagirati s brojnim drugim komponentama u uzorku pa nakon nekog vremena dolazi do smanjenja njihove koncentracije. S druge strane, Silva i Goncalves (2016) su primijetili proporcionalan rast koncentracije MDA s vremenom skladištenja. 6. dan skladištenja došlo je do smanjenja koncentracije MDA kod uzoraka tretiranih s 3 mg/L ozona. Ovakvo smanjenje stupnja lipidne oksidacije u ribi sugerira moguću upotrebu ozona kao antioksidansa, što je u skladu sa zaključcima prethodnih studija (Naito, 2012; Okpala, 2016; Okpala, 2017).

Na temelju dobivenih rezultata, a suprotno očekivanjima, može se zaključiti da tretman ozonom nije imao značajan utjecaj na stupanj oksidaciju masti tijekom skladištenja ispitivanih uzoraka. I ovi rezultati mogu se objasniti činjenicom da je u ovom istraživanju korištena cijela riba, uključujući kožu koja služi kao barijera i štiti potkožno i intramuskularno masno tkivo od oksidacije (Janči i sur., 2022). Po završetku tretmana, ozon ne zaostaje na ribi, već reagira sa drugim komponentama ili se raspada zbog čega ne utječe na daljnju oksidaciju masti tijekom skladištenja.

Na brzinu oksidacije masti utječe sastav tj. stupanj nezasićenosti masnih kiselina u uzorku, prisutnost prooksidansa i tvari koje mogu katalizirati reakcije oksidacije (metalni ioni) te izloženost različitim vanjskim faktorima (svjetlost, temperature itd.). Obzirom na činjenicu da su sve analize provedene na skupnim uzorcima, opisane razlike i izostanak jasnog trenda može biti posljedica različitog udjela masti, sastava masnih kiselina i drugih parametara koji među ostalim ovise o fiziološkom stanju, spolu, veličini i drugim individualnim karakteristikama svake jedinice.

Tablica 12. Rezultati TBARS testa provedenog na uzorcima srdele tretiranim ozonom tijekom skladištenja (mg MDA/kg)

| Uzorak | 0. dan | 1. dan | 2. dan | 3. dan | 4. dan | 5. dan | 6. dan |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Kontrola | 0,33± 0,04 ^a | 3,65± 0,10 ^c | 5,94± 0,46 ^{a,b} | 10,36± 0,20 ^f | 7,99± 0,49 ^{a,b,c} | 14,83± 0,50 ^d | 13,77± 3,00 ^{c,d} |
| 1*5 | 0,37± 0,03 ^a | 3,26± 0,15 ^b | 7,72± 0,11 ^{e,f} | 5,85± 0,14 ^{a,b} | 6,84± 0,01 ^{a,b} | 6,53± 0,12 ^a | 8,89± 0,20 ^{a,b} |
| 1*10 | 0,81± 0,05 ^b | 4,02± 0,04 ^c | 5,96± 0,45 ^{a,b,c} | 6,19± 0,09 ^b | 8,53± 0,21 ^{b,c} | 12,18± 0,54 ^c | 16,77± 0,43 ^d |
| 1*15 | 1,42± 0,06 ^d | 3,72± 0,11 ^c | 6,95± 0,02 ^{d,e} | 9,37± 0,39 ^e | 8,93± 0,33 ^c | 8,87± 0,27 ^{a,b} | 10,35± 0,75 ^{a,b,c} |
| 3*5 | 0,39± 0,06 ^a | 4,67± 0,10 ^d | 9,00± 0,06 ^g | 10,91± 0,22 ^{f,g} | 13,73± 1,01 ^f | 11,84± 0,10 ^c | 10,62± 0,41 ^{a,b,c} |
| 3*10 | 0,41± 0,01 ^a | 5,84± 0,05 ^e | 5,10± 0,10 ^a | 11,35± 0,09 ^g | 11,25± 0,56 ^{d,e} | 11,73± 0,54 ^c | 6,56± 0,24 ^a |
| 3*15 | 1,15± 0,05 ^c | 3,97± 0,10 ^c | 7,93± 0,01 ^f | 8,43± 0,13 ^{c,d} | 8,17± 0,18 ^{a,b,c} | 10,93± 0,47 ^{b,c} | 8,29± 1,27 ^{a,b} |
| 5*5 | 0,37± 0,03 ^a | 5,71± 0,02 ^e | 6,69± 0,14 ^{b,c,d} | 8,90± 0,34 ^{d,e} | 9,83± 0,23 ^{c,d} | 12,09± 1,36 ^c | 14,33± 0,28 ^{c,d} |
| 5*10 | 0,36± 0,01 ^a | 1,70± 0,16 ^a | 5,41± 0,31 ^a | 5,06± 0,06 ^a | 6,53± 0,05 ^a | 11,79± 0,48 ^c | 17,98± 0,14 ^d |
| 5*15 | 0,69± 0,09 ^b | 3,79± 0,01 ^c | 6,88± 0,06 ^{c,d,e} | 7,76± 0,02 ^c | 12,20± 0,56 ^{e,f} | 10,27± 0,95 ^{b,c} | 12,19± 0,02 ^{b,c} |

