

ods of analysis, 18th ed., Gaithersburg, Maryland, pp. 1073-1083.

Anonymous (2007): Pravilnik o proizvodima od mesa (NN 01/07)

Aymerich, M. T., B. Martin, M. Garriga, M. Hugas (2003): Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl Environ Microbiol.* 69, 4583-4594.

Benčević, K., A. Petričević (1999): Slavonski domaći kuleni i kobasice. Hrvatski farmer d.d. Zagreb.

Comi, G., B. Citterio, M. Manzano, & C. Cantoni (1992): Evaluation and characterization of Micrococccaceae strains in Italian dry fermented sausages. *Fleischwirtschaft*, 72, 1679-1683.

Comi, G., R. Urso, L. Iacumin, K. Rantsiou, P. Cattaneo, C. Cantoni, L. Coccolin (2005): Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Sci.* 69, 381-392.

Dellaglio, S., E. Casiraghi, and C. Pompei (1996): Chemical, physical and sensory attributes for the characterization of an Italian dry-cured sausage. *Meat Sci.* 42, 25-35.

García-Varona, M., E. M. Santos, I. Jaime, J. Rovira (2000): Characterisation of Micrococccaceae isolated from different varieties of chorizo. *Int J Food Microbiol* 54, 189-195.

Garriga M., M. Hugas, P. Gou, M. T. Aymerich, J. Arnau, J. M. Monfort (1996): Technological and sensorial evolution of Lactobacillus strains as starter cultures in fermented

sausages. *Int J Food Microbiol* 32, 173-183.

Gimeno, O., D. Ansorena, I. Astiasarán, J. Bello (2000): Characterization of chorizo de Pamplona: instrumental measurements of colour and texture. *Food Chem.* 69, 195-200.

Hammes, W. P., A. Bantleon, M. Seunghwa (1990): Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 87, (1-2), 165-173

Hugas, M., M. Garriga, T. Aymerich J. M. Monfort (1993): Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol.* 18, 107-113.

Jordana, J. (2000): Traditional foods: challenges facing the European food industry. *Food Research International*, 33, (3-4), 147-152.

Metaxopoulos, J., J. Samelis, M. Papadelli (2001): Technological and microbiological evaluation of traditional processes as modified for the industrial manufacturing of dry fermented sausage in Greece. *Ital J Food Sci.* 1, 3-18.

Perez-Alvarez, J. A., M. E. Sayes-Barbare, J. Fernandez-Lopez, V. Aranda-Catala (1999): Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. *Food Res. Inter.* 32, 599-607.

Rubio, B., B. Martínez, M. J. Sánchez, D. G. García-Cachán, J. Rovira, I. Jaime (2008): Effect of the packaging method and the storage time on lipid oxidation and colour stability on dry fermented sausage salchichón manufactured with raw material with a high level of mono and polyunsaturated fatty acids. *Meat Sci.* 80, 1182-1187.

Salgado, A., M. C. García Fontán, I. Franco, M. López, J. Carballo (2005): Biochemical changes during the ripening of *Chorizo de cebolla*, a Spanish traditional sausage. Effect of the system of manufacture (homemade or industrial). *Food Chem.* 92, 413-424.

Salgado, A., M. C. García Fontán, I. Franco, M. López, J. Carballo (2006): Effect of the type of manufacture (homemade or industrial) on the biochemical characteristics of *Chorizo de cebolla* (a Spanish traditional sausage). *Food Control*, 17, 213-221.

Samelis, J., F. Maurogenakis, J. Metaxopoulos (1994): Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int J Food Microbiol.* 23, 179-196.

Samelis, J., J. Metaxopoulos, M. Vlasi, A. Pappa (1998): Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. *Int. J Food Microbiol.* 44, 60-82.

Santos, E. M., C. González-Fernández, I. Jaime, J. Rovira (1998): Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of "chorizo". *Int. J. Food Microbiol.* 39, 123-128.

Schillinger U., F. K. Lücke (1987): Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.* 4, 199-208.

Toldrá, F. (2007): *Handbook of Fermented Meat and Poultry.* Oxford OX4 2DQ, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Received: December, 1, 2009

Accepted: December, 13, 2009. 

Oksidacija masti u ribi i ribljim proizvodima

V. Šimat¹, J. Maršić-Lučić², T. Bogdanović³, M. Dokoza⁴

Stručni rad

Sažetak

Oksidacija masti u ribi i ribljim proizvodima povezana je s razvojem užeglosti i produkata oksidacijskog kvarenja. Zbog visokog sadržaja višestruko nezasićenih masnih kiselina ribe su osjetljive na oksidaciju masti tijekom manipulacije, obrade i pohrane. Produkti oksidacije mogu promijeniti kvalitetu hrane: boju, teksturu, okus i miris te imati nepovoljno djelovanje na zdravlje čovjeka. Najčešće korištena metoda za mjerenja stupnja oksidacije masti u ribi i ribljim proizvodima nastale tijekom prerade i/ili skladištenja je određivanje sekundarnih produkata lipidne oksidacije npr. malondialdehida, tiobarbiturnim testom, tj. spektrofotometrijsko određivanje ružičasto fluorescentnog tiobarbiturna kiselina-malondialdehid kompleksa. Zbog svoje jednostavnosti metoda je zadržana unatoč nedostacima.

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

Uvod

Sastav ribe kao sirovine može se sagledavati s različitih stajališta, osobe koje rade u preradi ribe moraju poznavati sastav i svojstva mesa sirove ribe kako bi primijenili ispravan i pogodan tehnološki proces. Prerađivači su, za razliku od potrošača koje interesira jedino kvaliteta jesti-

vog dijela (fileta) ribe, zaokupljeni kemijskim, nutritivnim i strukturnim sastavom ribe koji im omogućuje prilagodbu proizvodnih procesa pojedinim vrstama riba. U prehrani ljudi riba predstavlja bogati izvor bjelančevina s visokim sadržajem esencijalnih aminokiselina i masti (visoko nezasićenih masnih kiselina).

Odlikuje se malom energetskom vrijednošću, te lakom probavljivošću u odnosu na meso sisavaca koje se koristi u prehrani (Cvrtila i sur. 2006.). Svojom kemijskim sastavom riblje se meso bitno ne razlikuje od mesa toplokrvnih životinja, ali se različito ponaša u tehnološkom procesu prerade ili pri čuvanju i skladištenju.

www.meso.hr

¹ **Vida Šimat dipl. inž. morskog ribarstva**, Sveučilište u Splitu, S.S. Centar za studije mora, Livanjska 5/III, 21000 Split (vida@unist.hr)

² **Jasna, Maršić-Lučić, viši znanstveni suradnik**, Institut za oceanografiju i ribarstvo, Laboratorij za akvakulturu, Šetalište I. Meštrovića 63, 21000 Split (jmaršic@izor.hr)

³ **Tanja Bogdanović dipl. inž. biotehnologije**, Laboratorij za analitičku kemiju i rezidue, Veterinarski zavod Split, Hrvatski veterinarski institut, Poljička c. 33, 21000 Split

⁴ **Marijana Dokoza, prvostupnica morskog ribarstva, redovna studentica** diplomskog studija Morsko ribarstvo pri Centru za studije mora, Sveučilišta u Splitu, Livanjska 5/III, 21000 Split

Razlog tome je visok postotak vode (60-80%) u mesu, zbog čega se ono relativno brže kviri. Meso ribe ima mnogo manje vezivnog tkiva i ne sadrži elastin, pa je mekše, podložnije fermentativnoj i mikrobiološkoj razgradnji. Masno tkivo ima drugačiji kemijski sastav, pa se i kviri na specifičan način (Šoša, 1989). Brojne analize ukazuju na velike razlike u kemijskom sastavu kod različitih vrsta riba (Rehbein i sur. 2009). Kemijski sastav odstupa i kod jedinki iste vrste, ovisno o spolu, dobi, staništu i sezoni lova, a ponekad i u istom ulovu. Sezonska odstupanja u kemijskom sastavu mogu biti značajna i služe kao važan faktor pri ocjeni ulova i njegove daljnje uporabe. Riba tijekom godine prolazi različite stadije razvoja gonada, migraciju i mrijest, te intenzivno hranjenje nakon mrijesta koje traje do ponovnog razvoja gonada, što dovodi do promjene kemijskog sastava u tijelu ribe, pa ovisno o dostupnosti hrane za vrijeme razvoja, udio masti u tijelu ribe je promjenljiv. Ukratko, sve aktivnosti kojima se troši energija u tijelu (migracije, razvoj gonada, mrijest) smanjuju udio masti u tijelu ribe, koju ona nadoknađuje u intenzivnom razdoblju hranjenja poslije mrijesta (Nollet, 2007).

Masti riba

Masti, odvojene od ostatka ribljeg tkiva u nepročišćenom obliku su mješavina sastojaka sa zajedničkom fizičkom osobinom, nisu topljivi u vodi već u organskim otapalima. Masti su po svom kemijskom sastavu smjesa triacilglicerola i masnih kiselina (na jednu molekulu glicerola esterski su vezane 3 masne kiseline) (Sikorski, 1990). Zbog velikog broja i raznolikosti masnih kiselina, one u ribljem tkivu imaju složeniju strukturu nego kod drugih životinja. Uz njih tu su i tzv. složeni lipidi: fosfolipidi, steroidi i voskovima slične tvari. Sirova mast uključuje još i vitamine A, D i E, pigmente i male količine joda, broma, sumpora, klora i arsena (Žlender, 2000). Udio se masti u mesu ribe

