

# Promjene kvalitativnog sastava u postupku prerade mariniranih inćuna (*Engraulis encrasicolus*)

---

**Naranda, Martina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:229040>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-27**



*Repository / Repozitorij:*

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



Sveučilište Jurja Dobrile u Puli  
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

**MARTINA NARANĐA**

**PROMJENE KVALITATIVNOG SASTAVA U POSTUPKU  
PRERADE MARINIRANIH INĆUNA  
(*Engraulis encrasicolus*)**

Završni rad

Pula, rujan, 2019.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli  
Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

**MARTINA NARANĐA**

**PROMJENE KVALITATIVNOG SASTAVA U POSTUPKU  
PRERADE MARINIRANIH INĆUNA  
(*Engraulis encrasicolus*)**

Završni rad

**JMBAG: 0303053956, redoviti student  
Studijski smjer: Znanost o moru**

**Predmet: Analitička kemija i instrumentalne metode**

**Znanstveno područje: Prirodne znanosti**

**Znanstveno polje: Interdisciplinarno**

**Znanstvena grana: Znanost o moru**

**Mentor: dr. sc. Maria Blažina**

**Komentor: prof. dr. sc. Gioconda Millotti**

Pula, rujan, 2019.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici dr.sc. Mariji Blažina i sumentorici doc. dr. sc. Giocondi Millotti na pomoći, strpljenju i prenesenom znanju. Svim profesorima zahvaljujem na znanju koje sam stekla tijekom moga studiranja.

Zahvaljujem se Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju na ustupljenom prostoru i laboratorijskoj opremi, tvrtci S.I.C. d.o.o. na postavljenim pokusima, materijalu, informacijama o tehnologiji, Projektu "Poboljšanje prehrambene vrijednosti i trajnosti proizvoda sitne plave ribe" financiranom putem HAMAG BICRO-Programa poticanja suradnje između znanstvenih institucija i malih i srednjih poduzeća, te dr. sc. Loreni Perić, na pomoći u pojedinim analizama.

Također, veliko hvala mojim roditeljima, bratu, baki i djedu koji su mi pružali podršku tijekom moga školovanja jer bez njihove potpore i ljubavi ne bih bila ovakva osoba kakva sam danas.



## IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Martina Narandža, kandidatkinja za prvostupnicu (baccalaureus) Znanosti o moru, ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student

---

U Puli, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ godine



**IZJAVA**  
**o korištenju autorskog djela**

Ja, Martina Naranđa dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrileu Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom Promjene kvalitativnog sastava u postupku prerade mariniranih inćuna koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu sa Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, \_\_\_\_\_ (datum)

Potpis

---

## **SAŽETAK**

U ovom istraživanju promatrane su promjene kvalitete mariniranih inćuna tijekom 6 mjeseci, proizvedenih novim, pokusnim recepturama. U svakoj testiranoj recepturi za obogaćenje okusa koristili su se maslinovo ulje, ružmarin, chili papričice i suhe rajčice. Nakon dodavanja smjese ulja i začina uzorci su pohranjeni u replikatimana +4°C i analizirani jednom mjesečno. Određivane su promjene u masnim kiselinama i sadržaju proteina i lipida, oksidaciji lipida, te mikrobiološka analiza. Rezultati su pokazali da je konzerviranjem u ulju proizvod znatno obogaćen nezasićenim mastima iz ulja, a dodatkom ružmarina, chilli papričica i suhih rajčica postiže se veća apsorpcija ulja u finalnom proizvodu. Dodatkom ružmarina i chilli papričica tijekom 6 mjeseci pokazalo se kako ti začini čuvaju izvorne masnoće i proteine iz mesa ribe jer utječu na očuvanje polinezasićenih masnih kiselina. Dodavanje ružmarina poboljšalo je stabilnost masnih kiselina. Ni u jednoj recepturi nije došlo do značajne promjene udjela proteina niti razvoja produkata autooksidacije lipida tijekom skladištenja.

**Ključne riječi:** Inćuni, mariniranje, masne kiseline

## **ABSTRACT**

In this research we studied the change in quality of the marinated anchovy after use of the new experimental recipes, through the 6-month period. The effect of different spice additives was tested, and in the final tested recipes we used olive oil, rosemary, chilly peppers and dried tomatoes as flavor enrichment ingredients. After addition of oil and spices samples were stored in replicates at +4°C, and sampled monthly for analysis. The aim of this research was to determine the changes in fatty acids, protein and lipid content, microbial activity and lipid oxidation during shelf life of products. Results demonstrated high enrichment of the meat with unsaturated fatty acids originating from oil during storage. The addition of rosemary, chilly peppers and dried tomatoes enhanced the absorption of oil in the final product. The addition of rosemary and chilly peppers to the product demonstrated beneficial effect to the preservation of original fatty acid composition and lipid proportion during 6-month storage. Used spices seemed to affect polyunsaturated fatty acids preservation as well. Addition of rosemary demonstrated high stability of fatty acids with no development of lipid autoxidation products, whereas all tested recipes maintained stable protein content during investigation period.

**Key words:** anchovies, marinated, fatty acids



## **SADRŽAJ:**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1. Inćuni <i>Engraulis encrasicolus</i> .....                                    | 1         |
| 1.2. Indikatori kvalitete namirnice.....   | 3         |
| 1.3. Suvremena industrijska prerada inćuna.....                                    | 4         |
| 1.4. Konzerviranje ribe mariniranjem .....   | 5         |
| <b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....  | <b>7</b>  |
| 3.1. Reagensi.....   | 7         |
| 3.2. Priprema uzorka.....  | 8         |
| 3.3. Ekstrakcija ukupnih lipida.....   | 10        |
| 3.4. Saponifikacija i derivatizacija .....   | 11        |
| 3.5. Plinska kromatografija.....   | 12        |
| 3.6. Baždarenje, identifikacija i kvantizacija masnih kiselina.....                | 12        |
| 3.7. Mikrobiološka analiza.....  | 15        |
| 3.8. Određivanje masenog udjela proteina.....                                      | 15        |
| 3.9. Reaktivni spojevi tiobarbituratne kiseline .....                              | 16        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....   | <b>17</b> |
| 4.1 Utjecaj začinskih dodataka na profil masnih kiselina mariniranog inćuna .....  | 17        |
| 4.2 Kemijske promjene u kvaliteti mariniranog inćuna tijekom skladištenja .....    | 19        |
| 4.2.1 Masne kiseline.....  | 19        |
| 4.2.2 TBARS/MDA i proteini .....   | 22        |
| 4.3 Mikrobiološke promjene u kvaliteti mariniranog inćuna tijekom skladištenja ... | 25        |
| <b>5. ZAKLJUČAK</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>6. LITERATURA</b> .....   | <b>27</b> |
| <b>POPIS SLIKA</b> .....   | <b>30</b> |
| <b>POPIS TABLICA</b> .....   | <b>31</b> |

# 1. UVOD

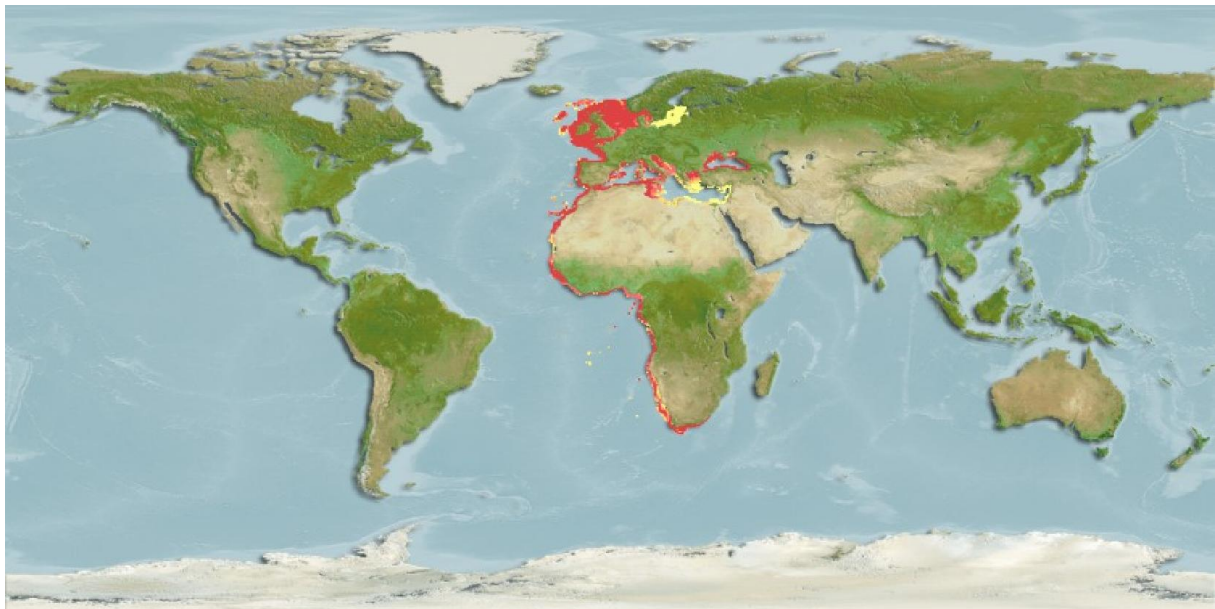
## 1.1. Inćuni *Engraulis encrasicolus*

Inćun je sitna plava riba koja je među najvažnijim ribama u prehrambenom lancu Jadranskog mora. Zelenkasto plave je boje, šiljaste glave s izraženim krupnim očima i vrlo sličan srdeli. Inćun je migratorna vrsta koja se zadržava u velikim jatima u obalnom području i u otvorenim vodama na dubinama od 300m. U hladnijem dijelu godine drži se donjih i pridnenih slojeva mora dok u toplijim mjesecima dolazi u površinski sloj (Jardas, 1996.). Hrani se planktonom, a sam je hrana mnogim predatorima. Vrlo je ukusna riba, a kod nas je cijenjena kao najbolja riba za soljenje. Plava riba se smatra bogatim izvorom proteina i lipida s visokim udjelom polinezasićenih masnih kiselina. Omega-3 masne kiseline imaju iznimno povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje kao što su reguliranje krvnog tlaka, smanjenje depresije te usporavanje napretka nekih tipova karcinoma. Optimalni salinitet i temperatura mora značajno utječu na kvalitetu ribljeg mesa.