Prikazane vrijednosti predstavljaju srednje vrijednosti rezultata svih analiziranih uzoraka srdele i standardnu devijaciju. ^{a-f} Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između tipova uzoraka ($p < 0,05$; Tukey HSD test).

5. ZAKLJUČCI

1. Linearni QIM modeli analiziranih uzoraka pokazuju najduži rok trajanja kod uzorka srdele tretirane s 1 mg/L ozona i vremenom kontakta od 5 minuta (37,2 sata duže u usporedbi s kontrolnim uzorkom).
2. Tretman ozonom nije značajno utjecao na inicijalnu pH-vrijednost, udio hlapivih baza dušika (TVBN) te indeks proteolize ispitivanih uzoraka.
3. pH-vrijednost svih uzoraka rasla je tijekom skladištenja zbog akumulacije produkata mikrobiološke aktivnosti, a razlike između pojedinih uzoraka vrlo su male i ne pokazuju jasan trend.
4. TVBN vrijednosti svih uzoraka povećavale su se tijekom skladištenja, a na kraju skladištenja značajno više vrijednosti izmjerene su kod uzoraka tretiranih s koncentracijom ozona od 3 mg/L koji su ujedno imali i najkraći teoretski rok trajanja.
5. Tretman ozonom nije imao statistički značajan utjecaj na stupanj proteolize tijekom skladištenja te, uz iznimku minimalnih razlika četvrtog dana skladištenja, nisu utvrđene statistički značajne razlike između ispitivanih grupa uzoraka.
6. Trajanje tretmana ozonom imalo je značajan utjecaj na inicijalni stupanj oksidacije masti pri čemu su više TBARS vrijednosti utvrđene kod uzoraka tretiranih u vremenu 10 i 15 minuta, neovisno o primijenjenoj koncentraciji ozona.
7. Tretman ozonom nije imao značajan utjecaj na daljnje promjene TBARS vrijednosti uzoraka tijekom skladištenja što se može pripisati činjenici da nakon tretmana u uzorku ne zaostaje rezidualni ozon koji bi mogao utjecati na procese oksidacije kroz dulji vremenski period.

6. LITERATURA

Achen M, Yousef AE (2001) Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. *J Food Sci* **66**, 1380–498.

Ando M, Joka M, Mochizuki S, Satoh KI, Tsukamasa Y, Makinodan Y (2001) Influence of death struggle on the structural changes in chub mackerel muscle during chilled storage *Fish Sci* **67**, 744–751. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00315.x>

Antonacopoulos N, Vyncke W (1989) Determination of volatile basic nitrogen in fish: A third collaborative study by the West 407 European Fish Technologists' Association (WEFTA). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **189**, 309–316. <https://org.doi/10.1007/BF01683206>

Apotea M, Anastasiob A, Marroneb R, Mercogliano R, Peruzbyb MF, Murru N (2018) Impact of gaseous ozone coupled to passive refrigeration system to maximize shelf-life and quality of four different fresh fish products. *Food Sci and Tech* **93**, 412–419. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.073>

Aubourg SP (2001) Loss of quality during the manufacture of canned fish products. *Food Sci. Technol. Int.* **7**, 199–215.

Beltrán D, Selma MV, Tudela JA, Gil MI (2005) Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging. *Postharvest Biol Technol* **37**, 37–46.