mijenja, krećući se od 0,3 do 20%, a ponekad i više. Riblje masti sadrže od 17 do 21% zasićenih i od 60 do 84% nezasićenih masnih kiselina, što ih čini posebno podložnim oksidacijskim procesima i kvarenju. Masti riba se i po sastavu razlikuju od masti toplokrvnih životinja. Oko 40% riblje masti je sastavljeno od dugolančanih masnih kiselina (14 – 22 C atoma). Nadalje, riblja mast sadrži oko 50% oleinske kiseline (18:1, ω9), zbog čega je mekane konzistencije, gotovo tekuća i slična ulju (Stansby i Hall, 1967). U ribljim masti također nalazimo relativno velike količine linolne (18:2, ω6), linolenske (18:3, ω3) i arahidonske (20:4, ω6) kiseline, koje spadaju u grupu esencijalnih masnih kiselina vrlo važnih za organizam. Manjak masnih kiselina u organizmu može dovesti do različitih poremećaja. Omega-3 masne kiseline pozitivno djeluju na krvotok, suzavaju elastičnost arterija i snižavaju razinu masnoća u krvi. Uz to, bitne su za zdrav razvoj djeteta u majčinoj utrobi i imaju važnu ulogu u osiguravanju optimalnog razvoja živčanog sustava i funkcije vida (Lovell i Mohammed, 1989). Prema udjelu masti u mesu ribe možemo podijeliti u nekoliko skupina:

- NEMASNE (lean) ribe čiji udio masti ne prelazi 2-4%;
- SREDNJE MASNE (medium fatty) ribe s udjelom masti od 4 do 8%;
- MASNE (fatty) s udjelom masti većim od 8%.

Ribe koje sadrže udio masti veći od 15% ponekad se nazivaju ekstra masnima. Udio masti određuje vrijednost sirovine i okus (Šoša, 1989).

Riba se na osnovi raspodjele masti u tijelu dijeli na plavu i bijelu. Plava riba pohranjuje masti u masnim stanicama po cijelom tijelu, a bijela u jetru i trbušnu šupljinu. Udio masti

u mesu bijele ribe je nizak i čini oko 1%. Od toga 90% su strukturalne masti ili fosfolipidi (Ackman, 1980). Masti riba lovljenih u hladnim vodama sadrže više nezasićenih masnih kiselina od riba iz toplijih mora. Masti haringe (*Clupea harengus*) sadrže najviše visokonezasićenih masnih kiselina (Rehbein i sur., 2009). Ono što je vrlo bitno za očuvanje i preradu ribe, a posebice kod skladištenja je oksidiranje masti pri čemu nastaju spojevi kao peroksidi, aldehidi, ketoni ili masne kiseline niske molekularne mase, od kojih su neki i toksični. Za vrijeme skladištenja mast se postupno hidrolizira pod djelovanjem enzima lipaze, prisutnog u tkivu ribe, pri čemu nastaje glicerol i slobodne masne kiseline velike molarne mase.

Kvarenje ribljih masti

Oksidacija masti je najveća postulovna promjena koja utječe na degradaciju riblje sirovine. Izrazite promjene mirisa, ukusa i boje javljaju se i kod nemasne ribe, primjerice bakalara (*Gadus morhua*) kod kojeg je udio masti oko 0,5%. Međutim, 82% ukupnih masnih kiselina čine fosfolipidi. (Hall, 1997). Najvažnije promjene koje se odvijaju u lipidima su oksidativne promjene kemijske prirode, te promjene katalizirane enzimima. Kod masnih riba (više od 8% masti) ove promjene stvaraju velike probleme u kvaliteti sirovine, koje su vidljive u promjenama okusa, mirisa i boje mesa. U principu, riblji mišići podložni su dvama procesima: lipolizi i oksidaciji, tj. kod riba se javljaju autooksidacija (obuhvaća reakcije s kisikom i nezasićenim masnim kiselinama) i autoliza masti (enzimatska hidroliza čiji su glavni produkti slobodne masne kiseline i glicerol) (Huss, 1988). Autooksidacija nastaje djelovanjem kisika iz zraka na nezasićene masne kiseline. Riblje masti s više nezasićenih masnih kiselina od toplokrvnih organizama podložnije su autooksidacijskim promjenama. Prvi korak kojim započinje autooksidacija je nastajanje hidroperoksida.

Autooksidacija se zasniva u lančanoj reakciji stvaranja slobodnih radikala u više faza. Započeti se proces autooksidacije ne može zaustaviti, ali se može ubrzati ili usporiti. Ubrzavaju ga povišene temperature, svjetlo i tragovi organskih i anorganskih tvari (željezo, bakar), a usporavaju antioksidansi.

Antioksidansi su definirani kao tvari koje u malim koncentracijama, u odnosu prema oksidativnim supstratima, dovode do odgađanja ili inhibicije oksidacije supstrata. Djelovanje antioksidansa može se opisati slijedećim mehanizmima:

- uklanjanjem kisika ili utjecajem na smanjivanje koncentracije kisika;
- uklanjanjem metalnih iona;
- uklanjanjem superoksida ili vodikova peroksida;
- uklanjanjem slobodnih radikala (Anonymous, 2009).

Prirodni antioksidansi koji se koriste u tehnologiji prerade riba su a tokoferol (vitamin E - sadržaj tokoferola u različitim ribljim uljima kreće se od 40 - 628 mg/kg), askorbinska kiselina (vitamin C), neki spojevi sumpora, katalin (ružmarin, kadulja) i tvari koje se za vrijeme toplog dimljenja ribe nakupljaju u površinskom sloju i na taj način sprečavaju užeglost mesa. Za praktične svrhe, antioksidans mora biti visoko učinkovit u malim koncentracijama, dostupan po razumnim cijenama i lako topiv u mastima.

Užeglost može biti uzrokovana i enzimatskom aktivnošću. Ovaj tip degradacije masti obuhvaća hidrolizu i oksidaciju masti. Hidroliza masti može biti uzrokovana aktivnošću mikrobnih i endogenih lipaza (Huss, 1988). Oksidaciju masti katalizira enzim lipooksigenaza koji nalazimo i potkožnom tkivu ribe i fosfolipaza koji kataliziraju esterske veze na sterički točno određenim mjestima

molekule glicerola, pri čemu nastaju slobodne masne kiseline. Hidroliza triacilglicerola izraženja je u crvenom mišiću zbog većeg udjela masti, dok je hidroliza fosfolipida karakteristična za bijeli mišić. Slobodne masne kiseline mogu direktno utjecati na okus ribe, gubitak određenih vitamina i aminokiselina, promjene u teksturi i kapacitetu zadržavanja vode. Promjene u teksturi i kapacitetu zadržavanja vode značajne su za procese smrzavanja ribe. Oksidacija visoko nezasićenih masnih kiselina, koje čine 60 do 84 % od ukupnih masnih kiselina, je primarni uzrok kvarenja ribe (Bremner, 2002). Ukoliko je riba dekapirana i bez utrobe, pri niskim temperaturama hidroliza nije od značajnog utjecaja, u ovom slučaju velike količine slobodnih masnih kiselina nastaju ukoliko se riba skladišti pri višim temperaturama.

Korelacija između veće količine slobodnih masnih kiselina i užglosti, odnosno sapunastog okusa ribe, kao ni daljnje raspadanje slobodnih masnih kiselina nije u potpunosti poznato. Neki mikroorganizmi posjeduju lipooksidaze koje aktiviraju lance masnih kiselina u reakcijama s kisikom, čiji se produkti razgrađuju na ketone, aldehide i druge spojne tipične za promjenu okusa, tj. rancinost ribe.

Oksidacija masti

U normalnim biološkim uvjetima, molekula kisika neenzimatskom oksidacijom povremeno oduzima elektrone drugim molekulama, što uzrokuje nastanak slobodnih radikala. Kisik napada dvostruke veze u masnim kiselinama i stvara peroksidne veze. Fosfolipidi koji sadrže visok sadržaj nezasićenih masnih kiselina, uglavnom linolne i arahidonske kiseline su podložniji oksidaciji (Štefan i sur. 2007). Oksidacija se odvija u dva različita procesa:

Triacilgliceroli u skladištima masti (potkožni, intermuskularni, intramu-

skularni), uglavnom sadrže masne kiseline sa 16 ili 18 C atoma.

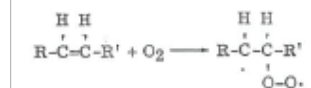
Fosfolipidi u mišićima. Sadrže mnogo veći udio C20 i C22 nezasićenih masnih kiselina (Pearson i sur., 1983).

Značajne varijabilnosti u ukupnom sadržaju fosfolipida prisutne su među vrstama i mišićima ovisno od njegove funkcije. Meso peradi i ribe ima veći sadržaj fosfolipida od crvenog mesa. Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) često su meta stvorenih slobodnih radikala, što rezultira lipidnom peroksidacijom. Unutarstanični i izvanstanični antioksidansi uklanjanjem reaktivnih spojeva kisika i dušika smanjuju mogućnost oksidacijskog oštećenja lipidnih molekula, u prvom redu PUFA-e, ali i drugih spojeva.

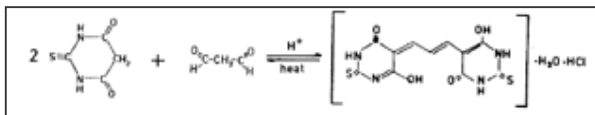
Stupanj oksidacije masti može se odrediti mjerenjem količine malondialdehida (MDA), 4-hidroksinonenala (HNE), izoprostana, te drugih produkata lipidne peroksidacije. Zasićene masne kiseline i mononezasićene masne kiseline otpornije su prema djelovanju kisikovih atoma od višestruko nezasićenih masnih kiselina. Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal (OH•), međutim i drugi pojedini radikali mogu je pokrenuti. Proces lipidne peroksidacije obilježavaju 3 stupnja:

- inicijacija (formiranje slobodnih radikala);
- propagacija (stvaranje lanaca slobodnih radikala) i
- terminacija (stvaranje ne-radikalnih produkata).

Inicijacija: Nezasićeni ugljikovodik gubi vodik i formira radikal (RH - R• + H•) koji u prisutnosti kisika stvara dvostruke veze – di-radikala:



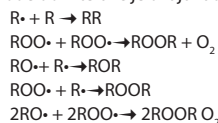
Slika 1. Reakcija stvaranja TBK – MDA kompleksa



Kisik se može umetnuti između vodika i stvoriti hidroperoksid ($RH + O_2 \rightarrow ROOH$). Takvo stvaranje hidroperoksida nije nužno mehanizam stvaranja lanca slobodnih radikala, premda može inicirati proces lančane reakcije. Svaki proces inicijacije proizvodi dva slobodna radikala koji sudjeluju u mehanizmu lančane reakcije.

Propagacija - lančana reakcija se nastavlja sa $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$ i $ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$ i tvori peroksidne radikale, hidroperokside, te nove ugljikovodične radikale.

Terminacija - se događa kada dođe do interakcije dvaju radikala:



Slobodni radikali mogu oštetiti živa tkiva, osim ako su prisutni antioksidansi koji s njima reagiraju. Kada više nema slobodnih radikala na raspolaganju za daljnje reakcije s kisikom, za nastavak oksidacije potrebne su nove reakcije inicijacije (Anonymous, 2009).

U lipidnim sustavima početak peroksidacijskog niza odnosi se na napad aktivnog kisika, sposobnog da izdvoji atom vodika iz metilenske skupine ($-CH_2-$). Tako iz PUFA-e nastaju slobodni lipidni radikali. Slobodni radikali koji mogu oksidirati PUFA-u jesu alkoksilni ($OH\cdot$, $RO\cdot$) i peroksilni ($HO_2\cdot$, $RO_2\cdot$). Tokoferol α i manitol sprječavaju peroksidacijski proces. Lipidna peroksidacija je drugim riječima napad na dvostruke veze masnih kiselina, pri čemu na-

staju peroksidi koji dalje reagiraju s drugim masnim kiselinama. Rezultira gubitkom propusnosti membrane i oduzimanjem atoma vodika od nezasićene masne kiseline ($LH \rightarrow L\cdot$). Lipidni radikal ($L\cdot$) tada reagira s kisikom stvarajući peroksil radikal ($L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot$). Lančana reakcija započinje kada peroksidni radikal oduzima atom-H od druge masne kiseline ($LOO\cdot + LH \rightarrow LOOH + L\cdot$).

Produkti lipidne peroksidacije

Pri djelovanju iona bakra ili željeza, lipidni peroksidi stvaraju mnogobrojne produkte razgradnje od aldehida, ketona, ugljikovodika (etana, etena, pentana), epoksida, do aktivnih radikala. Najštetniji i jedan je od najčešćih produkata lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA), mutagen je, tvori komplekse koje nalazimo u stanicama različitih organa, te akrolein i krotonaldehid također mutageni produkti lipidne peroksidacije. Malondialdehid (MDA) koji se tijekom peroksidacije masti stvara u malim količinama, pokazatelj je stupnja peroksidacije. MDA koji postoji u različitim oblicima, u fiziološkim se uvjetima nalazi u obliku enolnolnog iona koji integrira s proteinima, pokazujući izraziti afinitet prema lizinskom aminokiselinskom ostatku. Gvanin u DNK također je ciljno mjesto napada malondialdehida, što može stvarati mutagena oštećenja. U organizmu, MDA se metabolizira do malonatne kiseline koja je kompetitivni inhibitor mitorondrijske suksinat dehidrogenaze. Produkt oksidacije omega-6 masnih kiselina (linoleinske i arahidonske), hidroksialkenal 4- hidroksinonenal (HNE) u većim količinama ima izra-

zito toksično djelovanje, inhibira stanični rast, sposoban je modificirati lipoproteine, te potaknuti razvoj ateroskleroze. Hidroksialkenali koji su reaktivni zbog prisutnosti triju funkcionalnih skupina (aldehidne, hidroksilne i dvostruke veze) a u fiziološkim uvjetima pokazuju afinitet prema skupinama u DNK bazama, proteinima, fosfolipidima. Također pokazuju određenu selektivnost prema -SH skupinama u albuminu (Draper i Hadly, 1990).

Tiobarbiturna kiselina u određivanju indeksa oksidacije

Tiobarbiturna kiselina (TBK) ima široku primjenu zahvaljujući svojoj reaktivnosti, prvenstveno s karbonylnim spojevima (aldehidi, ketoni), kao i kiselinama, esterima, amidima, šećerima i pirimidinskim spojevima (Guillén-Sans i sur., 1998). Glavna uporaba TBK-a odnosi se na prepoznavanje stupnja autooksidacije masti, odnosno užeglosti masti. Proces oksidacije u hrani koja sadrži masti dovodi do užeglosti i jedna je od najznačajnijih promjena tijekom proizvodnje i pohrane hrane. Degradacijski procesi rezultiraju smanjenjem nutritivnih vrijednosti, senzorske kvalitete i na kraju, smanjenju sigurnosti hrane uslijed formiranja potencijalno toksičnih spojeva. Uspoređivanje ovih procesa oksidacije važno je kako za proizvođače tako i za potrošače (Mendes i sur., 2009).

Najčešće korištena metoda za mjerenja stupnja oksidacije masti u hrani nastale tijekom prerade i/ili pohrane je određivanje sekundarnih produkata lipidne oksidacije npr. malondialdehida (MDA) tiobarbiturnim testom (*TBARS-tiobarbituric acid reactive substances*). Malondialdehid (MDA) je fiziološki ketoaldehid, sekundarni produkt lipidne oksidacije nezasićenih masnih kiselina, tj. arahidonske kiseline. MDA je jedan od najvažnijih produkata oksidacije koji se smatra kancerogenim i uzročnikom mutacija. MDA često se koristi kao

pokazatelj oksidativnog oštećenja u biološkim uzorcima (Kinter, 1995) i hrani (St. Angelo, 1996). Najkorištenija metoda za određivanje MDA je spektrofotometrijsko određivanje ružičasto fluorescentnog TBK-MDA kompleksa (Slika 1.) koji nastaje nakon reakcije s 2-tiobarbiturnom kiselinom (TBK) pri niskom pH i visokoj temperaturi (Bergamo i sur., 1998).

Ova jednostavna tehnika se koristi u analizi ribe, kad je potrebna procjena oksidacije masti (Panpipat i Yongsawatdigul, 2008). Reakcija se događa uslijed reakcije monoenoalnog oblika MDA na aktivne metilenske skupine TBK. Vidljiva i ultraljubičasta spektrofotometrijska analiza pigmenta potvrđuje svoj primarni maksimum kod 532-535 nm i sekundarni kod 245-305 nm (Sinnhuber i sur. 1958). Intenzitet boje je mjera koncentracije MDA, te je u korelaciji sa užeglošću. Reakcija ovisi o koncentraciji TBK otopine, temperaturi i pH (Fernandez i sur., 1997). Postoji nekoliko modifikacija TBK-MDA metoda. Metodu za masti riba opisali su Ke i Woyewoda (1979), a za ribe Vyncke (1970). Najčešće modifikacije metode su: izravno zagrijavanje uzorka s TBK, destilacija uzoraka, ekstrakcija masti organskim otapalima; MDA ekstrakcija kiselinom nakon čega slijedi kiselinska reakcija sa TBA (Lemon, 1975). Unatoč ovim izmjenama, spektrofotometrijski TBA test je bio kritiziran zbog nedostatka metode na osjetljivost (Squires, 1990) i njegove visoke netočnosti, jer TBA reagira ne samo sa MDA, već i sa mnogim drugim spojevima (npr., ugljikohidrati, aminokiseline, pigmenti, itd.), što je rezultiralo znatnim povećanjem i promjenjivosti rezultata. (Mateosa i sur., 2005).

Spektrofotometrijska TBA metoda također je pokazivala probleme kada su se analizirali uzorci smrznute ribe. Značajna količina formaldehida koja se razvila u smrznutim primjercima bila je prikazana u rezultatima uo-

bičajene spektrofotometrijske TBA test metode. (Aubourg, 1999). Nadalje, visoka temperatura (95 - 100°C), može utjecati na produljenje inkubacije uzorka (do 150 min), dok jaki kiseli uvjeti (pH 1.5-3.5) potrebni za MDA-TBK reakciju mogu dovesti do peroksidacije uzorka čak i nakon dodatka antioksidansa. Iz tog razloga te u cilju otklanjanja smetnji u formiranju TBK-MDA crvenog pigmenta, razvijene su osjetljivije i naprednije metode analize bioloških uzoraka: kapilarna plinska kromatografija i masena spektrometrija, te tekućinska kromatografija s masenom spektrometrijom. Također je razvijeno više metoda koje se temelje na tekućinskoj kromatografiji visoke učinkovitosti (HPLC) sa UV/VIS apsorpcijom ili s florescentnom detekcijom (Mendes i sur., 2009). Međutim, novije metode još nisu u primjeni za riblje uzorke. Unatoč navedenim nedostacima, spektrofotometrijska MDA-TBK metoda se upotrebljava zbog svoje jednostavnosti. U ovoj metodi je obavezna uporaba propilgalata (antioksidacijsko djelovanje) i etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) kako bi se onemogućila reakcija s drugim TBA-aktivnim spojevima tijekom homogenizacije i filtracije uzoraka. Stoga, razvoj jednostavne, osjetljive i specifične metode određivanja MDA-TBK kompleksa ostaje izazov (Mendes i sur., 2009).

U cilju zaštite od oksidacije koriste se specifični aditivi koji je inhibiraju. Oni se pravilno nazivaju inhibitori oksidacije, ali je rasprostranjeni naziv antioksidansi. Međusobno se jako razlikuju po kemijskom sastavu i imaju različite mehanizme djelovanja. Prvi antioksidansi koji su se koristili za konzerviranje hrane bili su začini. Oni su međutim zamijenjeni sintetskim supstancama koje su jeftinije, utvrđene čistoće i posjeduju ujednačenja antioksidativna svojstva. Najčešće korišteni sintetski antioksidansi koji se koriste u prehrambenim proizvodima su butil hidroksianizol

(BHA), butil hidroksitoluen (BHT), propil-galat (PG) i terc-butilhidrokinon (TBHQ). TBHQ je najzastupljeniji antioksidans koji se stavlja u biljna ulja, dok se BHA i BHT kao termostabilni antioksidansi, najviše stavljaju u meso. Zbog toksikoloških razloga prekomjerna uporaba sintetskih antioksidansa je dovedena u pitanje, a zahtjevi potrošača su usmjereni prema uporabi prirodnih antioksidansa poput flavonoida, selena, vitamina E i C, te beta karotena.

ZAKLJUČCI

Oksidacija masti u ribi i ribljim proizvodima povezana je s razvojem užeglosti i oksidacijskog kvarenja. Uslijed visokog sadržaja višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA), ribe su osjetljive na oksidaciju masti tijekom manipulacije, obrade, prerade i pohrane. Kao posljedica oksidativnog kvarenja, formiraju se nestabilni lipidni hidroperoksidi, koji se razlažu na aldehide, ketone, alkohole, kiseline ili ugljikovodik. Ti takozvani sekundarni proizvodi oksidacije mogu promijeniti kvalitetu hrane: boju, teksturu, okus i miris te imati nepovoljno djelovanje na zdravlje čovjeka. Prema postojećoj literaturi, nove metode i optimizacija postojećih metoda za detekciju i kvantifikaciju TBK- MDA kompleksa kao indeksa oksidacije masti u ribi i ribljim proizvodima su nužno potrebne i ostaju izazov znanstvenicima.

* Rad je prezentiran na znanstveno-stručnom skupu Veterinarska znanost i struka, Zagreb, 1. i 2. listopada 2009.

LITERATURA

- Ackman, R. G.** (1980): Fish lipids. Part 1. In: J. J. Connell (ed.) Advances in fish science and technology, Fishing News (Books) Ltd., Farnham, Surrey, 86-103.
- Anonymous** (2009): Lipid oxidation. Dostupno sa: <http://www.ag.auburn.edu/~kerthcr/671/Lipid%20Oxidation.pdf>, pristupljeno 13.10.2009.
- Aubourg, S. P.** (1999): Lipid damage

Lipid oxidation in fish and fish products

Summary

Lipid oxidation in fish and fish products is associated with the development of rancidity and products of oxidative deterioration. Due to the high content of polyunsaturated fatty acids, fish are sensitive to lipid oxidation during the manipulation, processing and storage. Products of oxidation may change the quality of food: color, texture, taste and smell and have an adverse effect on human health. The most commonly used method for measuring the degree of lipid oxidation in fish and fish products arising from processing and/or storage is determining the secondary lipid oxidation products. It is for example malondialdehyde, using thiobarbituric test, i.e. spectrophotometric determination of fluorescent pink thiobarbituric acid-malondialdehyde complex. Because of its simplicity, the method is retained despite its shortcomings.

Key words: fish, lipid oxidation, thiobarbituric acid, malondialdehyde

Fettoxidation in Fisch und Fischerzeugnissen

Zusammenfassung

Die Fettoxidation in Fisch und Fischerzeugnissen ist mit der Entwicklung von Ranzigkeit und Produkten des Oxidationsverderbens verbunden. Wegen des hohen Gehaltes der mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind die Fische auf Fettoxidation während der Manipulation, Verarbeitung und Lagerung empfindlich. Die Oxidationsprodukte können die Qualität der Nahrung verändern: Farbe, Textur, Geschmack und Geruch, und sie können einen ungünstigen Einfluss auf die Gesundheit der Menschen haben. Die meist benutzte Methode für die Messung des Oxidationsgrades in Fisch und Fischerzeugnissen, entstanden während der Verarbeitung und/oder während der Lagerung, ist die Bestimmung von Sekundärprodukten der Lipidenoxidation, z.B. Malondialdehyde durch den Thiobarbiturictest, d.h. spektrophotometrische Bestimmung des rosa fluoreszenten thiobarbituric acid-malondialdehyde Komplexes. Wegen ihrer Einfachheit hat sich die Methode, trotz der Mängel, erhalten.

Schlüsselwörter: Fisch, Fettoxidation, Thiobarbituric acid, Malondialdehyd

Ossidazione dei grassi nel pesce e nei prodotti di pesce

Sommario:

L'ossidazione dei grassi nel pesce e nei prodotti di pesce è legata con lo sviluppo del danno ossidativo e dei prodotti del deperimento ossidativo. Per l'alta concentrazione degli acidi grassi polinsaturi il pesce è sensibile all'ossidazione dei grassi durante la manipolazione, trattamento e immagazzinamento. È possibile che i prodotti di ossidazione cambino la qualità degli alimenti – colore, tessitura, sapore e odore, anzi, che influiscano negativamente alla salute umana. Il metodo più usato per misurare il grado dell'ossidazione dei grassi nel pesce e nei prodotti di pesce, venuto durante il trattamento o/e l'immagazzinamento è la determinazione dei prodotti secondari dell'ossidazione di lipidi, per esempio la determinazione di malondialdehididi tramite il testo tiobarbiturico: la determinazione spettrofotometrica del complesso acido tiobarbiturico-malondialdehidide, di color rosa-fluorescente. Grazie alla sua semplicità il metodo si usa ancora, nonostante i suoi difetti.

Parole chiave: pesce, ossidazione, ossidazione dei grassi, acido tiobarbiturico, malondialdehidide

detection during the frozen storage of an underutilized fish species—denaturation of fish proteins during frozen storage: Role of formaldehyde. Food Research International, 32(6), 497–502.

Bergamo, P., E. Fedele, M. Balestrieri, P. Abrescia, L. Ferrara (1998): Measurement of malondialdehyde levels in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 2171–2176.

Bremner, H. A. (2002): Safety and quality

issues in fish processing. Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 220-285.

Cvrtila, Ž., L. Kozáčinski (2006): Kemijski sastav mesa riba. Meso, 7(6), 365–370.

Draper, H.H., M.Hadley (1990): Malondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. Methods in enzymology, 186, 421-431.

Fernández, J., J.A. Pérez-Álvarez, J.A. Fernández-López (1997): Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. Food Chemistry, 59(3), 345–353.

Guillen-Sans, R., M. Guzman-Chozas (1998): The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38(4), 315–330.

Hall, G. M. (1997): Fish processing technology. Blackie Academic & Professional, London, UK, 1997.

Huss H. (1988): Fresh fish-quality and quality changes. Training Programme on Fish Technology and Quality Control. Rome, FAO Fisheries Series, pp. 132.

Ke, P. J., A.D. Woyewoda (1979): Micro-

determination of thiobarbituric acid values in marine lipids by a direct spectrophotometric method with a monophasic reaction system. Analytical Chimica Acta., 106, 279–284.

Kinter, M. (1995): Analytical technologies for lipid oxidation products analysis. Journal of Chromatography, 671, 223–236.

Lemon, D. W. (1975): An improved TBA test for rancidity. New Series Circular No.51. Environment Canada Fisheries and Marine Service. Halifax Laboratory. Canada

Lovell, R. T., T. Mohammed (1989): Content of omega-3 fatty acids can be increased in farm-raised catfish. High light of Agricultural Research, Alabama Agric. Exp. Station, 35, 16–33.

Mateos, R., E. Lecumberri, S. Ramos, L. Goya, L. Bravo (2005): Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. Journal of Chromatography B, 827, 76–82.

Mendes, R., C. Cardoso, C. Pestana (2009): Measurement of malondialdehyde

in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. Food Chemistry 112, 1038–1045.

Nollet, M.L. (2007): Handbook of meat, poultry and seafood quality. Blackwell Publishing Ltd, 2007.

Panpipat, W., J. Yongsawatdigul (2008): Stability of potassium iodide and omega-3 fatty acids in fortified freshwater fish sausage. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 41, 483–492.

Pearson, A.M., J.I. Gray, A.M. Wolzak, N.A. Horenstein (1983): Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. Food-Techonology 37(7), 121–129.

Rehbein, H., J. Oehenschläger (2009): Fishery products: Quality, safety and authenticity. Blackwell Publishing Ltd, 2009.

Sikorski, Z.E. (1990): Seafood: resources, nutritional composition and preservation, CPR Press Inc., 1990

Sinnhuber, R.O., I.C. Yu, T.C. Yu (1958): Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. Food Research, 23, 624–634.

Squires, E.J. (1990): High-performance

liquid chromatographic analysis of the malondialdehyde content of chicken liver. Poultry Science, 69, 1371–1376.

St. Angelo, A.J. (1996): Lipid oxidation in foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36, 175–224.

Stansby, M. E., A.S. Hall (1967): Chemical composition of commercially important fish of the USA. Fish and Research, 3, 29–34.


Šoša, B. (1989): Higijena i tehnologija prerade morske ribe. Školska knjiga, Zagreb, 1989.

Štefan, L., T. Tepšić, T. Zaviđić, M. Uruka, D. Tota, R. Domitrović (2007): Lipidna peroksidacija – Uzroci i posljedice; Medicina 2007, 43, 84–93.

Vyncke, W. (1970): Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. Fette. Seifen, Anstrichmittel 72(12), 1084–1087

Žlender, B. (2000): Morske in slatkovodne ribe. Sestava in kakovost mesa rib. Meso in mesnina, 1, 1:42–43.

Dostavljeno: 6.12.2009.

Prihvaćeno: 12.12.2009. 



IREKS AROMA

CERTIFIED QUALITY SYSTEM
= UNI EN ISO 9001/2000 =
SINCERT DNV

COMPLIANCE WITH THE HAZARD ANALYSIS
CONTROL POINT MANAGEMENT SYSTEM
HACCP
DNV

The Solae Company

**BLAGOSLOVLJEN
BOŽIĆ I USPJEŠNA
NOVA 2010. GODINA.**

IREKS AROMA d.o.o., 10000 Zagreb, Radnička cesta 37
tel. +385 1/ 60 40 701; 60 40 654, fax. +385 1/ 60 40 658; 60 40 668
e-mail: Ireks@ireks-aroma.hr, http://www.ireks-aroma.hr