Slika 1. Inćun (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758.)

Kao najsjevernija i najproduktivnija zona Sredozemlja, sjeverni Jadran idealno je stanište za postizanje visokog udjela omega-3 masnih kiselina te vitamina topivih u mastima sadržanim u mesu plave ribe. Inćun se lovi mrežama plivaricama i pelagičkim kočama od prve polovice proljeća do druge polovice ljeta. Najveći primjerci inćuna love se krajem zime i početkom proljeća na većim dubinama, a manji su zabilježeni u obalnom području (Sinovčić, 1992.). Hrvatska je u 2013. godini imala udio od 56,75% u ukupnom ulovu sitne plave ribe zemalja Sredozemlja. Ukupan ulov sitne plave ribe zemalja Sredozemlja je u 2004. godini iznosio 527 325 t te je do 2013. pao na 384 893 t. Hrvatska bilježi porast ulova sitne plave ribe s 21 472 t u 2004. na 62 128 tu 2013. godini (Eurostat).



Slika 2. Rastrostranjenost inćuna u svijetu

## 1.2. Indikatori kvalitete namirnice

Inćun je kao i većina ribljih vrsta lako kvarljiva sirovina, prvenstveno zbog bakterijskih i enzimskih procesa kojima pogoduje visoki sadržaj vode i slobodnih aminokiselina u ribljem mesu (Pedrosa-Menabrito i Regenstein, 1988.). Osim sadržaja vode meso ribe ima manje vezivnog tkiva od toplokrvnih životinja pa je stoga podložnije enzimskoj i mikrobiološkoj razgradnji a isto tako i lakše se probavlja.

Kemijski sastav tkiva odrasle jedinke prolazi kroz promjene tijekom sezone ovisno o staništu i fizičkom stanju jedinke u pojedinim razdobljima godine (razvoj gonada, migracija i mrijest), te intenzivnom hranjenju tijekom mrijesta koje traje do ponovnog razvoja gonada (Šimat, 2010.).

U plavoj ribi visoki je sadržaj omega-3 masnih kiselina kao što su i EPA (eikozapentaenoička kiselina) i DHA (dokozaheksaenoička kiselina) koje pozitivno utječu na ljudsko zdravlje. Zbog velikog broja dvostrukih veza unutar lanca masnih kiselina EPA i DHA, riblje masnoće su osjetljive na oksidaciju tijekom transporta, obrade i pohrane. Produkti oksidacije lipida mogu promijeniti kvalitetu hrane: boju, teksturu, okus i miris, često dovode do skraćenja roka trajanja, prihvatljivosti za potrošača, hranjive vrijednosti, sigurnosti te imaju nepovoljno djelovanje na zdravlje čovjeka. Kako bi se spriječila oksidacija lipida upotrebljavaju se razni antioksidansi. Poznato je da alfa-tokoferol (vitamin E) štiti polinezasićene masne kiseline od peroksidacije te ima najveću biološku aktivnost tj. najučinkovitiji je antioksidans topljiv u mastima (Arab-Tehrany i sur. 2012.).

### **1.3. Suvremena industrijska prerada inćuna**

Zbog povećanog trenda zdrave prehrane dolazi do povećanja industrijske proizvodnje prerađenih i polugotovih ribljih proizvoda. Kako bi se očuvala kvaliteta namirnica i spriječilo kvarenje važan je postupak konzerviranja proizvoda. Konzerviranje hrane provodi se na 3 različita načina, fizikalnim, kemijskim (u koji spada mariniranje i soljenje) ili kombiniranim postupkom.

Mariniranje i soljenje najstariji su i najčešći tradicionalni oblici konzerviranja namirnica od mesa koji se u velikoj mjeri za sitnu plavu ribu koriste još i danas. Kao kratkoročna tradicionalna mjera konzerviranja sirove ribe na Mediteranu se koristi mariniranje (do 6 mjeseci). Pored mariniranja, koristi se i soljenje stoljećima kao dugoročna metoda konzerviranja sirove ribe (najčešće srdele i inćuna) koje omogućava čuvanje ribe više od 1 godine.

## 1.4 Konzerviranje ribe mariniranjem

Proces mariniranja jedna je od tradicionalnih metoda konzerviranja hrane koja je popularna u Europi. U tom procesu se obično koristi masna riba kao što je haringa, inćun, sardina ili skuša. Marinirane ribe su obično proizvodi koji su spremni za jelo bez toplinske obrade. Kiselo mariniranje uključuje uranjanje mesa u visoko postotne otopine octa, vina ili voćnih sokova te finalizaciju proizvoda naljevom tog istog sastava. Mariniranje se temelji na smanjenju pH vrijednosti i aktiviteta marinade dodavanjem octa i soli, što rezultira smanjenjem broja mikroorganizama, ali ograničenog roka trajanja (McLay, 1972.).

Korištena je otopina soli NaCl i alkoholnog octa, koja je u početnom postupku mariniranja veće koncentracije nego u kasnijem naljevu te sprječava negativno djelovanje bakterija i enzima (McLay, 1972.). Otopina za mariniranje obično sadrži 4 do 4.5% octene kiseline i 7-8% soli NaCl dok je njihov sadržaj u krajnjem naljevu 1-12,5%, odnosno 2-4% (Šimat 2010.). Octena kiselina u marinadi izaziva denaturaciju bjelačevina i bubrenje strukturalnih bjelančevina pri čemu dolazi do otapanja nekih kolagenih dijelova vezivnog tkiva i mišićnih membrana, te omekšavanja tkiva. Sol također ima ulogu u denaturaciji bjelančevina te u dehidraciji i očvršćivanju konzistencije ribljeg mesa izvlačenjem vode iz njega te dajući mu slanost. Osim sredstva za konzerviranje u marinade se dodaju različiti začini kojima se poboljšava aroma i okus.

Poznati su antioksidativni učinci ružmarina, zbog visokog udjela karnosolne kiseline, flavonoida, triterpena i drugih bioaktivnih spojeva te eteričnih ulja. Kao namirnice prirodno bogate antioksidansima često se spominju i rajčice zbog visokog sadržaja beta karotena, flavonoida i vitamina E (Frusciante i sur. 2007.). Također ljute papričice su poznate po pozitivnom učinku spojeva kapsaicinoida na postojanost masnih kiselina i opće antioksidativno djelovanje. Međutim u postojećoj literaturi je malo podataka o učincima tih namirnica na tradicionalno konzerviranu hranu. U ovom radu provedeni su postupci dodatka raznih začina te je utvrđen njihov utjecaj na promjenu kvalitete proizvoda i na postojanost prilikom skladištenja.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

- 1) Odrediti promjene kvalitativnog sastava masnih kiselina mariniranih inćuna uslijed dodavanja različitih začinskih namirnica
  
- 2) Utvrditi varijabilnost udjela lipida i proteina tijekom skladištenja proizvoda na bazi mariniranih inćuna s odabranim začinskim dodacima.
  
- 3) Utvrditi oksidativnu i mikrobiološku stabilnost uzoraka sa dodatkom začina.

### 3. MATERIJALI I METODE

Različite varijante recepture testirane su uz obogaćenje okusa dodavanjem različitih sastojaka kao što su maslinovo ulje, ružmarin, tartufi, kopar, komorač, češnjak, chili papričice, suhe rajčice, kadulja, majčina dušica, bosiljak te borovica. Kao marinada koristila se marinada s 5%-tnim udjelom octa, te trajanje postupka mariniranja od 22 dana. Nakon 1 mjesec analizirana je riba marinirana sa i bez dodataka te su odabrane recepture (FIM3-FIM5) za analizu postojanosti kvalitete proizvoda.

Referentnim uzorkom smatrani su inćuni spremljeni u smjesi suncokretovog i maslinovog ulja (9:1) bez dodataka (FIM2). Inćuni sa začinskim dodacima su se spremali na isti način prema 3 recepture (FIM3-FIM5):

FIM 1- marinada 5% vinskog octa

FIM 2- marinirani inćuni u smjesi suncokretovog i maslinovog ulja (9:1)

FIM 3- marinirani inćuni u smjesi suncokretovog i maslinovog ulja (9:1) s dodatkom ružmarina

FIM 4- marinirani inćuni u smjesi suncokretovog i maslinovog ulja (9:1) + chilli papričica

FIM 5- marinirani inćuni u smjesi suncokretovog i maslinovog ulja (9:1) + chilli papričica + ružmarin + suhe rajčice

Svaki mjesec kroz 6 mjeseci uzimali su se uzorci u kojima su se određivale masne kiseline.

#### 3.1. Reagensi

U pripremi uzoraka za analizu plinsko tekućinskom kromatografijom korištene su slijedeće kemikalije:

- Natrijev hidroksid (NaOH), 1,2 mol/L, otopljen u metanolu i vodi (CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O 1:1), Kemika
- Kloridna kiselina (HCl), 6mol/L, Kemika
- Bor (III)-fluorid (BF<sub>3</sub>) u metanolu, 14% p.a., Sigma
- Diklor-metan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), p.a., Kemika
- Natrijev sulfat, bezvodni (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), p.a., Kemika



Standardi korišteni u identifikaciji masnih kiselina plinskom kromatografijom:

- F.A.M.E. mix, C18-C20, Supelco
- Cod Liver Oil, prirodni izvor masnih kiselina iz ulja jetre haringe, Sigma
- PUFA 1, Marine SOURCE, smjesa polinezasićenih masnih kiselina morskih organizama, Supelco
- PUFA 3, menhaden Oil, smjesa polinezasićenih masnih kiselina ulja haringe, Supelco
- LIPID STANDARD, Sigma
- Metil ester 13-metilmiristinske kiseline ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), Sigma
- Metil ester palmitoleinske kiseline ( $C_{17}H_{32}O_2$ ), Sigma
- Metil ester arahidonske kiseline ( $C_{21}H_{34}O_2$ ), Sigma
- Metil ester cis-5,8,11,14,17- eikozapentaoenoičke kiseline ( $C_{21}H_{32}O_2$ ), Sigma
- Metil ester cis-4,7,10,13,16,19- dokozaheksaenoičke kiseline ( $C_{23}H_{34}O_2$ ), Sigma
- Metil ester DL- $\beta$ -hidroksimiristinske kiseline ( $C_{15}H_{30}O_3$ ), Sigma

Reagenski korišteni za određivanje proteina:

- Natrijev karbonat, 2 % ( $Na_2CO_3$ )
- Kalij, natrij - tartarat; 2% ( $C_4H_4KNaO_6$ )
- Bakar (II)- sulfat, 1% ( $CuSO_4$ )
- Natrijev hidroksid, 1M (NaOH)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika)

### 3.2. Priprema uzorka

10 jedinki je homogenizirano u kompozitni uzorak koji je tada podijeljen na poduzorke. Voda iz uzorka uklonjena je liofilizacijom. Sadržaj vlage određen je gravimetrijski, vaganjem uzorka na analitičkoj vazi prije i nakon liofilizacije. Do daljnje kemijske obrade i analize osušeni materijal je čuvan u praškastom stanju na  $-20^{\circ}C$ . Mehanički postupak usitnjavanja liofiliziranog uzorka prikazan je na Slici 3.

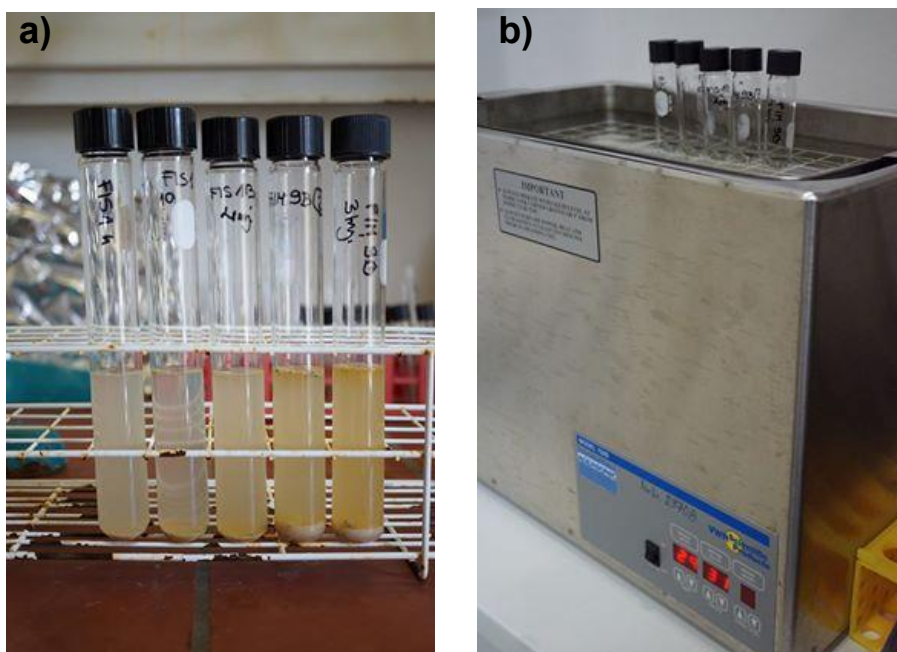


Slika 3. a) Liofilizirani grubo usitnjeni uzorci b) Tarionik za izradu usitnjenog praškastog uzorka c) Izrada praškastog uzorka d) Usporedba je u različitoj granulaciji

Masnoće sadržane u mesu ribe sastoje se od zasićenih, mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina u varijabilnom omjeru. Profil masnih kiselina je C4 – C22 duljine karboksilnih lanaca. Određuju se iz ukupnog lipidnog ekstrakta, nakon postupka saponifikacije i derivatizacije, metodom plinske kromatografije uz detekciju masenom spektroskopijom (GC/MS). Ukupni lipidi određeni su gravimetrijski nakon ekstrakcije i uparavanja otapala u rotavaporu.

### 3.3. Ekstrakcija ukupnih lipida

Ukupni lipidi su iz prethodno pripremljenog uzoraka u praškastom stanju izdvojeni metodom ekstrakcije organskim otapalima po Bligh&Dier (1959.). Ova metoda primjenjuje smjesu diklormetana i metanola (DCM:MeOH) u omjeru 2:1 (vol/vol). Uzorak homogenata mase 2 mg stavi se u Pyrex epruvete, doda se smjesa otapala i inkubira se u ultrazvučnoj kupelji kroz 2-3 sata. Zatim slijedi centrifugiranje 5 min na 1000 g pri sobnoj temperaturi (Slika 4.). Odvaja se donja organska faza u lijevcima za odjeljivanje (Slika 5.). Postupak se ponavlja 3 puta s čistim DCM zbog postizanja maksimalnog iskorištenja ekstrakcije. Dobiveni ekstrakti sjedine se u staklenu epruvetu s čepom te se doda bezvodni natrijev-sulfat i ostavlja na 4°C preko noći kako bi se iz uzorka odstranio višak vode. U međuvremenu se pripremaju i važu epruvete za uparavanje. U njih se profiltrira organska faza te se upari do suhog u vakuum uparivaču, rotavaporu (Büchi, Njemačka). Ponovnim vaganjem epruvete gravimetrijski se određuje masa ukupnih lipida u uzorku koja se izražava po gramu vlažnog tkiva. Ekstrahirani lipidi koriste se za daljnje određivanje sastava masnih kiselina.



Slika 4. Uzorci spremni za ekstrakciju (a) epruvetama sa smjesom diklormetana i metanola (b) inkubiraju se u ultrazvučnoj kupelji



Slika 5. U uzorcima se odvaja organska faza (donja) i voda (gornja) u lijevcima za odjeljivanje

### 3.4. Saponifikacija i derivatizacija

U staklene epruvete s uparenom lipidnom frakcijom dodano je 1 mL 1,2 M metanolne NaOH te su stavljane u termostat na 70°C kroz 30 min. Zatim se uzorak hladi, zakiseli s 1 mL 6M HCl i doda se 2 mL 14% BF<sub>3</sub> u metanolu. Epruvete se ponovno čvrsto zatvore, dobro protresu te vrata u termostatna još 10 minuta. Nakon ponovnog hlađenja u uzorak se dodaje 4 mL DCM i dobro promućka. Uzorak se centrifugira 15 minuta na 3000 g pri 4°C. Odbaci se gornja vodena faza, a sačuva donja organska faza. Organska faza se uz pomoć nabranog filter papira propusti kroz kristalni Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrid. Za potrebe kromatografske analize uzorak se ponovno otopi u 200 µL pogodnog otapala (DCM). Do analize čuva se na -20°C.

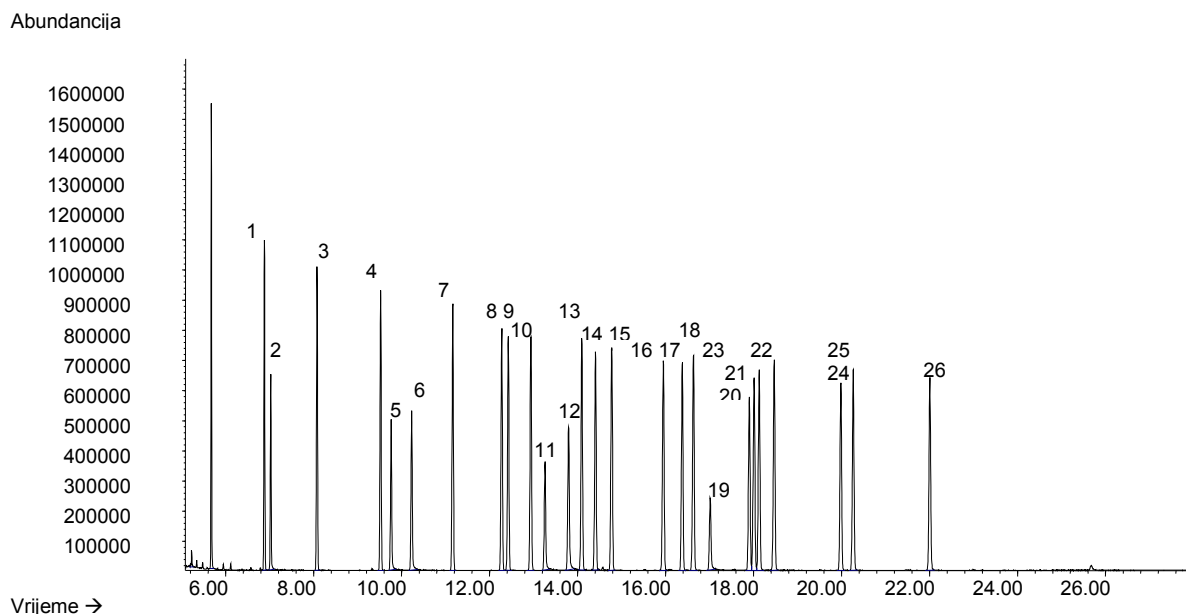
### 3.5. Plinska kromatografija

Masne kiseline analiziraju se na Agilent plinsko-tekućinskom kromatografu (GLC) 6890 N GC System opremljenom s 5973 Network maseno selektivnim detektorom (MSD), kapilarnom kolonom (25m x 0.3mm x 0.25 $\mu$ m; cross-linked 5 % phenylmethylsiloxane) i ultra čistim helijem kao plinom nosiocem. GLC podešenja su programirana na rast temperature kolone od 145°C brzinom 4°C /min do 270°C pri konstantnom tlaku 2,17 kPa. Vrijeme zadržavanja, površina pikova i maseni spektri snimljeni su pomoću Chemstation računalnog alata. Metilni esteri masnih kiselina su identificirani pomoću podataka masenih spektara i ekvivalentne dužine lanaca za GC standarde na korištenoj GC koloni.

### 3.6. Baždarenje, identifikacija i kvantizacija masnih kiselina

Unutar jednog dana vremena zadržavanja ( $t_R$ ) svakog pika na ponovljenim kromatogramima istog standarda ne bi smjela odstupati više od 0,005 minuta između pojedinih mjerenja.

Kao kvalitativni standardi korišteni su: prirodna smjesa masnih kiselina iz ulja jetre haringe, smjesa polinezasićenih masnih kiselina morskih organizama i smjesa polinezasićenih masnih kiselina ulja haringe. Kvalitativni Supelcov standard masnih kiselina C4-C24 (FAME mix) sadrži smjesu metilnih estera najčešćih zasićenih i nezasićenih masnih kiselina (Slika 6). Određena masa standarda otopi se u pogodnom otapalu (diklor-metan). U kromatograf se uštrca 1  $\mu$ L otopine standarda. Redoslijed eluiranja kiselina na koloni naveden je od proizvođača standarda za odgovarajuću kolonu. Na fenil-metil-siloksan koloni hidroksi- kiseline (kao polarnije) izlaze nakon zasićenih nesupstituiranih kiselina s istim brojem ugljikovih atoma u lancu. Za neke specifične masne kiseline koje se ne nalaze u Sigminom standardu korišteni su drugi standardi razgranatih, hidroksi- i polinezasićenih kiselina.



Slika 6. Kromatogram standardne smjese metilnih estera masnih kiselina iz prirodnog izvora (Cod Liver Oil, Supelco kvalitativni standard) na metil-fenil-siloksan kapilanoj koloni (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m)

Pomoću vremena zadržavanja ( $t_R$ ) može se izračunati indeks ekvivalentne dužine lanca, EDL (Equivalent Chain Length, ECL; Miller 1985.) estera masnih kiselina standarda. Za određeni temperaturni program EDL je pokazatelj mjesta na kojem izlazi ester određene masne kiseline u odnosu na seriju zasićenih ravnolančanih metil estera. EDL indeks estera ravnolančanih zasićenih masnih kiselina jednak je broju ugljikovih atoma njihovih kiselina, dok se za ostale metilne estere masnih kiselina računa linearnom interpolacijom između zasićenih ravnolančanih kiselina:

$$EDL_x = \frac{t_{R_x} - t_{R_n}}{t_{R_{n+1}} - t_{R_n}} + n$$

$t_{R_x}$ - vrijeme zadržavanja metilnog estera x

$t_{R_n}$ - vrijeme zadržavanja C<sub>n</sub>:0, zasićenog ravnolančanog metilnog estera koji prethodi metilnom esteru x

$t_{R_{n+1}}$ - vrijeme zadržavanja C<sub>n+1</sub>:0, ravnolančanog zasićenog metilnog estera masne kiseline koji izlazi nakon metilnog estera

Tablica 1. Faktori odziva (F.O. ng/integriranoj površini) i pripadajuće EDL vrijednosti standarda.

|            | Ekvivalentna dužina lanca (EDL) | Faktor odziva (FO) / *10 <sup>-13</sup> | Sistematski naziv                                |
|------------|---------------------------------|---|--|
|            |                                 |   | <b>Zasićene masne kiseline</b>                   |
| 14:0       | 14.000                          | 4,02                                    | Tetradekanoička kiselina                         |
| 15:0       | 15.000                          | 3,26                                    | Pentadekanoička kiselina                         |
| 16:0       | 16.000                          | 4,77                                    | Heksadekanoička kiselina                         |
| 17:0       | 17.000                          | 3,75                                    | Heptadekanoička kiselina                         |
| 18:0       | 18.000                          | 5,14                                    | Oktadekanoička kiselina                          |
| 19:0       | 19.000                          | 3,75                                    | Nonadekanoička kiselina                          |
| 20:0       | 20.000                          | 3,70                                    | Eikozanoička kiselina                            |
| 22:0       | 22.000                          | 3,91                                    | Dokozanoička kiselina                            |
| 24:0       | 24.000                          | 3,09                                    | Tetrakozanoička kiselina                         |
|            |                                 |   | <b>Razgranate masne kiseline</b>                 |
| 14:0 iso   | 13.618                          | 4,02                                    | 12-metiltridekanoička kiselina                   |
| 15:0 iso   | 14.633                          | 3,26                                    | 13-metiltetradekanoička kiselina                 |
| 15:0 ai    | 14.724                          | 3,26                                    | 12-metiltetradekanoička kiselina                 |
| 16:1iso    | 15.39                           | 3,26                                    | 14-metilpentadecenička kiselina                  |
| 16:0 iso   | 15.627                          | 3,26                                    | 14-metilpentadekanoička kiselina                 |
| 17:0 iso   | 16.641                          | 3,26                                    | 15-metilheksadekanoička kiselina                 |
| 17:0 ai    | 16.732                          | 3,26                                    | 14-metilheksadekanoička kiselina                 |
| 19:0iso    | 18.631                          | 3,75                                    | 17-metiloktanoička kiselina                      |
|            |                                 |   | <b>Nezasićene masne kiseline</b>                 |
| 14:1       | 13.863                          | 4,02                                    | Tetradecenička kiselina                          |
| 15:1       | 14.863                          | 3,26                                    | Pentadecenička kiselina                          |
| 16:1       | 15.774                          | 3,26                                    | Heksadecenička kiselina                          |
| 16:1(n-7)c | 15.815                          | 3,26                                    | Cis-9-heksadecenička kiselina                    |
| 16:1(n-7)t | 15.855                          | 3,26                                    | Trans-9-heksadecenička kiselina                  |
| 17:1c      | 16.783                          | 3,26                                    | Cis-heptadecenička kiselina                      |
| 17:1t      | 16.852                          | 3,26                                    | Trans-heptadecenička kiselina                    |
| 18:2(n-6)  | 17,69                           | 5,69                                    | Cis,cis-9,12-oktadekadienička kiselina           |
| 18:1(n-9)c | 17.767                          | 3,82                                    | Cis-9-oktadecenička kiselina                     |
| 18:1(n-7)c | 17.810                          | 3,82                                    | Cis-11-oktadecenička kiselina                    |
| 18:1(n-9)t | 17.857                          | 3,82                                    | Trans-9-oktadecenička kiselina                   |
| 19:1t      | 18.817                          | 3,26                                    | Nonadecenička kiselina                           |
| 20:5(n-3)  | 19.459                          | 5,55                                    | Cis,cis-5,8,11,14,17-eikoza-pentaenička kiselina |
| 20:4(n-3)  | 19.544                          | 4,98                                    | Cis,cis-8,11,14,17-eikoza-tetraenička kiselina   |
| 20:2(n-6)  | 19.719                          | 3,51                                    | Cis-11,14-eikoza-dienička kiselina               |
| 20:1(n-9)  | 19.763                          | 1,60                                    | Cis-11-eikozaenička kiselina                     |
| 20:1(n-7)  | 19.809                          | 1,60                                    | Cis-13-eikozaenička kiselina                     |
| 22:2(n-6)  | 21.229                          | 3,80                                    | Cis-13,16-dokozaenička kiselina                  |
| 22:6(n-3)  | 21.333                          | 5,37                                    | Cis,cis-4,7,10,13,16,19-dokoza-heksaenička kis.  |
| 22:1(n-9)  | 21.757                          | 2,37                                    | Cis-13-dokozaenička kiselina                     |
| 24:1       | 23.756                          | 2,82                                    | Tetrakozaenička kiselina                         |

### **3.7. Mikrobiološka analiza**

500 mg homogeniziranog uzorka razrijedi se u 5 mL destilirane H<sub>2</sub>O (sterilizirane autoklaviranjem) s dodatkom 0,85% NaCl. Uzorak se dodatno homogenizira i razrijedi 10x. Po 100 µL tako pripremljenog uzorka razmaže se na NOACK gotove podloge za testiranje aeroba, kvasca i plijesni, *Lactobacillus* sp. i *E. coli*. Podloge se inkubiraju 48 sati na 37°C. Nakon inkubacije broj razvijenih kolonija se preračuna u broj stanica /g uzorka (CFU, eng. colony forming units).

### **3.8. Određivanje masenog udjela proteina**

Količina proteina određivana je spektrofotometrijski metodom po Lowry-u (1951.) u supernatantu nakon centrifugiranja homogenata tkiva na 10 000 g tijekom 30 minuta. Koncentracija proteina izražena je u miligramima proteina po gramu vlažnog tkiva (mg proteina/g tkiva). Kao standard korišten je albumin goveđeg seruma (SigmaAldrich, Njemačka).



### **3.9. Reaktivni spojevi tiobarbituratne kiseline**

Za određivanje TBARS (reaktivni spojevi tiobarbituratne kiseline), korišteni su pojedinačni uzorci fileta inćuna. U staklenoj epruveti koja je sadržavala tkivo mase 10 g, dodaje se 25 ml otopine trikloroctene kiseline (20% w/v) i 100  $\mu$ L 0.01% otopine BHT (butilirani hidroksitoluen) u etanolu, kako bi se spriječila autooksidacija masnih kiselina u uzorku. Smjesa dobivena homogeniziranjem tkiva se filtrira (grubi filter papir), nakon čega se u 1 ml filtrata pročišćenog od grubih dijelova tkiva dodaje jednak volumen 0,02 M otopine tiobarbituratne kiseline (TBA). Mješavina se inkubira 60 minuta na 100° C. Paralelno sa uzorcima, na isti način priređeno je serijsko razrjeđenje malonildialdehid (MDA) standarda, u rasponu koncentracija od 0 do 250  $\mu$ M. Kao MDA standard korišten je reagens 1,1,3,3-tetrametoxypropan. Nakon inkubacije, uzorci i serijska razrjeđenja standarda se hlade 10 minuta na ledu i potom centrifugiraju na 10000 g. Uzorci i standardi se ispipetiraju u mikrotitarsku ploču nakon čega se apsorbancija mjeri na valnim duljinama od 530 i potom 620 nm. Vrijednosti apsorbancije na 620 nm, oduzimaju se od vrijednosti na 530nm, nakon čega se iz standardne krivulje očitaju vrijednosti koncentracije TBARS.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

### **4.1 Utjecaj začinskih dodataka na profil masnih kiselina mariniranog inćuna**

Začinski dodatci koji doprinose očuvanju nezasićenih masnih kiselina jesu ružmarin, chilli papričica i motara, dok s dodatkom majčine dušice, kadulje i borovice znatno raste udio zasićenih masnih kiselina. Do velikog gubitka polinezasićenih masnih kiselina dolazi uz dodatak majčine dušice, kadulje i borovice, te su ocijenjene kao neprihvatljive kao dodatak u proizvode.

Tablica 2. Profil masnih kiselina mariniranih inćuna nakon 1 mjeseca stajanja u smjesi suncokretovog i maslinovog ulja (9:1<sub>vol/vol</sub>) uz dodatak začina: ružmarin, motar, majčina dušica, kadulja, borovica, chilli papričica

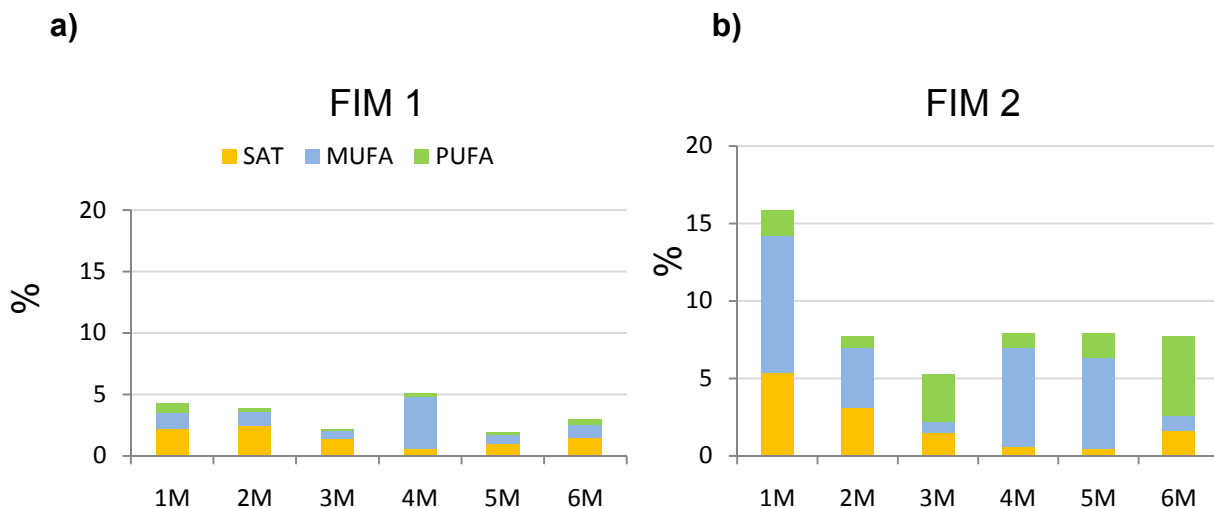
|                                  | marinirani inćuni 11.mj |              |              | majčina |         |          | Chilli papričica |
|----------------------------------|-------------------------|--------------|--------------|---------|---------|----------|------------------|
|                                  | Istra                   | ružmarin     | motar        | dušica  | kadulja | borovica |                  |
| <b>C14:0</b>                     | 2,45                    | 2,73         | 6,35         | 2,62    | 2,66    | 2,55     | 6,58             |
| <b>C16:1cis (n-7)</b>            | 1,83                    |              | 6,66         | 2,86    | 3,19    | 3,26     | 7,88             |
| <b>C16:1cis (n-9)</b>            |                         | 3,72         | 0,50         |         |         |          |                  |
| <b>C16:1trans (n-9)</b>          |                         |              |              |         |         |          |                  |
| <b>C16:0</b>                     | 27,30                   | 19,46        | 36,98        | 25,62   | 25,14   | 24,05    | 35,81            |
| <b>C17:1</b>                     |                         |              | 0,41         | 0,57    | 1,76    | 1,56     |                  |
| <b>C17:0</b>                     | 0,99                    |              | 1,42         | 0,58    | 0,56    | 1,11     | 1,42             |
| <b>C18:3(cis,cis,cis 6,9,12)</b> |                         |              | 3,05         |         |         |          | 2,93             |
| <b>C18:2(cis,cis 9,12)</b>       | 11,51                   | 14,80        | 2,82         |         |         |          | 2,61             |
| <b>C18:1 CIS</b>                 | 7,67                    | 17,66        | 7,94         |         |         |          | 8,17             |
| <b>C18:1 TRANS</b>               | 3,41                    | 7,00         | 4,83         |         |         |          | 4,65             |
| <b>C18:1</b>                     | 5,97                    | 3,12         | 0,00         | 55,91   | 45,15   | 46,44    | 0,00             |
| <b>C18:0</b>                     | 5,08                    | 12,02        | 9,73         | 2,22    | 10,21   | 9,53     | 9,42             |
| <b>C20:4(n-6)</b>                | 1,18                    |              | 0,56         | 1,45    | 1,43    | 1,07     | 0,56             |
| <b>C20:5(n-3)</b>                | 5,07                    | 3,87         | 4,71         |         |         | 1,74     | 4,77             |
| <b>C20:3(n-6)</b>                |                         |              |              |         | 0,77    | 0,65     |                  |
| <b>C20:3(n-3)</b>                | 0,00                    | 5,90         | 0,40         | 2,43    | 2,40    | 0,25     | 0,40             |
| <b>C20:2(n-6)</b>                |                         |              | 0,29         | 1,60    | 1,41    | 2,95     | 0,31             |
| <b>C20:1(n-7)</b>                | 0,00                    | 1,43         | 0,66         | 0,33    | 0,35    | 0,30     | 0,70             |
| <b>C20:0</b>                     |                         | 0,17         | 0,41         | 0,74    | 0,92    | 0,77     | 0,47             |
| <b>C22:6(n-3)</b>                | 26,60                   | 3,68         | 9,54         | 0,00    | 0,83    | 0,66     | 10,20            |
| <b>C22:3(n-6)</b>                | 0,58                    |              | 0,35         |         |         |          | 0,37             |
| <b>C22:2(n-6)</b>                |                         | 0,46         | 1,35         |         |         |          | 1,43             |
| <b>C22:1(n-7)</b>                | 0,37                    | 0,20         | 0,00         | 0,21    | 0,34    | 0,41     | 0,21             |
| <b>C22:0</b>                     |                         | 1,95         |              | 2,02    | 1,93    | 1,84     |                  |
| <b>C24:1</b>                     |                         | 0,42         | 0,89         | 0,27    | 0,35    | 0,30     | 0,90             |
| <b>C24:0</b>                     |                         | 0,60         | 0,13         | 0,60    | 0,61    | 0,57     | 0,22             |
| <b>zasićene mk (%)</b>           | <b>35,82</b>            | <b>36,93</b> | <b>44,56</b> | 65,04   | 56,23   | 58,02    | <b>46,09</b>     |
| <b>Mononezasićenemk (%)</b>      | <b>19,24</b>            | <b>33,56</b> | <b>21,89</b> | 60,13   | 51,14   | 52,28    | <b>22,51</b>     |
| <b>Polinezasićenemk (%)</b>      | <b>44,94</b>            | <b>28,87</b> | <b>23,07</b> | 5,48    | 6,85    | 7,31     | <b>23,57</b>     |
| <b>ω-6 polinezasićenemk (%)</b>  | <b>1,76</b>             | <b>15,26</b> | <b>5,60</b>  | 3,05    | 3,61    | 4,66     | <b>5,59</b>      |
| <b>ω-3 polinezasićenemk (%)</b>  | <b>31,66</b>            | <b>13,45</b> | <b>14,65</b> | 2,43    | 3,24    | 2,64     | <b>15,37</b>     |

## 4.2 Kemijske promjene u kvaliteti mariniranog inćuna tijekom skladištenja

Tijekom skladištenja uzorka, propadaju masne kiseline i to se odražava na kvalitetu mariniranog inćuna. Kemijska promjena autooksidacija dešava se u dugotrajnom kontaktu nezasićenih masnih kiselina s kisikom iz zraka. Drugi oblik propadanja masnih kiselina je autoliza masti koja je najčešće uzrokovana enzimskim djelovanjem mikroorganizama (Šimat 2009.). Indikatori oksidativnog djelovanja, odnosno parametri koji su mjereni su: ukupni udio masnoća, promjene u zasićenosti masnih kiselina; saturirane (SAT), monozasićene (MUFA) i polizasićene (PUFA), promjene udjela proteina i koncentracija reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline (TBARS).

### 4.2.1 Masne kiseline

Korisnost ulja kao konzervacijskog sredstva, učinak ulja na odnos zasićenih i nezasićenih masnih kiselina te učinak djevičanskog maslinovog ulja na postojanost sastava, zasićenost i omjer masnih kiselina prikazani su na Slici 7.

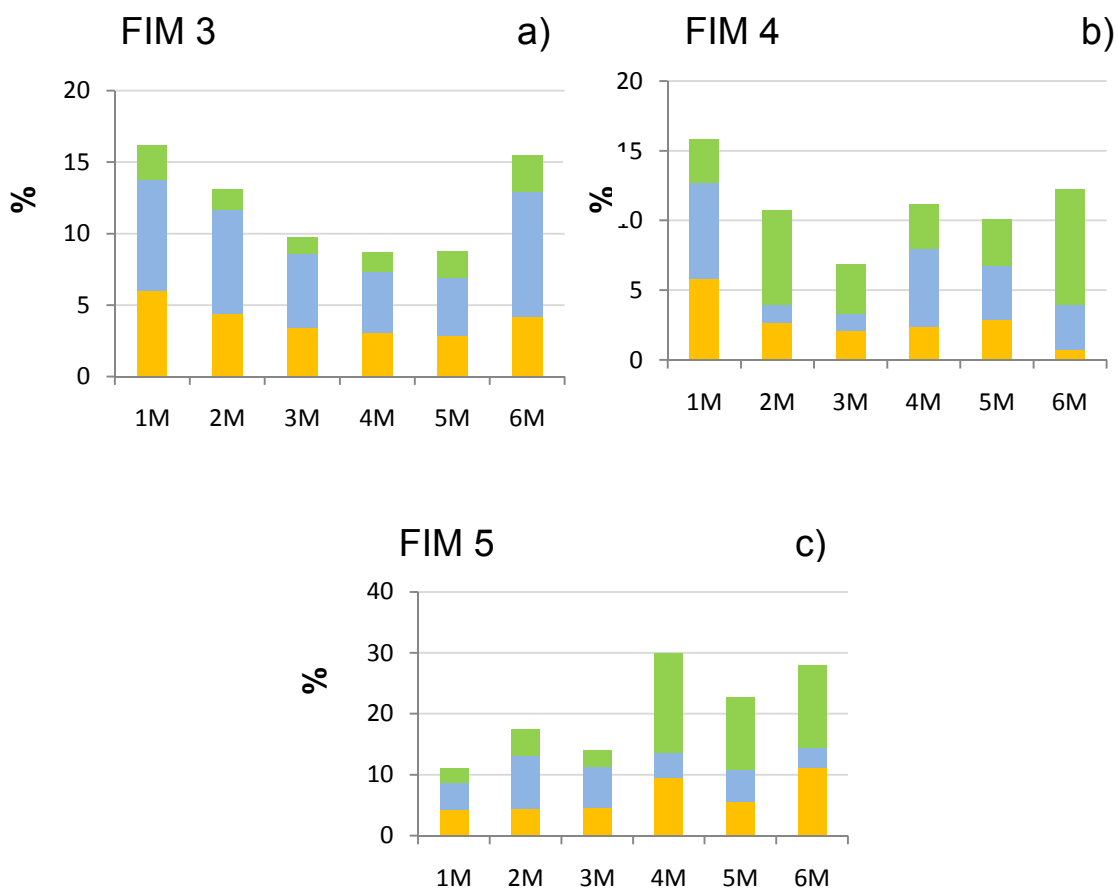


Slika 7. Udjeli masnih kiselina (%) u vremenu (mjeseci) tijekom skladištenja na +4°. a) Marinirani proizvod pohranjen u marinadi i b) marinirani proizvod pohranjen u smjesi suncokretovog i maslinovog ulja (9:1)

U inćunima mariniranim u octu udio masnoća u tkivu iznosi  $\leq 5\%$ . Iz grafičkog prikaza vidljivo je da se konzerviranjem u ulju proizvod obogaćuje nezasićenim masnoćama, zbog apsorpcije ulja u meso ribe. Nakon 2 mjeseca skladištenja proizvoda FIM2 dolazi do smanjenja ukupnog udjela lipida. Pad udjela masnoća u uzorku u odnosu na 1. mjesec sa 16% na 5-8% posljedica je uspješnijeg ocijeđena uzorka prilikom pripreme uslijed gubitka konzistencije mesa kroz 2 mjeseca skladištenja u ulju.

Na Slici 8. prikazan je utjecaj začinskih dodataka ružmarina, chilli papričica i suhих rajčica na postojanost sastava masnih kiselina u proizvodu (FIM3-FIM5). Prisutnost ružmarina kao začinskog dodataka u proizvodu FIM3 (Slika 8.a) utječe na očuvanje polinezasićenih masnih kiselina. Nakon primarne apsorpcije i porasta masnoća u tkivu do 16% dolazi do kontinuiranog pada udjela masnoća do minimalnih 9% u 4. i 5. mjesecu skladištenja, što upućuje na konstantnu konzistenciju u periodu 3. - 5. mjeseca. Nadalje, u 6. mjesecu uočen je ponovni znatni porast udjela masnoća, kao vjerojatna posljedica gubitka konzistencije (opaženo senzoričkim pokusima kušanjem) chili papričica.

Nasuprot ružmarinu, dodatak chilli papričica (FIM4, Slika 8.b) i suhих rajčica (FIM5, Slika 8.c) narušavaju konzistentnost tkiva što se odražava kroz varijabilnost apsorpcije masnoća. U proizvodu s dodatkom chilli papričica opažen je porast udjela PUFA (Slika 9.b.) i do 8%. Apsorpcija ulja pored obogaćenja masnim kiselinama iz ulja doprinosi i obogaćenju PUFA iz chilli papričica koje su opisane u literaturi bogat izvor 18:2 (n-6) i 18:3 (n-3) masnih kiselina (de Souza *et al.* 2015.).



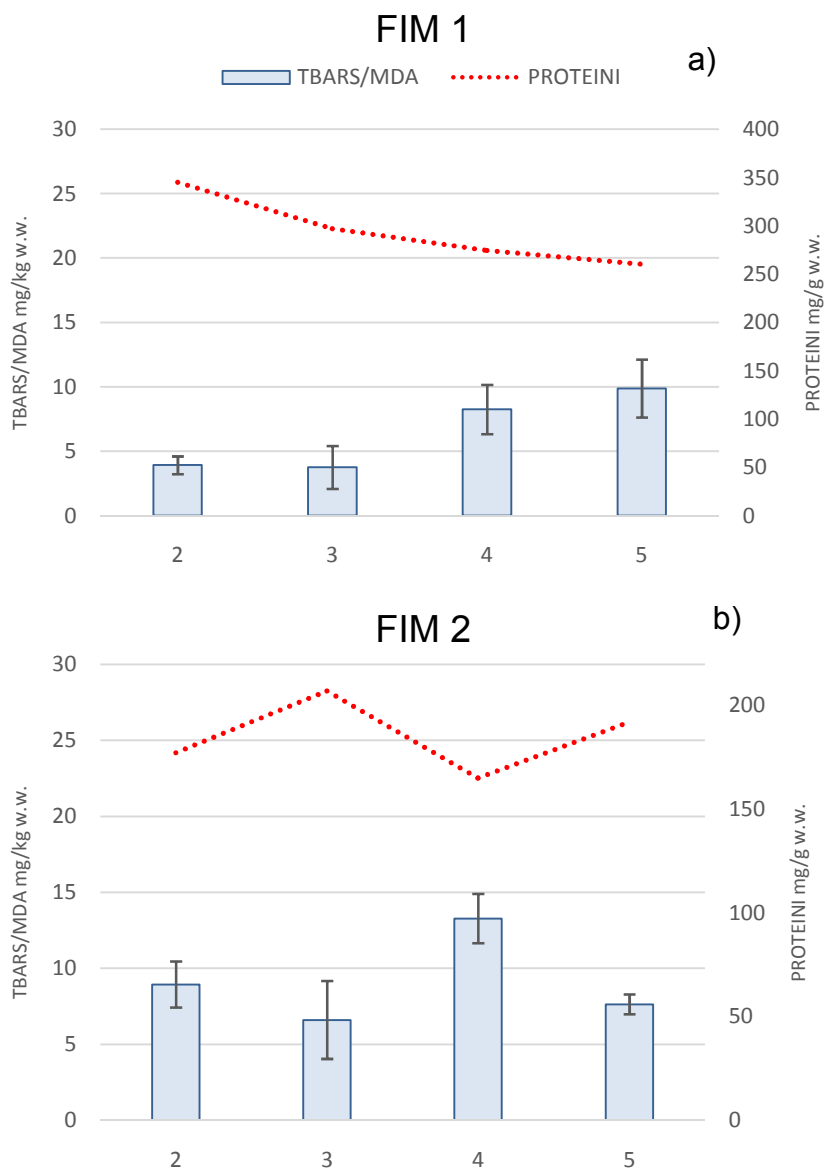
Slika 8. Udjeli masnih kiselina (%) u vremenu (mjeseci) tijekom skladištenja na +4°. a) Učinak ružmarina, b) chilli papričica i c) smjese ružmarina, chilli papričica i suhih rajčica na stabilnost masnih kiselina.

Prema literaturnim podacima sjeme chilli papričice sadrži do 21% ukupnih lipida od čega do 75% može biti polinezasićenih masnih kiselina (Jarret i sur 2013.). Najveći stupanj apsorpcije ulja u tkivo zabilježen je u proizvodu FIM5 (Slika 9.c) usljed dodatka suhih rajčica. Proizvod je obogaćen polinezasićenim masnoćama u udjelu 11-15% nakon 4. mjeseca skladištenja.

#### 4.2.2 TBARS/MDA i proteini

Reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline (TBARS) vrijedan su parametar za prepoznavanje stupnja autooksidacije masti, odnosno užeglosti masti (Šimat i sur. 2009.). Stupanj oksidacije masti nastale tijekom prerade ili skladištenja proizvoda od mariniranih inćuna FIM1-FIM5 određivali smo mjerenjem koncentracije sekundarnih produkata lipidne oksidacije nezasićenih masnih kiselina, malonaldehida (MDA), tiobarbituratnim testom. Na Slici 9. prikazana je usporedba inćuna čuvanih u marinadi (a) i u ulju (b), dok je na Slici 10. prikazan utjecaj začinskih dodataka. Koncentracija MDA kod mariniranih inćuna mijenja se tijekom skladištenja ovisno o recepturi. Početne vrijednosti najniže su kod FIM1 i FIM4 (4 mg/g), dok većina receptura u ulju (FIM2, FIM3 i FIM5) ima višu početnu vrijednost (8-9 mg/g) zbog visokog udjela ulja. Postojani rast TBARS bilježi se kod recepture koja je samo u marinadi (FIM1) dok je uz ulje kao konzervacijski medij zabilježen skok vrijednosti u 4. mjesecu, sve ostale vrijednosti <10 mg/g. U recepturama FIM3, FIM4 i FIM5 dolazi do blagog variranja TBARS/MDA tijekom vremena skladištenja, no vrijednosti su relativno niske od 4 do maksimalno 8 mg/g (FIM3 u 4. mjesecu uzorkovanja), sve vrijednosti TBARS/MDA su daleko ispod uobičajenog dozvoljenog standarda koji iznosi 2 mg/kg.

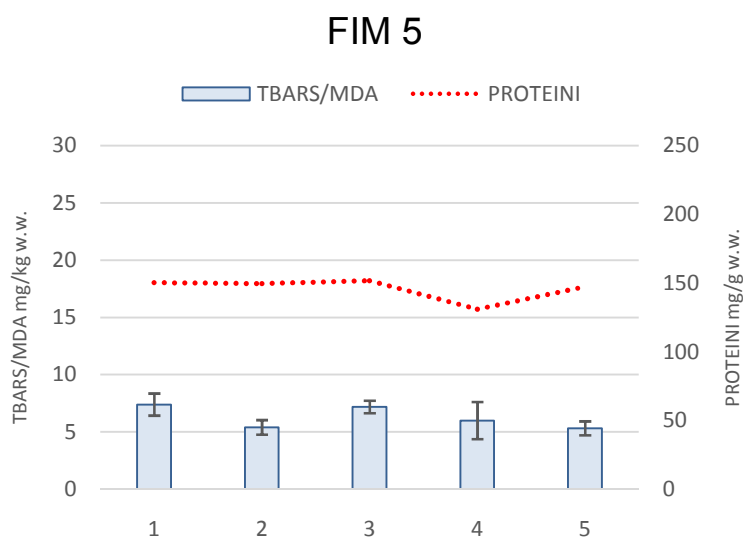
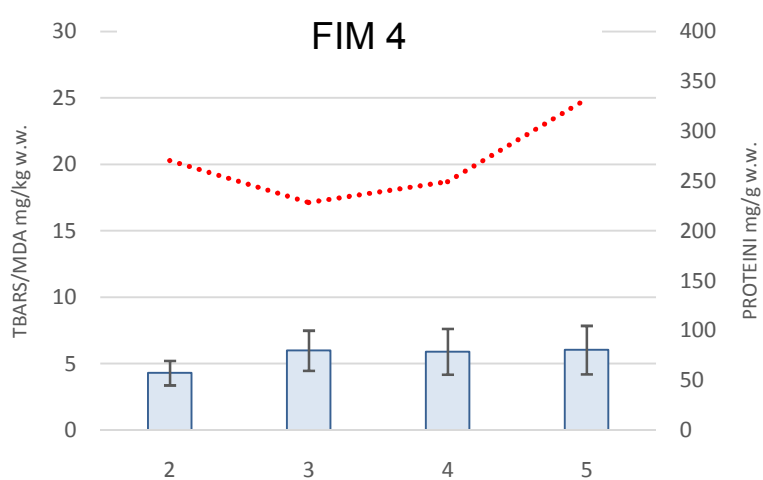
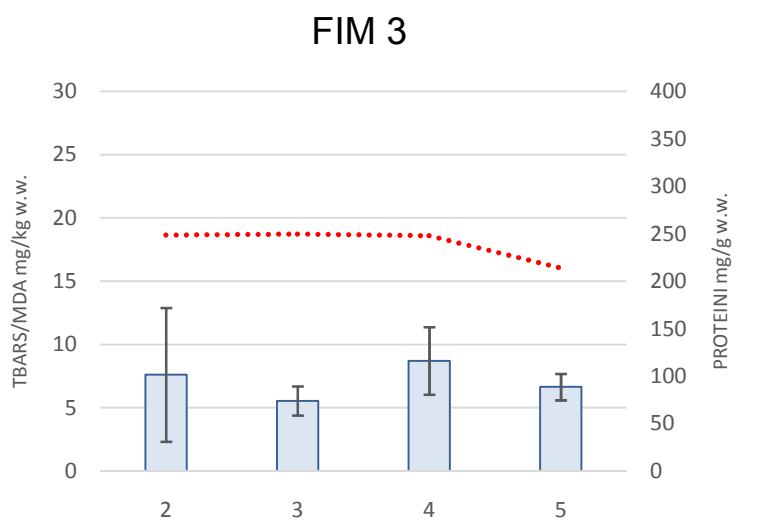
U svim recepturama proteini su veoma stabilni tijekom vremena skladištenja, s najvišom vrijednošću u prvih mjesec dana od 340 mg/g u octenoj marinadi (FIM1), što skladištenjem blago pada do 260 mg/g (Slika 9.).



Slika 9. Koncentracija TBARS/MDA i proteina. a) Marinirani proizvod pohranjen u marinadi i b) marinirani proizvod pohranjen u smjesi suncokretovog i maslinovog ulja (9:1)

Usljed razrjeđenja različitim dodatcima u recepturama FIM3-FIM5 (Slika 10.) dolazi do smanjenja relativnog udjela proteina u konačnom proizvodu ali su tijekom vremena skladištenja promjene male.

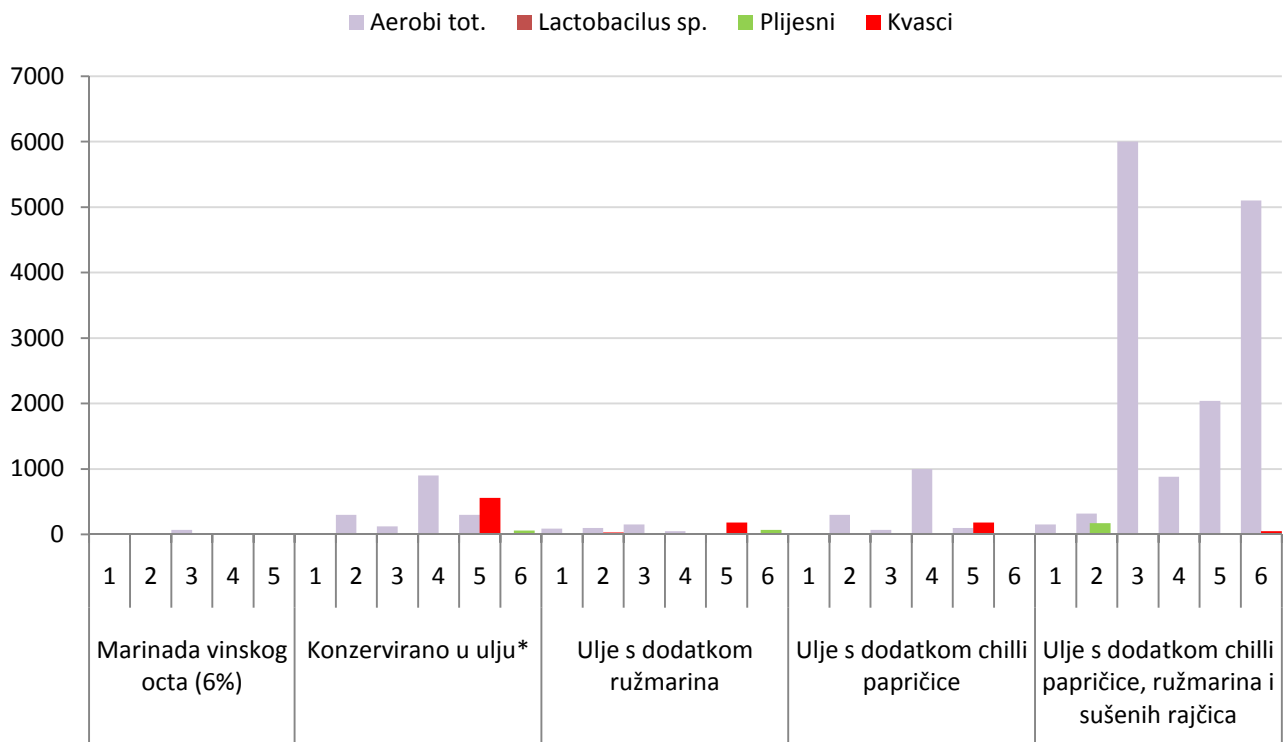




Slika 10. Koncentracija TBARS/MDA i proteina. a) Učinak ružmarina, b) chilli papričica i c) smjese ružmarina, chilli papričica i suhих rajčicana stabilnost proteina i autooksidaciju

### 4.3 Mikrobiološke promjene u kvaliteti mariniranog incuna tijekom skladištenja

Dodatkom ružmarina proizvod se stabilizira što potvrđuje i analiza mikrobne aktivnosti u proizvodima (Slika 11). Znatno manji broj aerobnih bakterija zabilježen je u proizvodu s dodatkom ružmarina, gotovo jednak onome u samoj octenoj kiselini. Sa uvođenjem suhih rajčica u proizvod koje, nisu bile prethodno sterilizirane, narušava se mikrobiološka kvaliteta, nema aktivnog procesa u proizvodu, niti degradacije masnoća. Sve vrijednosti uzgojivih mikroorganizama su daleko ispod granica maksimalno dozvoljenih za propisanu sukladnost prehrambenih proizvoda. U mariniranim proizvodima uzgojive bakterije roda *Lactobacillus* nisu pronađene. U niti jednom uzorku nije pronađena entero bakterija *E. coli*.



Slika 11. Ukupni aerobi, plijesni, kvasci i *Lactobacillus* sp., u različitim recepturama izražena kao broj stanica koje formiraju kolonije (CFU)/1g

## 5. ZAKLJUČAK

1. Ružmarin, motar i chilli papričica najviše doprinose očuvanju nezasićenih masnih kiselina, u postupku mariniranja inćuna.
2. Čuvanje mariniranih proizvoda u smjesi suncokretovog i maslinovog ulja s dodatkom ružmarina i chilli papričice pokazalo je očuvanje izvornih masnoća i proteina iz mesatijekom 6 mjeseci. Niti u jednom proizvodu tijekom ispitivanja nije primijećen razvoj procesa autooksidacije.
3. Pokazano je da uz prisutnost začina u proizvodu dolazi do veće apsorpcije ulja u meso ribe i obogaćenja sastojcima sadržanim u ulju.
4. Mikrobiološka analiza pokazala je da dodani ružmarin djeluje inhibirajuće na rast aerobnih bakterija, dok se dodatkom suhih rajčica povećava rizik od mikrobne aktivnosti. Sve vrijednosti mikrobioloških pokazatelja su u svim ispitanim proizvodima sukladne propisanim standardima.

## 6. LITERATURA

Albert, B. B., i sur., (2015.), Fish oil supplements in New Zealand are highly oxidised and not meet label content of n-3 PUFA, Scientific reports.

Arab-Tehrany E., i sur., (2012.), Beneficial effect and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, Trends in Food Science and Technology 25 24-33.

Brink, B., Damirik, C., Joosten, H. M. L. J., Huis int Veld,, J. H. J. (1990.) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. Int.J. Food Microbiol. (11), 73-84

Duyar, H. A., Eke, E., (2009.) Production and quality determination of marinade from different fish species, Journal of animal and veterinary advances 8 (2):270-275.

Gokoglu N., Cengiz E., Yerlikaya P., (2002.) Determination of the shelf life of marinated sardine (*Srdina pilchardus*) stored at 4, Food Control 15, 1-4.

Jardas, I. (1996.), Jadranska ihtiofauna, Školska knjiga, Zagreb str.533

Kilinc B., Cakli S., (2004.) Chemical, microbiological and sensory changes in thawed frozen fillets of sardine (*Sardina pilchardus*) during marination, Food Chemistry 88 275-280.

Karnop, G. (1988.) Histamine in saltsardellen. Archiv für Lebensmittelhygiene, (38), 57-84

Levy, I. J., Potter, T. L., Cermak, S. C. (2013.) Seed oil and fatty acid composition in Capsicum spp., Journal of Food Composition and Analysis, 30:102-108.

Mahanta, P., Muzaddadi, A. U., (2013.), Extension of shelflife of the fermented fish product, *shidal* by packaging in glass bottle and low temperature storage, Indian J. Fish., 60(2):135-143.

McLay, B. R. (1972.) Marinades. Torry Advisory Note No. 56. Ministry of Agriculture Fisheries and food. Food and Agriculture Organization (FAO), Rome.

Miller A., Scanlan, R. A., Lee, J. S., Libbely, L. M. (1972.) Quantitative and selective gas chromatographic analysis of dimethyl- and trimethylamine in fish. J. Agric. Food Chem. (20), 709-711.

Pedrosa-Menabrito, A., Regenstein, J. M. (1988.) Shelf-life extension of fresh fish-a review. Part I-Spoilage of fish. J. Food qual. (11), 117-127.

Ryszard Amarowicz (2014.) Antioxidant activity of peppers, European Journal of Lipid Science and Technology 116, 237–239.

Sinovčić, G. (1992.) Biologija i dinamika populacije brgljuna, *Engraulis encrasicolus* (LINNAEUS, 1758.), u Jadranu. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, str.164.

Souzasora, G. T., PereiraSouza, A. E., Ferreira Zielinski, A. A., Haminiuk, C. W. I., Matsushita, M., Peralta, R. M. (2015.) Fatty Acid Composition of Capsicum Genus Peppers, Ciências Agrotecnicas, Lavras, v. 39, n. 4, p. 372-380.

Šimat V. (2010.) Promjene parametara kvalitete u filetu hladno mariniranog inćuna (*Engraulis encrasicolus*, L.) Doktorska disertacija (Prehrambeno biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu).

Šimat, V., Maršić-Lučić, J., Bogdanović, T., Dokoza, M. (2009.) Oksidacija masti u ribi i ribljim proizvodima, Meso, Vol. XI broj 6: 345-351.

Zaki N., Hasib A., i sur, (2013.) Assessment of color, Capsaicinoids, Carotenoids and Fatty Acid Composition of Paprika Produced From Moroccan Pepper Cultivars (*Capsicum Annuum L.*), Journal of Natural Sciences Research, Vol 3., No 7.

Zaman, M. Z., Abu Bakar, F., Selamat, J., Bakar, J., (2010) Occurrence of Biogenic Amines and Amines Degrading Bacteria in Fish Sauce, Czech J. Food Sci., Vol 28, (5), 440-449.

Zlatanov S., Laskaridis K. (2007.) Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish-sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*), Food Chemistry 103, 725-728.

## POPIS SLIKA

|  |    |
|--|----|
| Slika 1. Inćun ( <i>Engraulis encrasicolus</i> , Linnaeus, 1758.) .....  | 1  |
| Slika 2. Raprostranjenost inćuna u svijetu .....   | 2  |
| Slika 3. a) Liofilizirani grubo usitnjeni uzorci b) Tarionik za izradu usitnjenog praškastog uzorka c) Izrada praškastog uzorka d) Usporedba je u različitoj granulaciji .....   | 9  |
| Slika 4. Uzorci spremni za ekstrakciju (a) epruветama sa smjesom diklormetana i metanola (b) inkubiraju se u ultrazvučnoj kupelji .....  | 10 |
| Slika 5. U uzorcima se odvaja organska faza (donja) i voda (gornja) u lijevcima za odjeljivanje.....   | 11 |
| Slika 6. Kromatogram standardne smjese metilnih estera masnih kiselina iz prirodnog izvora (Cod Liver Oil, Supelco kvalitativni standard) na metil-fenil-siloksan kapilanoj koloni (30m x 0,25mm x 0,25µm) .....         | 13 |
| Slika 7. Udjeli masnih kiselina (%) u vremenu (mjeseci) tijekom skladištenja na +4°. a) Marinirani proizvod pohranjen u marinadi i b) marinirani proizvod pohranjen u smjesi suncokretovog i maslinovog ulja (9:1) ..... | 19 |
| Slika 8. Udjeli masnih kiselina (%) u vremenu (mjeseci) tijekom skladištenja na +4°. a) Učinak ružmarina, b) chilli papričica i c) smjese ružmarina, chilli papričica i suhих rajčica na stabilnost masnih kiselina..... | 21 |
| Slika 9. Koncentracija TBARS/MDA i proteina. a) Marinirani proizvod pohranjen u marinadi i b) marinirani proizvod pohranjen u smjesi suncokretovog i maslinovog ulja (9:1) .....   | 23 |
| Slika 10. Koncentracija TBARS/MDA i proteina. a) Učinak ružmarina, b) chilli papričica i c) smjese ružmarina, chilli papričica i suhих rajčica na stabilnost proteina i autooksidaciju.....                              | 24 |
| Slika 11. Ukupni aerobi, plijesni, kvasci i <i>Lactobacillus</i> sp., u različitim recepturama izražena kao broj stanica koje formiraju kolonije (CFU)/1g.....   | 25 |

## POPIS TABLICA

|  |    |
|--|----|
| Tablica 1. Faktori odziva (F.O. ng/integriranoj površini) i pripadajuće EDL vrijednosti standarda.   | 14 |
| Tablica 2. Profil masnih kiselina mariniranih inćuna nakon 1 mjeseca stajanja u smjesi suncokretovog i maslinovog ulja (9:1 <sub>vol/vol</sub> ) uz dodatak začina: ružmarin, motar, majčina dušica, kadulja, borovica, chilli papričica | 18 |