Bruna JM, Ordóñez JA, Fernández M, Herranz B, de la Hoz L (2001) Microbial and physico-chemical changes during the 413 ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added an intracellular cell-free extract of *Peni- 414 cillium aurantiogriseum*. *Meat sci* **59**, 87–96. [https://org.doi/10.1016/s0309-1740\(01\)00057-2](https://org.doi/10.1016/s0309-1740(01)00057-2)

Campos CA, Losada V, Rodríguez O, Aubourg SP, Velázquez JB (2006) Evaluation of an ozone-slurry ice combined refrigeration system for the storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chem* **97**, 223–230. <https://org.doi/10.1016/j.foodchem.2005.03.040>

Campos CA, Rodríguez O, Losada V, Aubourg SP, Barros-Velázquez J (2005) Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *Int J Food Microbiol* **103**, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfood-micro.2004.11.039>

Cardenia V, Rodriguez-Estrada MT, Baldacci E, Lercker G (2013) Health-related lipid components of sardine muscle as affected by photooxidation. *Food Chem Toxicol* **57**, 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.053>

Castro P, Millán R, Penedo JC, Sanjuán E, Santana A, Caballero MJ (2012) Effect of Storage Conditions on Total Volatile Base Nitrogen Determinations in Fish Muscle Extracts. *J Aquat Food Prod* **21**, 519-523. <http://doi.org/10.1080/10498850.2011.610917>

Czerwonka M, Tokarz A (2017) Iron in red meat: friend or foe. *Meat Sci* **123**, 157–65. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.09.012>

Direktiva 2000/13/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 20. ožujka 2000. o usklađivanju zakonodavstava država članica o označivanju, prezentiranju i oglašavanju hrane.

Doi E, Shibata D, Matoba T (1981) Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* **118**, 173- 409. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90175-5)

Erkan N, Ozden O (2008) Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Int J Food Sci Technol* **43**, 1549-1559.

FDA (2020) Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. FDA- U.S. Food and Drug Administration, White Oak, <https://www.fda.gov/media/80637/download>. Pristupljeno 15. svibnja 2020.

FDA (2001a) Hazard analysis and critical control point (HACCP): procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice: final rule. Federal Register 66, Rockville. <https://www.federalregister.gov/documents/2001/01/19/01-1291/hazard-analysis-and-critical-control-point-haccp-procedures-for-the-safe-and-sanitary-processing-and> Pristupljeno 16. kolovoza 2023.

FDA (2001b) Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. Rules and regulations. Federal Register 66, Rockville. <https://www.federalregister.gov/documents/2001/06/26/01-15963/secondary-direct-food-additives-permitted-in-food-for-human-consumption> Pristupljeno 16. kolovoza 2023.

Fleurat-Lessard F (2004) Stored Grain: Pest management. *Enc Grain Sci* **3**, 244–542. <https://org.doi/10.1016/B0-12-765490-9/00210-X>

García R, Careche M (2002) Influence of chilling methods on the quality of sardines (*Sardina pilchardus*). *J Food Prot* **65**, 1024-1032. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.6.1024>

Gauta T (2020) Utjecaj prakse rukovanja ribom na kvalitetu sitne plave ribe (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Gelman A, Sach O, Khanin Y, Drabkin V, Glatman L (2005) Effect of ozone pretreatment on fish storage life at low temperature. *J Food Prot* **68**, 778–84. <https://org.doi/10.4315/0362-028x-68.4.778>

Ghaly AE, Dave D, Budge S, Brooks MS (2010) Fish spoilage mechanisms and preservation techniques. *Am J Appl Sci* **7**, 859-877. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2010.859.877>

Gökodlu N, Özden Ö, Erkan N (1998) Physical, Chemical and Sensory Analyses of Freshly Harvested Sardines (*Sardina pilchardus*) Stored at 4°C. *J Aquat Food Prod Technol* **7**, 5-15. https://doi.org/10.1300/J030v07n02_02

Gökoğlu N, Yerlikaya P (2015) Seafood Chilling, Refrigeration and Freezing, John Wiley and Sons, West Sussex, str. 38-54.

Goncalves AA (2009) Ozone—an emerging technology for the seafood industry. *Braz Arch Biol Technol* **52**, 1527–1539. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000600025>

Graham DM (1997) Use of ozone for food processing. *Food Tech* **51**, 72–5.

Hansen TL, Gill T, Rontved SD, Huss HH (1996) Importance of autolysis and microbiological activity on quality of cold-smoked salmon. *Food Res Int* **29** 181-186. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(96\)00003-8](https://doi.org/10.1016/0963-9969(96)00003-8)

Hildebrand PD, Forney CF, Song J, Fa L, McRae KB (2008) Effect of a continuous low ozone exposure (50 nL L⁻¹) on decay and quality of stored carrots, *Postharvest Biol Technol* **49**, 397–402.

Huang IJ, Draget KI (2009) Gelatin. U: Phillips GO, Williams PA (ured.) Handbook of Hydrocolloids, 2 izd., CRC Press, Boca Raton, str. 142–63.

Huss HH (1995) Quality and quality changes in fresh fish. FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. <http://www.fao.org/3/V7180E/V7180E06.htm>.
Pristupljeno 20. travnja 2020.

Ikape SI, Cheikyula JO (2017) Fish Spoilage In The Tropics: A Review. *Octa J Biosci* **5**, 34–37.

Janči T, Vidaček Filipec S (2019) Optimizacija ribolovnih aktivnosti u svrhu poboljšanja kvalitete male plave ribe. *WWF Adria* **1**, 5-23.

Khadre MA, Yousef AE, Kim JG (2001) Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *J Food Sci* **66**, 1242–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15196.x>

Kim JG, Yousef AE, Dave S (1999) Application of Ozone for Enhancing the Microbiological Safety and Quality of Foods: A Review. *J Food Prot* **62**, 1071-1087.

Kozačinski L, Filipović I, Cvrtila Ž, Hadžiosmanović M, Zdolec N (2006) Freshness ratings of sea fish. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu* **3**, 158-164. <https://hrcak.srce.hr/22190>.
Pristupljeno 15. kolovoza 2023.

Losada V, Piñeiro C, Barros-Velázquez J, Aubourg SP (2005) Inhibition of chemical changes related to freshness loss during storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in slurry ice. *Food Chem.* **93**, 619-625.

Mahapatra AK, Muthukumarappan K, Julson JL (2005) Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **45**, 447–461. <https://doi.org/10.1080/10408390591034454>

Marrakchi AE, Bennour M, Bouchriti N, Hamama A, Tagafait H (1990) Sensory, Chemical, and Microbiological Assessments 434 of Moroccan Sardines (*Sardina pilchardus*) Stored in Ice. *J Food Prot* **53**, 600-605. <https://org.doi/10.4315/0362-028x-53.7.600>

Miller FA, Silva CLM, Brandao TRS (2013) A Review on Ozone-Based Treatments for Fruit and Vegetables Preservation. *Food Eng Rev* **5**, 77-106. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9064-5>

Misselwitz B, Pohl D, Fruhauf H, Fried M, Vavricka SR, Fox M.(2013) Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. *UEG Journal* **1**, 151–159. <https://doi.org/10.1177/2050640613484463>

Murthy LN, Jeyakumari A (2019) Post mortem biochemical changes in fish. U: Kumar A, Murthy LN, Jeyakumari A, Laly SJ (ured.) Microbiological examination of seafood pathogens, Mumbai Research, Vashi, str. 56-69.

Naito S (2012) Ozone in Food Processing. U: O'Donnell C, Tiwari BK, Cullen PJ, Rice RG (ured.) Ozone in Seafood Processing, Blackwell Publishing, Oxford, str. 137-162.

Nosi M, Krešić G (2015) Plava riba – prednosti ali i neki rizici konzumiranja. *Sci-Pro J Nutr Diet* **4**, 16-27.

Okpala COR (2018) Changes in some biochemical and microbiological properties of ozone-processed shrimps: Effects of increased ozone discharge combined with iced storage. *J Food Nutr Res* **57**,. 48–56.

Okpala COR (2017) Fish Processing by Ozone Treatment - Is Further Investigation of Domestic Applications Needful? *Chem Eng Trans* **57**, 1-6. <https://doi.org/10.3303/CET1757303>

Okpala COR (2014a) Changes in physico-chemical properties of sequential minimal ozone-treated ice- stored Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr Nutr Food Sci* **10**, 218–227. <https://doi.org/10.2174/1573401310666140306003557>

Okpala COR (2014b) Investigation of quality attributes of ice-stored Pacific white shrimp (*Litopenaeus van- namei*) as affected by sequential minimal ozone treatment. *Food Sci Technol* **57**, 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.007>

Prout P, Misson T (2004) Further Trials of the Pumpable Icing of Fish, <https://www.seafish.org/media/Publications/SR558.pdf>. Pristupljeno 11. travnja 2020.

Roth B, Skåra T (2021) Pre mortem capturing stress of Atlantic herring (*Clupea harengus*) in purse seine and subsequent effect 393 on welfare and flesh quality. *Fish Res* **244**, 106124. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2021.106124>

Santos HO, May TL and Bueno AA (2023) Eating more sardines instead of fish oil supplementation: Beyond omega-3 polyunsaturated fatty acids, a matrix of nutrients with cardiovascular benefits. *Front. Nutr.* **10**, 1107475. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1107475>

Sato K, Uratsujt S, Sato M, Mochizuki S, Shigemura Y, Ando M, Nakamura Y, Ohtsuki K (2002) Effect of slaughter method 424 on degradation of intramuscular type V collagen during short-term chilled storage of chub mackerel *Scomber japonicus*. *Food Biochem* **26**, 415-429. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2002.tb00763.x>

Schulz CR, Bellamy WD (2000) The role of mixing in ozone dissolution systems. *Ozone-Sci Eng* **22**, 329–350. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9064-5>

Shwayer M, Pizzali AFM (2003) The use of ice on small fishing vessels. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. <http://www.fao.org/3/a-y5013e.pdf>.
Pristupljeno 20. svibnja 2020.

Silva AMM, Gonçalves AA (2017) Effect of aqueous ozone on microbial and physicochemical quality of Nile tilapia processing. *J Food Process Preserv* **41**, e13298. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13298>

Skulas-Ray A C, Wilson PW, Harris WS, Brinton EA, Kris-Etherton PM, Richter CK i sur. (2019) Omega-3 fatty acids for the management of hypertriglyceridemia: a science advisory from the American Heart Association. <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/CIR.0000000000000709> > Pristupljeno 15. lipnja 2020.

Sone I, Skåra T, Olsen SH (2019) Factors influencing post-mortem quality, safety and storage stability of mackerel species: a 416 review. *Eur Food Res Technol* **245**, 775-791. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3222-1>

Šimat V, Generalić Mekinić I (2019) Advances in chilling. U: Ozogul Y (ured.) Innovative Technologies in Seafood Processing, CRC Press, London/New York, str. 1-21.

Šimat V, Maršić Lučić J, Bogdanović T, Dokoza M. (2009). Oksidacija masti u ribi i ribljim proizvodima. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* **11**, 345-351.

Tratnik, M., Radinović, S., Pedišić, P. (2007). Upravljanje fondom srdele u Hrvatskom dijelu Jadranskog mora. *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 1 (69): 53-62.

Uredba (EZ) br. 258/97 Europskog parlamenta i Vijeća od 27. siječnja 1997. o novoj hrani i sastojcima nove hrane.

Vrgoč V, Harrod NC (2021) Diet Composition and Isotopic Analysis of Nine Important Fisheries Resources in the Eastern Adriatic Sea (Mediterranean). *Front Mar Sci* **8**, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.609432>

Vyncke W (1981) pH of fish muscle: comparison of determination methods. *Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij*

Wang H, Feng H, Luo Y (2004) Microbial reduction and storage quality of fresh-cut cilantro washed with acidic electrolyzed water and aqueous ozone. *Food Res Int* **37**, 949–56.

Yamayoshi T, Tatsumi N (1993) Microbiocidal effect of ozone solution on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Drugs Exptl Clin Res* **19**, 59–64.

Zhao Y, Yang X, Li L, Hao S, Wei Y, Cen J, Lin H (2017) Chemical, microbiological, color, and textural changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets sterilized by ozonated water pretreatment during frozen storage. *J Food Process Preserv* **41**, e12746. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12746>

Zorica, B., Ezgeta-Balić, D., Vidjak, O., Vuletin, V., Šestanović, M., Isajlović, I i sur. (2016) From farm to fork: lipid oxidation in fish products. A review, *It J Anim Sci* **15**, 124-136. <http://doi.org/10.1080/1828051X.2015.1128687>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis