

Utjecaj različitih parametara sous-vide metode termičke obrade i hladnog skladištenja na promjene svojstava bakalara (*Gadus morhua* L.)

Šepak, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:134003>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Andrea Šepak
1086/PI

**UTJECAJ RAZLIČITIH
PARAMETARA *SOUS-VIDE*
METODE TERMIČKE OBRADJE I
HLADNOG SKLADIŠTENJA NA
PROMJENE SVOJSTAVA
BAKALARA (*Gadus morhua* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe, Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Tibora Jančija, dok je praktični dio istraživanja proveden u Laboratoriju za kemiju hrane na Zavodu za biotehnologiju i znanost o hrani na Norveškom sveučilištu znanosti i tehnologije, Trondheim uz pomoć izv.prof.dr.sc. Janne Crobotove.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ RAZLIČITIH PARAMETARA *SOUS-VIDE* METODE TERMIČKE OBRADJE I HLADNOG SKLADIŠTENJA NA PROMJENE SVOJSTAVA BAKALARA (*Gadus morhua* L.)

Andrea Šepak, 1086/PI

Sažetak: U ovom radu određivan je utjecaj parametara *sous-vide* metode termičke obrade te hladnog skladištenja na boju, kalo, topljivost te oksidaciju proteina fileta atlantskog bakalara (*Gadus morhua*, L.). Mjerenja su provedena na uzorcima tretiranim različitim temperaturama (50°C, 60°C, 70°C i 80°C) i različito vrijeme (5 i 10 minuta) te kontrolnim uzorcima. Najveći gubitak na masi zabilježen je kod uzoraka termički obrađenih na 80°C. Veća temperatura termičke obrade uzoraka, pokazala je i veću vrijednost L^* parametra boje, dok se parametar b^* povećavao sukladno povećanju udjela karbonila. Pronađen je veći udio sarkoplazmatskih, nego miofibrilarnih proteina, no taj udio se u oba slučaja smanjivao pri povećanju temperature *sous-vide* termičke obrade. Oksidacija proteina izražena je uz pomoć udjela ukupnih karbonila, koji je u kontrolnim uzorcima gotovo neznan. Pri tretiranju uzoraka na temperaturama od 50°C i 60°C pronađen je veći udio karbonila u frakcijama sarkoplazmatskih proteina, dok je pri temperaturama od 70°C i 80°C veći u frakcijama miofibrilarnih proteina.

Ključne riječi: *sous-vide*, hladno skladištenje, atlantski bakalar

Rad sadrži: 47 stranica, 34 slika, 1 tablica, 58 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc.dr.sc. *Tibor Janči*

Pomoć pri izradi: izv.prof.dr.sc. *Janna Crobotova*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Sanja Vidaček Filipec*
2. Doc.dr.sc. *Tibor Janči*
3. Prof.dr.sc. *Anet Režek Jambrak*
4. Doc.dr.sc. *Irena Barukčić* (zamjena)

Datum obrane: 26. rujna 2019.

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

THE IMPACT OF DIFFERENT *SOUS-VIDE* COOKING PARAMETERS AND COOLING STORAGE ON THE CHANGE OF COD (*Gadus morhua* L.) PROPERTIES

Andrea Šepak, 1086/PI

Abstract: *This paper determines the influence of sous-vide cooking parameters and cold storage on color, drip loss, protein solubility and protein oxidation of Atlantic cod fillet (*Gadus morhua*, L.). Measurements were taken on samples treated with different temperatures (50°C, 60°C, 70 °C and 80°C) and different time sets (5 and 10 minutes) and on control samples. The highest drip loss was observed in samples thermally treated at 80°C. The higher heat treatment temperature of samples also showed a higher value of the L* color parameter, while the b* parameter increased in accordance with the increase in the carbonyl content. Although a higher content of sarcoplasmic than myofibrillar proteins was found, this proportion decreased in both cases as the temperature of the sous-vide heat treatment increased. Protein oxidation is expressed by the proportion of total carbonyl, which is close to insignificant in control samples. Treatment of the samples at temperatures of 50°C and 60°C revealed a higher proportion of carbonyl in sarcoplasmic protein fractions, while at temperatures of 70°C and 80°C the proportion of carbonyl was higher in myofibrillar protein fractions.*

Keywords: *sous-vide cooking method, chilled storage, Atlantic cod*

Thesis contains: 47 pages, 34 figures, 1 table, 58 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *Tibor Janči, Assistant professor*

Technical support and assistance: *Janna Crobotova, Associate professor*

Reviewers:

1. PhD. *Sanja Vidaček Filipec*, Full professor
2. PhD. *Tibor Janči*, Assistant professor
3. PhD. *Anet Režek Jambrak*, Full professor
4. PhD. *Irena Barukčić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 26 September 2019

SADRŽAJ:

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	3
2.1.	ATLANTSKI BAKALAR	3
2.2.	SASTAV I STRUKTURA RIBLJEG MIŠIĆJA	4
2.3.	SOUS-VIDE METODA	5
2.3.1.	UTJECAJ <i>SOUS-VIDE</i> METODE NA MIOFIBRILARNE PROTEINE.....	6
2.3.2.	UTJECAJ <i>SOUS-VIDE</i> METODE NA SARKOPLAZMATSKE PROTEINE	6
2.3.3.	UTJECAJ <i>SOUS-VIDE</i> METODE NA PROTEINE VEZIVNOG TKIVA	6
2.4.	KALO TERMIČKE OBRADU	7
2.5.	PROMJENE BOJE UZROKOVANE TERMIČKOM OBRADOM	8
2.6.	HLAĐENJE RIBE	8
2.7.	SKLADIŠTENJE RIBE U ZAMRZNUTOM STANJU	9
2.8.	OKSIDACIJA PROTEINA	10
2.9.	OKSIDACIJA PROTEINA U MORSKIM NAMIRNICAMA	10
2.10.	UTJECAJ OKSIDACIJE PROTEINA NA KVALITETU RIBE	12
2.11.	ODREĐIVANJE STUPNJA OKSIDACIJE PROTEINA	12
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1.	MATERIJALI	14
3.2.	METODE	17
3.2.1.	ODREĐIVANJE BOJE	17
3.2.2.	KALO TERMIČKE OBRADU	18
3.2.3.	TOPLJIVOST PROTEINA	19
3.2.4.	BIORAD METODA ZA ODREĐIVANJE PROTEINA.....	20
3.2.5.	ODREĐIVANJE OKSIDACIJE PROTEINA	21
3.2.6.	STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	22
4.	REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1.	GUBITAK MASE TIJEKOM KUHANJA	24
4.2.	PROMJENA BOJE	27
4.3.	TOPLJIVOST PROTEINA	34
4.4.	OKSIDACIJA PROTEINA	38
5.	ZAKLJUČCI	42
6.	LITERATURA	43

1. UVOD

Ribe od davnina pripadaju u vrlo značajne namirnice animalnog podrijetla u prehrani čovjeka. Za veći dio pučanstva osnovni su izvor hrane. Španjolska, zajedno s Portugalom i Norveškom, predstavlja glavne potrošače ribe u svijetu (71 g po osobi dnevno; oko 26 kg godišnje) (Varela i sur., 1991), što je mnogo veća brojka od one koja je relevantna za ostatak europskih zemalja. U prehrani stanovništva Republike Hrvatske još uvijek je nedovoljno zastupljena, o čemu govori i podatak da se prosječno pojede oko 7,76 kg svježe morske i slatkovodne ribe godišnje, što je oko 3 puta manje od prosječne potrošnje u svijetu (Katavić i sur., 2001). U posljednjih nekoliko godina primijećeno je povećanje potrošnje ribe zahvaljujući saznanjima o blagotvornim učincima konzumiranja ribe na zdravlje.

U nutritivnom pogledu, riba je važan izvor sastojaka prijeko potrebnih za život čovjeka, posebno bjelančevina. Najvrijedniji sastojci ribljeg mesa su bjelančevine, koje uz masti i ugljikohidrate čine osnovu pravilne prehrane. Međutim, riba i riblji proizvodi podložni su raznim biokemijskim, fizikalnim i mikrobnim oblicima propadanja tijekom prolaska kroz proizvodni lanac. Značajan dio kvalitete svježe ili prerađene ribe često se gubi i na razini potrošača ili maloprodaje. Da bi se povećala prosječna količina ribe koja se konzumira kod kuće, treba imati na raspolaganju kvalitetne morske plodove, koji su pravilno pripremljeni i prikladno pakirani (Schellekens, 1996). Danas, zbog rastućeg broja zdravstveno osviještenih potrošača, poseban interes posvećuje se uporabi minimalno procesirane hrane i blagim toplinskim tretmanima s ciljem očuvanja nutritivne vrijednosti prehrambenih proizvoda uz istodobno osiguranje njihove visoke kvalitete i stabilnosti (Li i sur., 2016).

Metoda *sous-vide* (franc. *pod vakuumom*) podrazumijeva minimalnu termičku obradu namirnica pri kontroliranim uvjetima. Riba obrađena *sous-vide* metodom zadržava svojstvene osobine (prirodni i svježi izgled morske hrane te duži rok trajanja). Međutim, primjena visokih termičkih tretmana na ribi narušava njene senzorske karakteristike, stoga je poželjna termička obrada u rasponu od 60°C do 80°C u vremenu do maksimalno 40 min. Zbog niskih temperatura tretiranja, kod *sous-vide* termički obrađenih riba važno pitanje sigurnosti predstavlja kontrola preživjelih mikroorganizama (NACMCF, 1990).

Do unazad 5 godina, glavna istraživanja *sous-vide* kuhane ribe temeljila su se na mikrobiološkoj kontroli kuhanih uzoraka (Bem i sur., 1993; Bergslien, 1996; Gittleson i sur., 1992), u malo kojem radu mogao se vidjeti utjecaj *sous-vide* termičke obrade ribe na promjeni kvalitete njenih fizikalnih i kemijskih svojstava. Cropotova i sur. (2016) te Oz i sur. (2016) proveli su

istraživanja utjecaja parametra *sous-vide* kuhanja na kvalitetu kemijskih i fizikalnih svojstava atlantske skuše i pastrve, a Skipens i sur. (2014) utjecaj parametara *sous-vide* metode na uzorke bakalara.

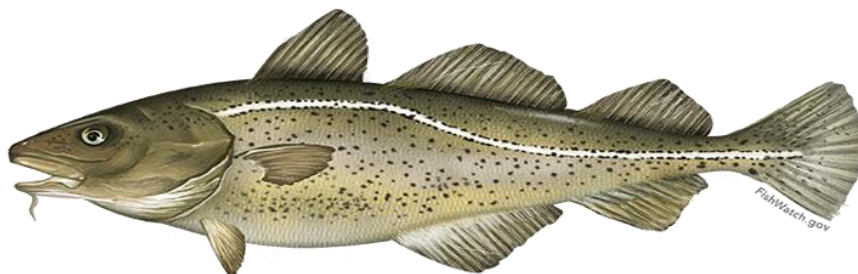
Upravo iz gore navedenih razloga, u ovom radu proučavat će se utjecaj različitih parametara *sous-vide* metode kuhanja te hladnog skladištenja na nemasnu, demerzalnu ribu – atlantski bakalar (*Gadus morhua*). Promatrat će se kako termičke obrade te promjena boje različito tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolne. Također, Bradfordovom metodom određivat će se udio proteina topljivih u vodi te u otopini soli, dok će se isto tako relativno novo i nedovoljno istraženo područje - oksidacija proteina, određivati uz pomoć udjela proteinskih karbonila, ELISA testom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ATLANTSKI BAKALAR

Atlantski bakalar (*Gadus morhua*) (Slika 1) grabežljiva je morska riba koštunjača iz porodice bakalara (*Gadidae*). Dominantna je vrsta u mnogim svjetskim ekosustavima i već stoljećima značajna za mnoga ribarska područja (Kurlansky, 1997). Raširen je u sjevernom Atlantiku od plitkih do dubokih voda te obitava u pridnenom sloju. Bakalar je najplodnija riba: ženka tijekom mriješćenja izbacila i do 9 milijuna jaja. Tipično, bakalar sazrijeva u dobi od 2-4 godine i nakon toga se mrijesti jednom godišnje. Planktonski stadij ličinke traje oko tri tjedna, a zatim se spušta na morsko dno, kada mlade ribe počinju svoj život u demerzalnoj zoni. Hrani se drugim ribama i različitim beskralježnjacima. Srednja lovna masa mu je oko 11,5 kg, ali može dosegnuti duljinu od 1,8 m i masu od 91 kg. Prekomjerni ribolov 1950-ih godina, pritom naglašavajući ribolov nezrelih bakalara, doveo je do dramatičnog pada populacije bakalara i trenutno je atlantski bakalar klasificiran kao ugrožen (FAO, 2007). Kao posljedica smanjene dostupnosti ove vrste i posljedično visoke cijene (Tilseth, 1990), došlo je do povećanog interesa za akvakulturni uzgoj ove vrste te sadašnje farme bakalara postoje u Norveškoj, Škotskoj, Kanadi i SAD-u (Brown i sur., 2003). Očekuje se da će se proizvodnja bakalara u svijetu povećati s 8000 tona (FAO, 2007) na 400.000,00 tona godišnje u 2020.

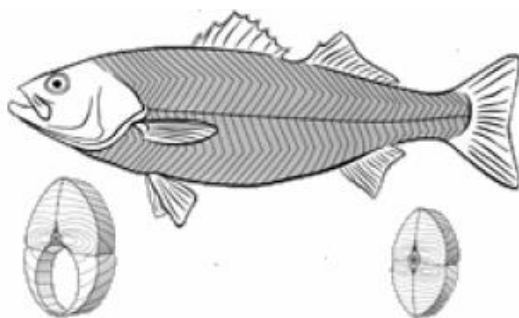
Jedna je od najvažnijih riba u svjetskoj prehrani. Na tržište dolazi svjež, zaleđen, sušen na zraku, soljen i sušen u sušnici te u obliku duboko smrznutih odrezaka. Iz jetre bakalara vadi se ulje koje je poznato kao najbogatiji izvor vitamina D.



Slika 1. Atlantski bakalar (Anonymous, 2017)

2.2. SASTAV I STRUKTURA RIBLJEG MIŠIĆJA

Skeletno mišićje riba može se općenito podijeliti na mišićje trupa, mišićje peraja, mišićje glave i mišićje škržnih lukova. Mišićje trupa čini najveću mišićnu masu tijela. Sastoji se od mišićnih segmenata (miomera) koje su međusobno odvojene vezivno-tkivnim septama (Slika 2). Unutar pojedine miomere mišićna vlakna teku paralelno s uzdužnom osi tijela. Kod viših riba, oblik miomera ovisi o položaju na tijelu. Miosepte koje odjeljuju pojedine miomere nisu okomito položene na osovinski skelet već su na njega položene pod oštrim kutom, zbog čega je kod poprečnog presjeka ribe zahvaćeno više miomera.



Slika 2. Oblik miomera koštunjača (Kozarić, 2001)

Proteini mišića mogu se podijeliti u tri skupine, na temelju svojstava topljivosti (Haard, 1992). Oni koji su topljivi u vodi ili sarkoplazmatski proteini (uglavnom enzimi), proteini topljivi u otopini soli ili miofibrilarni proteini (kontraktilna vlakna) i netopljivi proteini (prvenstveno kolagen). Mišićje ribe sadrži relativno visoku koncentraciju miofibrilarnih proteina i nisku koncentraciju netopljivih proteina u usporedbi s mišićima kopnenih životinja (Tablica 1).

Tablica 1. Raspodjela proteinskih frakcija u mišićju ribe (Haard, 1992)

izvor	sarkoplazmatski proteini (%)	miofibrilarni proteini (%)	proteini tkiva (%)	vezivog
riba, općenito	10-25	70-90	3-10	
bakalar, atlantski	21	76	3	
šaran	24	71	5	
iverak	21	76	3	
govedina	16-28	39-68	16-28	

To podrazumijeva da su miofibrilarni proteini vrlo važni za teksturu i svojstva zadržavanja vode u mišićima ribe.

Ovaj je rad usredotočen na bakalar, vrstu koja je ekonomski važna za Norvešku, a dostupna je kao divlja i uzgojena riba. Spada u prave koštunjače, demerzalne nemasne ribe koje akumuliraju mast u jetri, a lijevi i desni fileti smatraju im se jednakima. Prosječni sastav mišića bakalara podrazumijeva oko 81 % vode, 18 % proteina, 0.5 % lipida i 1 % pepela (Foegeding i sur., 1996). Treba naglasiti da se sastav znatno razlikuje čak i unutar vrste, zbog veličine i starosti riba, godišnjih doba, nutritivnog statusa i spolnog sazrijevanja ribe. Osim toga, kod iste jedinice sastav varira između različitih dijelova fileta (Katikou i sur., 2001; Rasmussen, 2001).

2.3. SOUS-VIDE METODA

Tehnologija *sous-vide* definirana je kao hrana kuhana u kontroliranim uvjetima temperature i vremena unutar termički stabilnih vakuumskih vrećica (Schellekens i Martens, 1992). Obrada *sous-vide* metodom uključuje različite temperature termičke obrade / pasterizacije.

Termička obrada *sous-vide* razlikuje se od tradicionalnih metoda kuhanja na dva načina: sirova hrana vakuumski je zatvorena u termički stabilnim, plastičnim vrećicama za hranu i hrana se kuha pomoću precizno kontroliranog zagrijavanja. Vakuumsko pakiranje ima nekoliko prednosti: dopušta prijenos topline iz vode (ili pare) u hranu, povećava vijek trajanja hrane uklanjanjem opasnosti od ponovne kontaminacije tijekom skladištenja, inhibira neugodne okuse, sprječava gubitke isparavanja aromatskih spojeva i vlage tijekom kuhanja (Church i Parsons, 2000) i smanjuje rast aerobnih bakterija, što rezultira posebno aromatičnom i nutritivno bogatom hranom (Church, 1998; Creed, 1998).

Za kuhare veću važnost predstavlja kontrolirana temperatura obrade, nego vakuumirana ambalaža, jer ona omogućava gotovo savršenu reproducibilnost, veću kontrolu u usporedbi s tradicionalnim metodama kuhanja te hrana može biti pasterizirana i sigurna pri temperaturnoj obradi na nižim temperaturama, tako da se ne mora dugo kuhati, a svejedno pruža zdravstvenu sigurnost.

2.3.1. UTJECAJ *SOUS-VIDE* METODE NA MIOFIBRILARNE PROTEINE

Iako postoji oko 20 različitih miofibrilarnih proteina, 65-70 % od ukupnih čine miozin i aktin. Miozinske molekule tvore debele, a aktinske molekule tanke filamente unutar mišićnih vlakana. Mišićna vlakna počinju se skupljati na temperaturama od 35°C do 40°C, a skupljanje se povećava gotovo linearno do 80°C. Sposobnost vezanja vode cjelokupnog mišićnog tkiva ovisi o skupljanju i bubrenju miofibrila. Oko 80 % vode u mišićnom tkivu drži se unutar tih miofibrila između debelih (miozin) i tankih (aktinskih) vlakana. Između 40°C i 60°C, vlakna mišića poprečno se skupljaju i proširuje se razmak između vlakana. Zatim, iznad 60°C-65°C, mišićna vlakna se skupljaju uzdužno i uzrokuju znatan gubitak vode pri čemu intenzitet ove kontrakcije raste s temperaturom (Baldwin, 2011).

2.3.2. UTJECAJ *SOUS-VIDE* METODE NA SARKOPLAZMATSKE PROTEINE

Sarkoplazmatski proteini sastavljeni su od oko 50 komponenti, ali uglavnom od enzima i mioglobina. Za razliku od miofibrilarnih proteina i vezivnog tkiva, sarkoplazmatski proteini bubre pri zagrijavanju. Agregacija i geliranje sarkoplazmatskih proteina počinje oko 40°C, a završava oko 60°C. Prije nego što su ti enzimi denaturirani, mogu značajno povećati mekoću mišićja. Odnos mioglobina (Mb), oksimioglobina (MbO₂) i metmioglobina (MMb) određuje boju mesa (Baldwin, 2011).

2.3.3. UTJECAJ *SOUS-VIDE* METODE NA PROTEINE VEZIVNOG TKIVA

Proteini vezivnog tkiva (ili netopljivi proteini) drže na mjestu mišićna vlakna, kosti i masnoću te okružuju pojedinačna mišićna vlakna (endomizij), njihove snopove (perimizij) te snopove tih snopova (epimizij). Vezivno tkivo sastoji se od kolagena i elastinskih vlakana ugrađenih u amorfnu strukturu staničnih tvari (uglavnom mukopolisaharida). Kolagenska vlakna dugački su lanci tropokolagena, koji se sastoje od tri polipeptida namotanih jedan o drugoga poput troslojne niti. Vlakna kolagena počinju se skupljati oko 60°C, dok je njihovo intenzivnije skupljanje prisutno na temperaturama preko 65°C. Skupljanje uglavnom uništava njihovu trostruku spiralnu strukturu, pretvarajući je u zavojnice topljive u vodi, želatinu. S druge strane, elastinska vlakna ne denaturiraju pri termičkoj obradi te imaju svojstva nalik gumama. Brzina denaturacije kolagena raste eksponencijalno s višim temperaturama pa se iz

sigurnosnih razloga obično koristi temperatura od 55°C kao najniža praktična temperatura denaturacije kolagena (Baldwin, 2011).

2.4. KALO TERMIČKE OBRAD

U temperaturnom intervalu od 50°C do 100°C događaju se značajne promjene na različitim proteinima (miozin, sarkoplazmatski proteini, aktin, proteini vezivnog tkiva). Kao posljedica navedenih promjena (denaturacija, koagulacija, hidroliza) dolazi do promjene odnosa između proteina i vode koja se nalazi u mesu ribe, što uzrokuje razaranje veza između proteina i molekula vode te otpuštanja vode iz uzorka. Što su promjene na proteinima veće, veći broj molekula vode će biti otpušten te je intenzivniji gubitak vode tijekom termičke obrade. Zajedno s vodom, tijekom termičke obrade, gube se i druge tvari topljive u vodi (topljivi proteini, mineralne tvari i vitamini) (Kazemi i sur., 2011). Meinert i sur. (2007) navode da gubitak vode iz mesa ribe uzrokuje povećanje sadržaja suhe tvari i sastojaka koji čine suhe tvari (proteini, masti, mineralne tvari). Na različitim temperaturama termičke obrade odvijaju se razne promjene na različitim proteinima, što uvjetuje količinu otpuštene vode, a time i sadržaj ostalih tvari. Tijekom pečenja, promjene na proteinima odvijaju se znatno brže, uslijed višeg gradijenta temperature između peći i uzorka, pri čemu temperatura u uzorku brže doseže određenu vrijednost. Ovako visoka temperaturna razlika, s obzirom na činjenicu da mišićje ima nizak koeficijent provođenja topline, izaziva pojavu neravnomjerne raspodjele temperature po aksijalnom pravcu promatrano od površine k centru uzorka mišićja, tako da dolazi do pojave većeg broja slojeva s višim temperaturama od one koja se želi postići u centru uzorka. Kod kuhanih uzoraka temperaturni gradijent je manji, pa je manji i broj spomenutih intervala. Sve to rezultira većim gubitkom vode kod uzoraka obrađenih pečenjem, nego kod onih obrađenih kuhanjem (Amézquita, 2004). Boles i Swan, (2002) navode da u toku termičke obrade mišićja dolazi do denaturacije i hidrolize proteina, što u krajnjem slučaju daje blago povećanje pH vrijednosti, s tim da je ono intenzivnije kod uzoraka obrađenih kuhanjem. Prema Thornbergu (2005) i Toldri (2010) s povećanjem temperature tijekom termičke obrade dolazi do povećanog otpuštanja tekućina kako u vidu tekuće faze, tako i isparavanjem. To za krajnji rezultat ima smanjenje udjela vode u uzorku s povećanjem temperature termičke obrade. Smanjenje udjela vode u uzorku ima za direktnu posljedicu i smanjenje aktiviteta vode s povećanjem temperature tokom termičke obrade uzorka. Barbieri i Rivaldi (2008) navode da sposobnost vezivanja vode

(SVV) direktno ovisi o promjenama na proteinima tijekom termičke obrade. Između 60°C i 80°C dolazi do raspadanja miofibrilarne strukture i povećanog otpuštanja tekuće faze.

2.5. PROMJENE BOJE UZROKOVANE TERMIČKOM OBRADOM

Termička obrada ribe ima znatan utjecaj na promjenu boje svježeg mesa zbog denaturacije i promjena na mioglobinu. Povećanjem temperature dolazi do promjena i denaturacije mioglobina. Kao rezultat tih promjena mijenja se boja, u ovisnosti o režimu termičke obrade, brzini obrade i visini temperature. Gotovo svi proteini se denaturiraju tijekom termičke obrade ribe, što za posljedicu ima izrazite promjene u boji. Mioglobin se denaturira na temperaturama oko 60°C (Godsell, 2000). Promjena boje ribe tijekom termičke obrade ovisi o stupnju denaturacije tri forme mioglobina. Metmioglobin je smeđi globin hemikromogen, dok su oksimioglobin i deoksimioglobin forme crvenog globin kromogena, koji lako može oksidirati do hemikromogena. Veliki broj faktora, kao što su (režim termičke obrade, brzina zagrijavanja, način pakiranja i skladištenja mesa, pH) utječu na postojanost svježe ili intenziviranje boje termički obrađene ribe.

2.6. HLAĐENJE RIBE

Svježa riba u prometu može biti cijela, eviscerirana, filetirana ili obrađena na drugi sličan način, nepakirana ili pakirana, no svakako hlađena. Hlađenje odmah nakon ulova je ključan korak kod proizvoda ribarstva. Cilj hlađenja je produljenje roka trajanja ribe usporavanjem djelovanja enzima i bakterija, te fizikalnih i kemijskih promjena koje mogu utjecati na kvalitetu. Snižavanjem temperature kemijske i biokemijske reakcije usporavaju, ali se i dalje odvijaju. Ohlađena hrana obično se čuva na temperaturi koja je blizu njihove točke smrzavanja, u rasponu od + 8 °C do - 1 °C (Drummond i sur., 2010). Najčešća metoda hlađenja za ribu je upotreba leda. Ostale metode su uporaba ohlađene vode, ledene kaše, rashlađene morske vode i skladištenje uz pomoć hladnog zraka.

Budući da je u ovom istraživanju kao metoda hlađenja ribe korišten led, samo ta metoda bit će opisana u daljnjem tekstu.

Hlađenje ledom najekonomičniji i najčešći je način hlađenja ribe. Takvu ribu nazivamo "poleđena" ili "šokirana" riba. Omjer ribe i leda varira ovisno o temperaturi okoline, no i o vrsti

ribe, odnosno kemijskom sastavu, ali i geografskom području izlova. Količina leda koji se obično koristi se određuje na osnovu prakse, a kreće se u omjeru od 1:1. Za hlađenje proizvoda ribarstva koriste se sljedeće vrste leda: ljuskasti, pločasti, cjevasti i suhi led. Vrlo je važno naglasiti da se led radi od vode koja kakvoćom odgovara vodi za piće, ili od čiste morske vode. Kod njegove proizvodnje, izuzetno je važna higijena, što podrazumijeva higijensku konstrukciju uređaja i precizne procedure čišćenja i dezinfekcije (Vidaček, 2013).

2.7. SKLADIŠTENJE RIBE U ZAMRZNUTOM STANJU

Zamrzavanje oštećuje tkivo ribe i na molekularnom i na staničnom nivou, što može uzrokovati promjene strukture, sastava, udjela vode, masti te količine soli u tkivu. Proces zamrzavanja djeluje na sljedeće načine na biološko tkivo:

1. uništava staničnu membranu tako da ona ne djeluje kao barijera između unutarstaničnog i izvanstaničnog prostora, te ne kontrolira interakcije koje određuju strukturu proteina, strukturu citoskeleta i interakcije enzim-ligand
2. dovodi do parcijalne dehidratacije stanica i povišenja koncentracije soli u njima
3. uzrokuje mehanička oštećenja stanica formiranjem unutarstaničnog leda

Kako uništenje membrana, parcijalna dehidratacija i povišenje koncentracije soli te formiranje kristala leda ubrzavaju denaturaciju i agregaciju proteina, posljedično je glavni negativni aspekt zamrzavanja smanjenje funkcionalnih svojstava proteina. Miofibrilarni proteini posebno su podložni denaturaciji uslijed zamrzavanja, što dovodi do smanjenja njihove sposobnosti vezanja vode. Tehnološki aspekt sniženja sposobnosti vezanja vode očituje se kroz smanjenje topljivosti, sposobnosti geliranja i stvaranja emulzija proteina, a organoleptički kroz promjene na teksturi. Od sarkoplazmatskih proteina koji se također denaturiraju uslijed zamrzavanja važni su mioglobin (kod pelagičkih vrsta) te enzimi. Tijekom zamrzavanja dolazi do diskoloracije uslijed denaturacije mioglobina, no ta promjena je manje važna kod većine proizvoda ribarstva (za razliku od zamrzavanja crvenog mesa). Zamrzavanje ima značajniji utjecaj na enzime, i to posebno na lipaze i lipoksigenaze čija aktivnost dovodi do vjerojatno najznačajnije negativne promjene tijekom zamrzavanja proizvoda ribarstva – promjena na okusu. No, iako se aktivnost enzima ne inhibira uslijed niskih temperatura tijekom zamrzavanja, njihova aktivnost je niža nego u svježem stanju jer se i oni denaturiraju uslijed već navedenih promjena na tkivu uslijed zamrzavanja. Ipak, promjene u okusu nisu posljedica samo enzimatskih aktivnosti, nego i onih ne-enzimatskih te se i one smatraju uzročnicima negativnih

promjena u okusu tijekom zamrzavanja. Razvitak negativnih promjena u okusu, odnosno užeglosti, je vrlo složen. Kontrola reakcija koje dovode do navedenih promjena nije jednostavna uslijed velikog broja različitih vrsta riba s različitom strukturom i kemijskim sastavom, uslijed toga što u potpunosti nisu razjašnjeni niti mehanizmi koji dovode do ovih reakcija, ni odnos između oksidacije masti i denaturacije proteina (Vidaček, 2013).

2.8. OKSIDACIJA PROTEINA

Oksidacija proteina jedan je od uzroka za narušavanje kvalitete tijekom prerade i skladištenja prehrambenog proizvoda. Ona rezultira nastankom raznih oksidacijskih derivata. Glavne oksidacijske modifikacije događaju se na bočnim lancima aminokiselina koje uključuju tiolnu oksidaciju, aromatsku hidroksilaciju i formiranje karbonilnih skupina (Stadman, 1990).

Među svim bočnim lancima aminokiselina, cistein i metionin su najosjetljiviji na oksidaciju jer sadrže reaktivne atome sumpora. Sumporni anion najmoćniji je nukleofil i bogat je elektronima. Reaktivne oksidacijske vrste uključuju slobodne radikale (OH i O₂), neradikale (H₂O₂ i ROOH) i reaktivne aldehide. Oksidansi mogu direktno reagirati s molekulama proteina i na taj način uzrokovati fragmentaciju te konformacijske promjene u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina.

Promjene koje se događaju kao posljedica oksidacije proteina utječu na fizikalna i kemijska svojstva proteina kao što su topljivost, hidrofobnost te sposobnost vezanja vode. Druge promjene, također izazivane oksidacijom mogu smanjiti biološku vrijednost proteina modifikacijom aminokiselinskih ostataka probavljivosti proteina, što negativno utječe na nutritivnu vrijednost proteina mišićja.

2.9. OKSIDACIJA PROTEINA U MORSKIM NAMIRNICAMA

Reaktivni spojevi kisika, poput vodikovog peroksida, superoksida, hidroksil radikala, peroksinitrata i peroksilnih radikala, nastaju u živim stanicama putem metaboličkih procesa, poput onih u sustavima za prijenos elektrona, a mogu se ponašati kao signalne molekule. Također, mogu nastati kao odgovor na vanjske podražaje, na primjer: zračenje, stres, zagađenje (Davies i Dean, 1997). Općenito, žive stanice sposobne su se braniti od reaktivnih spojeva

kisika koristeći kompleksne enzimске i antioksidativne molekule te njihov sustav oporavljanja, koji rezultira kontrolom reaktivnih spojeva kisika u organizmu. Antioksidativni sustav, uključujući reducirajuće enzime i nisku molekulsku masu antioksidativnih komponenata, osigurava minimalnu štetu staničnih komponenata te održava optimalnu staničnu funkciju. Doista, reaktivni spojevi kisika su jaki oksidansi koji su sposobni inducirati oksidaciju staničnih sastojaka, ali pod normalnim uvjetima oksidirane stanične komponente, poput lipida i proteina se ne nakupljaju. Produkti oksidacije uklanjaju se pomoću enzimskih sustava, poput katepsina u lizosomima. Tijekom starenja, metabolizam i enzimski sustavi su oštećeni, što rezultira nakupljanjem reaktivnih spojeva kisika, s posljedicom nakupljanja oksidiranih lipida (lipofuscin) i proteina (amiloidni plak), što rezultira patologijom nekoliko bolesti (Dean i sur., 1997; Grimm i sur., 2012). U *post mortem* periodu, nedostatak ATP-a i kofaktora u mišićima, kao i anaerobni uvjeti vode do prekida kontroliranih enzimskih reakcija, što rezultira potrošnjom antioksidansa, a to dovodi do prekida ravnoteže sustava i oksidacije komponenata mišićne stanice. Oksidacija proteina u proizvodima ribarstva nije izazvala toliku pažnju poput oksidacije masti, jer oni rezultiraju suptilnim promjenama koje ljudska osjetila ne opažaju odmah. Nadalje, proteini su jako velike i kompleksne molekule organizirane u različite strukture, i njihova organizacija može dovesti do velikog broja modifikacija ili proteinskih bočnih lanaca ili proteinske osovine. Te modifikacije uključuju modifikacije aminokiselina te razgradnju i umrežavanje proteina. Proteini su sastavni dio stanica i tkiva, u mišićnom tkivu prisutni u postotku od 20 % od ukupne mase, što može biti više nego udio lipida. U mišićju riba, udio lipida varira od 1 % do 30 %, ovisno o vrsti ribe i fiziološkom statusu. Istraživanja su pokazala da reaktivni hidroksil radikal često brže reagira s proteinima, nego lipidima, pri čemu konstante reakcije iznose 9×10^9 za linoleinsku kislinu i 4×10^{11} za kolagen (Davies i Dean, 1997). U hrani, mehanizam oksidacije proteina vrlo malo je istražen, vjerojatno zbog kompleksnih produkata reakcija i limitiranosti metoda dostupnih za istraživanje oksidacije proteina i proteinskih modifikacija. Ipak, sve više pažnje posvećuje se istraživanju oksidacije proteina u namirnicama i njihovim posljedicama za kvalitetu proizvoda. Sada je prihvaćeno da ne samo lipidi, već i proteini oksidiraju te da to može utjecati na kvalitetu proizvoda, modifikaciju funkcije proteina i nutritivne implikacije.

2.10. UTJECAJ OKSIDACIJE PROTEINA NA KVALITETU RIBE

Proteini su glavne komponente mišićnog tkiva i upravo zbog toga modifikacija prirodne strukture proteina može utjecati na kvalitetu hrane, pri tome misleći na teksturu, aromu, sposobnost vezanja vode, boju i funkcionalnost (Estevez i sur., 2009).

Oksidacija proteina uzrokuje brojne fizikalno kemijske promjene u proteinima, uključujući modifikacije aminokiselina, promjene u topljivosti proteina i funkcionalnosti, gubitak enzimske aktivnosti i smanjenu probavljivost proteina (Xiong, 2000). Uzimajući u obzir te modifikacije, može se reći da promjene inducirane oksidacijom proteina u ribi, također utječu na kvalitetu ribe.

Promjene u intermolekularnim i intramolekularnim interakcijama unutar proteina uzrokovane oksidacijom proteina dovode do konformacijskih promjena proteina. Te promjene mogu povećati površinsku hidrofobnost, zbog promjena u terciarnoj strukturi. Nadalje, formiranje dimera, trimera i polimera te drugih inter i intra molekularnih veza može dovesti do agregacije proteina. Također, može doći i do denaturacije te taloženja proteina, koje za posljedicu imaju smanjenje topljivosti proteina (Zhang i sur., 2013).

Gubitak funkcionalnosti proteina najčešće se povezuje sa smrzavanjem i procesiranjem ribe. Na primjer, gubitak funkcionalnosti ima negativan utjecaj na geliranje proteina ribe, što je bitan korak pri preradi nemasnih riba u surimi proizvode (Park, 2000). U proizvodnji surimija, dokazano je da oksidacija, tijekom faze pranja, rezultira slabijim sposobnostima stvaranja gela, što je izravno povezano s oksidacijom proteina (Tunhun i sur., 2001). Oksidirani aktomiozin iz ribe ne reagira dobro na enzimsko umrežavanje putem transglutaminaze, dodatno potvrđujući da oksidacija proteina može narušiti enzimske reakcije i geliranje (Visessanguan i sur., 2003). Smanjenje funkcionalnosti i topljivosti proteina povezana je i sa smanjenjem slobodnih tiolnih skupina (Maforimbo i sur., 2007).

2.11. ODREĐIVANJE STUPNJA OKSIDACIJE PROTEINA

Proteinska karbonilacija glavni oblik je oksidacije proteina i široko se koristi kao pokazatelj oksidativnog stresa. Karbonilne skupine ne absorbiraju UV ili vidljivi dio spektra, te nemaju ni fluorescentne karakteristike, a njihovu detekciju i kvantifikaciju možemo provesti samo pomoću specifičnih kemijskih proba. Kvantifikacija karbonil proteina može se mjeriti

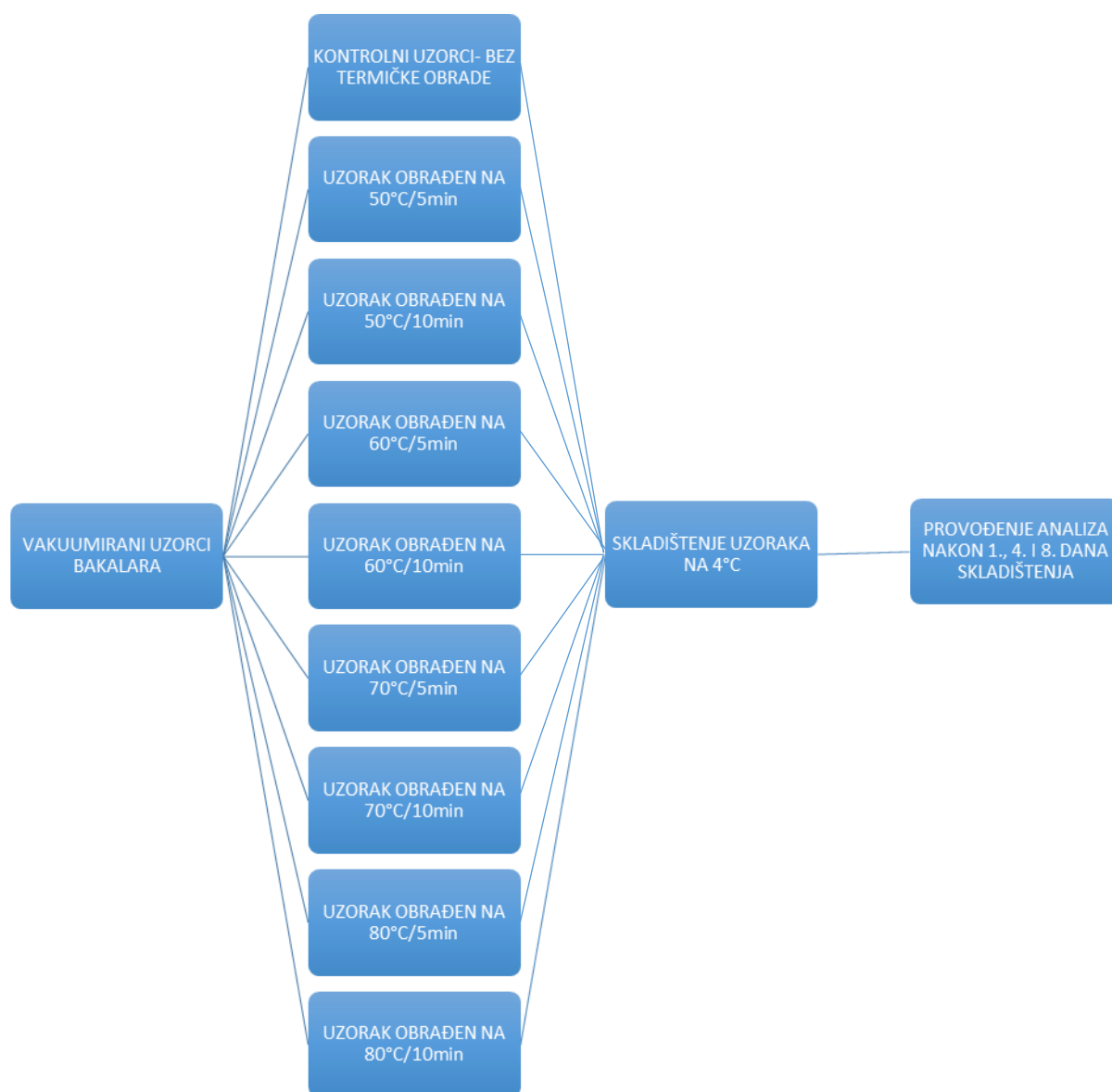
pomoću imunoenzimskog testa (ELISA). Test uključuje upotrebu biotin povezanih anti-DNP antitijela koja ne samo da se vežu na obložene DNP-derivatizirane proteine, već olakšavaju detekciju sa streptavidinom. Prednost ELISA metode je da test treba samo mikrogramske količine proteina te se može mjeriti više uzoraka istovremeno (Yan i Forster, 2011).

Imunoanalitička tehnika ELISA (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) omogućava detekciju specifičnog analita ili tvari koja se želi kvalitativno ili kvantitativno odrediti u nekom uzorku. Temelji se na interakciji između liganda i odgovarajućeg antitijela koja se detektira obilježavanjem antitijela s enzimom (peroksidaza iz hrena, alkalna fosfataza, β -galaktozidaza) i pojavom fluorescencije ili promjene boje uslijed reakcije (Dalle-Donnea i sur., 2003). U ovom slučaju reaktivne aldehidne i ketonske skupine bočnih ogranaka proteina (najčešće se radi o aminokiselinama prolinu, argininu, lizinu i treoninu) derivatizirane su s 2,4-dinitrofenolhidrazinom (DNPH) nakon čega primarno antitijelo anti-DNPH prepoznaje proteine s derivatiziranim skupinama, a slijedi vezanje sekundarnog antitijela konjugiranog s enzimom na primarno.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Uzorci bakalara: bakalar visoke kvalitete, s oznakom "*Skrei*", dobiven je iz Vengsøya, blizu Tromsa (Norveška), na dan ulova. Riba je eviscerirana, zaleđena i transportirana u laboratorij *Nofima* (Tromsø, Norveška) istog dana. Sutradan, riba je filetirana, a za daljnja istraživanja, korišteni su dorzalni mišići bakalara. 54 uzoraka podijeljeno je u 3 skupine: jedna za referentnu skupinu (6 vakuumiranih uzoraka korištenih za ispitivanje utjecaja vremena skladištenja, bez termičke obrade), druga serija korištena je za uzorke obrađene na 50°C i 60°C, a treća serija za uzorke obrađene na 70°C i 80°C. Uzorci su termički obrađeni *sous-vide* metodom pri različitim temperaturama i trajanju termičke obrade. Nadalje, termički obrađeni i referentni uzorci skladišteni su u hladnjaku na +4°C te je 1., 4. i 8. dan skladištenja iz svake grupe uzeto po 2 uzorka na kojima su provedene analize. Do provođenja analiza, uzorci su zamrznuti i čuvani na -40°C kako bi se što bolje sačuvala njihova svojstva.



Slika 3. Slijed *sous-vide* termičke obrade uzoraka te skladištenje (vlastita shema)

Na slici 3 razjašnjena je termička obrada uzoraka. Na kraju svake termičke obrade pri pojedinoj temperaturi, uzorci se skladište u hladnom 1, 4 ili 8 dana te se dobije po 6 uzoraka od kojih svaki ima 2 paralele (ukupno 12) iz svake grupe uzoraka.

Prilikom izvođenja eksperimenta korištene su sljedeće kemikalije:

- anti-DNP antitijelo, Cell Biolabs, USA
- blokirajući reagens, Cell Biolabs, USA
- destilirana voda
- DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin), Cell Biolabs, USA

- DNPH razrjeđivač, Cell Biolabs, USA
- 0,05 M fosfatni pufer s 0,6 M KCl (1 L pufera sadrži: 6,8045 g KH_2PO_4 , 0,582 g NaOH, 44,736 g KCl te destiliranu vodu)
- 0,05 M fosfatni pufer (1 L pufera sadrži: 6,8045 g KH_2PO_4 , 1,164 NaOH te destiliranu vodu)
- 0,01 M fosfatni pufer pripremljen miješanjem 80 mL otopine I, 100 mL otopine II i destilirane vode do konačnog volumena od 1 L. Vrijednost pH ovako pripremljenog PBS pufera iznosi između 7,1 i 7,3.

OTOPINA I: NaCl – 100 g, KCl – 2,5 g, Na_2HPO_4 – 14,35 g, KH_2PO_4 – 2,5 g, nadopuniti destiliranom vodom do 1L

OTOPINA II: CaCl_2 – 100 g, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 2,5 g, nadopuniti destiliranom vodom do 1L

- goveđi gama globulin, Cell Biolabs, USA
- kalij dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Merck, Danmstadt, Germany
- kalij klorid (KCl), VWR Chemicals, Norway
- komercijalni Bio-Rad reagens, Bio-Rad Laboratories, USA
- natrijev hidroksid (NaOH), VWR Chemicals, Norway
- oksidirajući BSA standard (BSA- albumin iz goveđeg seruma), Cell Biolabs, USA
- 96 % etanol
- otopina za zaustavljanje reakcije, Cell Biolabs, USA
- reducirajući BSA standard (BSA- albumin iz goveđeg seruma), Cell Biolabs, USA
- sekundarno antitijelo, HRP konjugat, Cell Biolabs, USA

Prilikom izvođenja eksperimenta korišteni su sljedeći uređaji:

- analitička vaga (Kern scales ALS-A/ALJ-A Series, Balingen, Germany)
- centrifuga (Sorvall RC 5B plus, Thermo Fisher Scientific, USA)
- kolorimetar (CR410 Chroma Meter, Konica Minolta, Tokio, Japan)
- orbitalna tresilica (PSU-10i, Grant-bio, Keison products, UK)
- plate reader (Tekan plate reader, Spark 20 M, Bergman diagnostika, Norway)
- spektrofotometar (Ultrospec 2000, Pharmacia biotech, USA)
- štapni mikser (Bosch, Njemačka)

Prilikom izvođenja eksperimenta korišteno je sljedeće laboratorijsko posuđe i pribor:

- automatske pipete od 20 μ L, 200 μ L, 1 mL, 5 mL te 10 mL
- bočice za centrifugu
- čaše od 250 mL
- epruvete
- kivete
- lijevak
- menzura od 300 mL
- mikrotitratske ploče od 96 jažica (12 traka s 8 jažica)
- mikser
- nastavci za pipetu
- odmjerne tivice od 100 mL, 500 mL, 1 L i 2 L
- staklena vuna
- stalak za epruvete
- Ultra Turrax (T 25 basic, IKA – WERKE)
- vortex mješalica (VWR international)
- žličice

3.2. METODE

3.2.1. ODREĐIVANJE BOJE

Određivanje boje provedeno je u 3 paralelna mjerenja za svaki analizirani uzorak na njegovoj površini, odmah nakon vađenja iz vakuumske vreće kako bi se spriječila degradacija boje uzrokovana utjecajem svjetla i kisika iz zraka. Referentna metoda mjerenja boje mesa (Honikel, 1998) je ona koja koristi L^* , a^* i b^* spektar boja. Parametar L^* je mjera svjetlosti mišićja iskazana vrijednostima od 0 do 100 (0 = crno; 100 = bijelo). Vrijednost parametra a^* je mjera inteziteta crvenog dijela spektra mišićja iskazana vrijednostima od -60 do 60, a iskazuje spektar od crvene do zelene boje pri čemu veća a^* vrijednost parametra karakterizira crvenije mišićje. Vrijednost b^* parametra ukazuje na spektar nijansi između plave i žute boje, a njegova veća vrijednost označava izraženost žutog dijela spektra.

Za određivanje boje fileta bakalara korišten je spektrofotometar Konica Minolta (Slika 4). Vrijednosti za L^* , a^* i b^* izračunate su kao srednja vrijednost 3 mjerenja po uzorku uz

napomenu da su se kod mjerenja izbjegavala područja s većom količinom masnoće zbog što točnijih i ujednačenijih mjerenja.

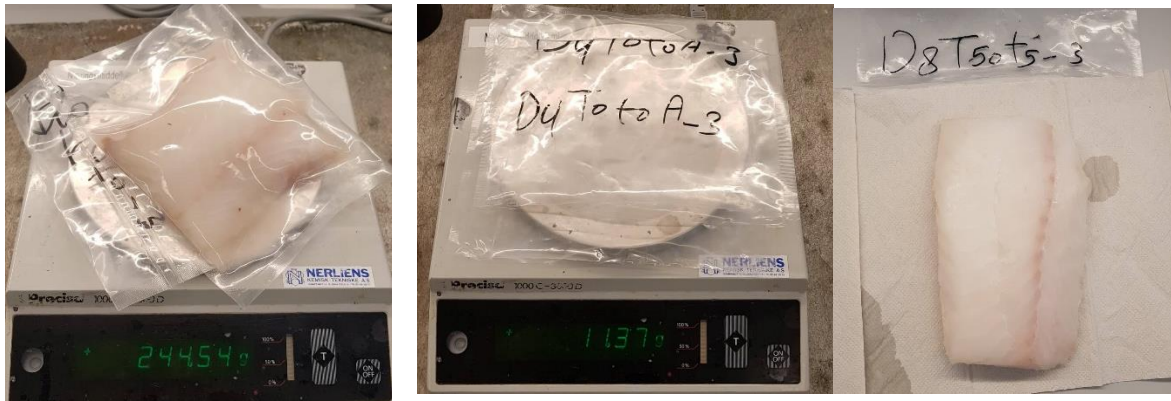


Slika 4. Komica Minolta (vlastita fotografija)

3.2.2. KALO TERMIČKE OBRADJE

Kalo termičke obrade određen je na osnovi razlike u masi uzorka prije i nakon termičke obrade te proveden za svaki analizirani uzorak. Masa prije termičke obrade određena je vaganjem vakuumiranog uzorka i vrećice (m_1). Nakon termičke obrade, vrećica je otvorena te je iz nje otpuštena tekućina uklonjena cijedenjem i uz pomoć papira. Tako osušena vrećica potom je izvagana (m_2), a nakon toga izvagani su osušeni uzorak i vrećica zajedno (m_3) te je kalo termičke obrade izračunat prema formuli:

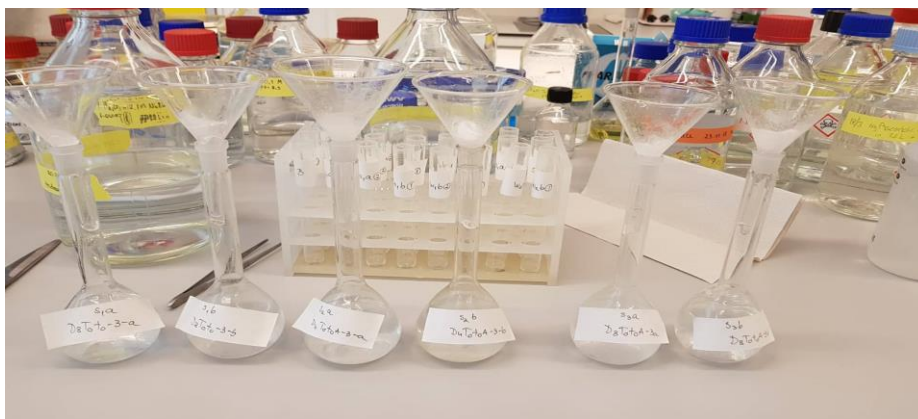
$$KALO\ TERMIČKE\ OBRADJE = \frac{m_1(\text{uzorak} + \text{vrećica}) - m_2(\text{prazna, osušena vrećica})}{m_3(\text{osušeni uzorak} + \text{vrećica})}$$



Slika 5. Određivanje kala termičke obrade: a) vaganje uzorka vakuumiranog u vrećicu, b) vaganje osušene vrećice, c) sušenje uzorka uz pomoć papira (vlastite fotografije)

3.2.3. TOPLJIVOST PROTEINA

Topljivost proteina određena je uz pomoć ekstrakcije proteina topljivih u vodi i u otopini soli (Anderson i Ravesi, 1968). Određivanje topljivosti proteina provedeno je u 2 paralelna mjerenja za svaki analizirani uzorak. Izvagano je otprilike 4 grama uzorka usitnjenog mišićja ribe te transportirano u bocu za centrifugu. Potom je dodano oko 80 mL 0,05 M prethodno pripremljenog fosfatnog pufera (pH=7). Sve skupa, homogenizirano je uz pomoć Ultra Turraxa otprilike 30 sekundi ili sve dok više nije bila vidljiva prisutnost komadića uzorka. Nakon homogenizacije, centrifugirano je na 8000 g, 4°C, 20 minuta. Potom je filtriran supernatant uz pomoć staklene vune u odmjerne tikvice od 100 mL te je tikvica napunjena do oznake s 0,05 M fosfatnim puferom. Tako je dobivena frakcija proteina topljivih u vodi. Kako bi se dobila frakcija proteina topljivih u otopini soli, korišten je isti postupak, no umjesto 0,05 M fosfatnog pufera, korišten je prethodno pripremljeni 0,05 M fosfatni pufer s 0,6 M KCl.



Slika 6. Filtracija te dobivanje frakcije proteina topljivih u soli (vlastita fotografija)

3.2.4. BIORAD METODA ZA ODREĐIVANJE PROTEINA

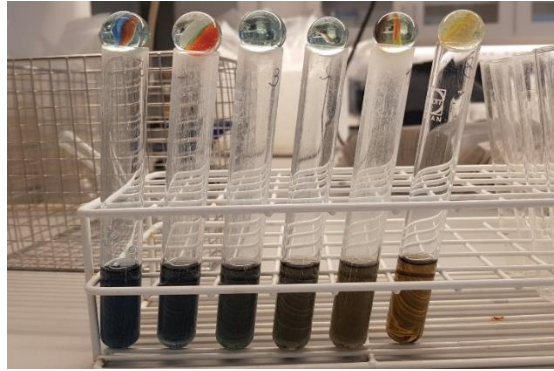
Metoda (Bradford, 1976) temeljena je na obojenju otopljenih proteina s reagensom Coomasie Brilliant Blue G-250 (CBB) pri čemu dolazi do vezanja anionske boje za NH_3 skupine proteina, što je praćeno promjenom boje reagensa (smeđa u plavu) i pojavom apsorpcijskog maksimuma kod 595 nm. Mjerenja su provedena uz korištenje komercijalnog Bio-Rad reagensa (Slika 7). Prije uporabe, reagens je razrijeđen u omjeru 1:5 uz pomoć destilirane vode. Rezultati su očitani uz pomoć baždarnog pravca.



Slika 7. Komercijalni Bio-Rad reagens (vlastita fotografija)

Kako bi se konstruirao baždarni pravac korištena je otopina albumina iz goveđeg seruma (γ (BSA)= $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Ona je nanosena u volumenima od 0, 20, 40, 60, 80 i 100 μL u epruvete i doda joj je po 100, 80, 60, 40, 20, 0 mL destilirane vode te 5 mL Bio-Rad reagens (sastav otopine je naveden na stranici 15). Uzorci proteina nanoseni su u volumenima od 100 μL i svakom uzorku također je dodano po 5 mL Bio-Rad reagens. Uzorci su inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi uz potresanje i zatim im je očitana apsorbancija pri 595 nm na spektrofotometru.

U epruvete je dodano 100 μL frakcije proteina topljivih u vodi ili u otopini soli te 5 mL razrijeđenog Bio-Rad reagens. Kao slijepa proba, umjesto frakcije proteina, korištena je destilirana voda u koju se također dodaje Bio-Rad reagens. Sadržaj u epruvetama dobro je promiješan uz pomoć Whirl miksera te inkubiran 20-30 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 595 nm u plastičnim kivetama. Količina izoliranih proteina izračunata je uz pomoć dobivenog baždarnog dijagrama (Slika 8).



Slika 8. Otopine pripravljene za analizu za dobivanje baždarnog dijagrama (vlastita fotografija)

3.2.5. ODREĐIVANJE OKSIDACIJE PROTEINA

Kako bi ELISA tehnikom bilo moguće iz ekstrakta odrediti stupanj karbonilacije proteina bilo je potrebno prethodno provesti ekstrakciju proteina prema Andersonu i Ravesi (1968), nakon čega je slijedilo određivanje koncentracije proteina metodom prema Bradfordu (Bradford, 1976). Određivanje oksidacije proteina provedeno je u 2 paralelna mjerenja za svaki analizirani uzorak. Proteinski ekstrakti su razrijeđeni u otopini PBS-a do konačne masene koncentracije $\gamma = 0.01 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Po $100 \mu\text{L}$ uzorka nanoseno je na mikrotitarsku pločicu u triplicatima i uzorci su inkubirani na 4°C preko noći. Sljedeći dan je otopina iz jažica mikrotitarske pločice uklonjena i pločica isprana tri puta s $200 \mu\text{L}$ otopine PBS. Višak otopine uklonjen je pipetom. U jažice s uzorcima dodano je $200 \mu\text{L}$ svježe pripravljene otopine DNPH (otapanjem $0,02 \text{ g}$ 2,4- dinitrofenilhidrazina u 1 mL 3-fluoroctene kiseline) i pločica je inkubirana 45 minuta u mraku. Otopina DNPH je zatim uklonjena, a mikrotitarska pločica ispirana četiri puta s $200 \mu\text{L}$ pufera za ispiranje II (otopina PBS s dodatkom $w(\text{etanol}) = 96 \%$ u omjeru 1:1). Nakon toga pločica je isprana još tri puta s $200 \mu\text{L}$ otopine PBS. Višak otopine uklonjen je pipetom. Nespecifična proteinska mjesta su blokirana dodatkom $250 \mu\text{L}$ pufera za blokiranje. Izvagano je 5 g blokirajućeg reagensa i razrijeđeno u 100 mL $0,01 \text{ M}$ fosfatnog pufera, kako bi se dobio pufer za blokiranje. Pločica s uzorcima je inkubira 90 minuta na sobnoj temperaturi uz potreskivanje. Pufer za blokiranje je uklonjen i jažice isprane tri puta s $300 \mu\text{L}$ pufera za ispiranje. Zatim je u svaku jažicu dodano $100 \mu\text{L}$ primarnog antitijela (anti-DNPH rabbit) i inkubira se 120 minuta na sobnoj temperaturi uz potreskivanje. Otopina primarnog antitijela je uklonjena i pločica isprana pet puta sa $200 \mu\text{L}$ pufera za ispiranje. Višak otopine

uklonjen je pipetom. U svaku jažicu dodano je 100 μL otopine sekundarnog antitijela (anti-rabbit HRP Goat IgG) i uzorci su inkubirani 60 minuta na sobnoj temperaturi uz potreskivanje. Otopina sekundarnog antitijela je uklonjena i pločica isprana pet puta s 200 μL pufera za ispiranje, a višak pufera uklonjen pipetom. 100 μL otopine tetrametilbenzidina (TMB) dodano je u jažice i pločica inkubirana nekoliko minuta do razvijanja plave boje. Plava boja se razvija uslijed oksidacije TMB-a, odnosno vezanjem HRP-a na TMB. Reakcija je zaustavljena dodatkom 100 μL otopine sumporne kiseline ($c = 0,3 \text{ mol dm}^{-3}$) što uzrokuje promjenu boje iz plave u žutu te je očitana apsorbancija pri 450 nm na spektrofotometru (Tecan Sunrise). Podaci su prikupljeni pomoću softwera XFLUOR4 version 4.51.

3.2.6. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

Na 54 vakuumiranih uzoraka fileta bakalara, od kojih svaki ima svoj par, jednako termički obrađen i skladišten u hladnom, istraživao se utjecaj *sous-vide* termičke obrade. Riba je odležavana na način da su duboko zamrznuti uzorci premješteni na +4°C, kako bi do idućeg dana bili pripremljeni za istraživanje.

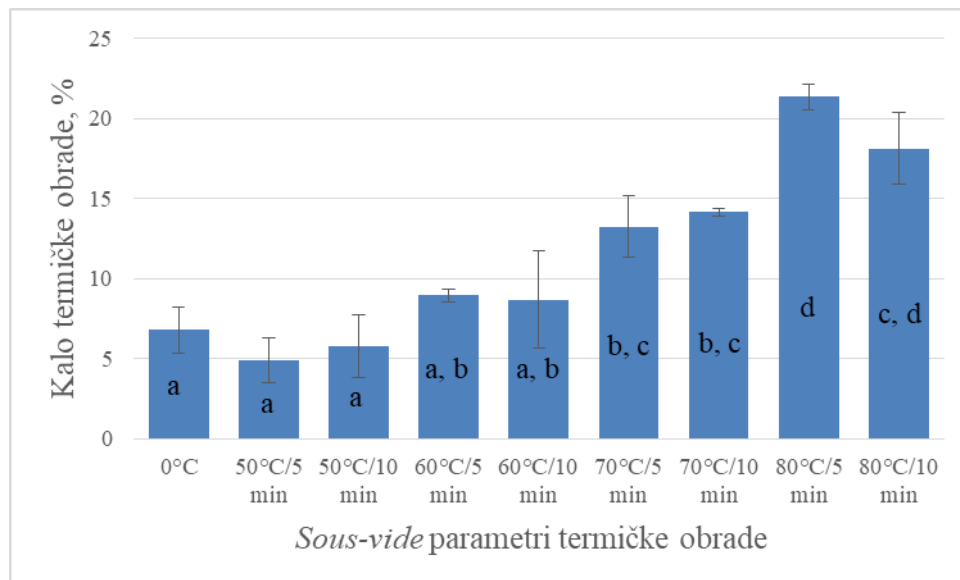
Na svakom uzorku prvo je određen kalo, na osnovi razlike u masi prije i nakon termičke obrade. Potom je određena boja na način da je na svakom uzorku mjerena vrijednost L*, a* i b* parametra. Uzorci su nakon određivanja kala i boje usitnjeni uz pomoć štapnog miksera te skladišteni u male vrećice, kako bi se preciznije mogle dobiti odvage za korištenje slijedećih metoda.

Za određivanje topljivosti proteina, prvo je bilo potrebno ekstrahirati proteine topljive u vodi i otopini soli (Anderson i Ravesi, 1968). Nakon dobivenih frakcija, Bradfordovom metodom određivan je udio proteina u svakoj paraleli. Frakcije proteina su sačuvane te korištene prilikom određivanja karbonila u sarkoplazmatskim i miofibrilanim frakcijama uz pomoć ELISA testa, čime je izražena oksidacija proteina.

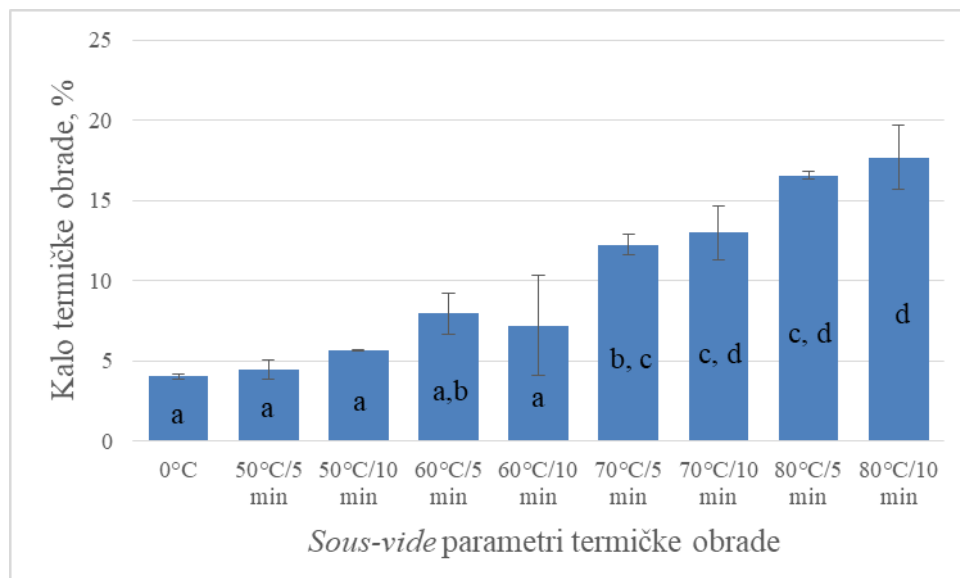
Svi rezultati statistički su obrađeni i grafički prikazani, prilikom čega su raspoređeni ovisno o danima hladnog skladištenja. U grafičkom prikazu rezultata naznačena je srednja vrijednost ispitivanog parametra u uzorku, standardna devijacija te statistički značajna razlika između uzoraka.

4.1.GUBITAK MASE TIJEKOM KUHANJA

Rezultati kala termičke obrade prikazani su na slikama 9, 10 i 11 kao srednja vrijednost mjerenja \pm standardna devijacija 2 uzorka bakalara, jednako termički obrađena i skladištena, ovisno o broju dana skladištenja u hladnom.



Slika 9. Grafički prikaz ovisnosti kala o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 1 dan na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



Slika 10. Grafički prikaz ovisnosti kala o parametrima *sous-vide* metode termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 4 dana na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



Slika 11. Grafički prikaz ovisnosti kala o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 8 dana na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)

Gubitak na masi kod ispitivanih uzoraka varira od 4,01 % (kod uzorka koji nije termički obrađen, skladišten u hladnom 4 dana) do 21,56 % (kod uzorka koji je termički obrađen na 80°C, 5 minuta te skladišten u hladnom 1 dan). Povećanjem temperature termičke obrade povećava se i gubitak na masi.

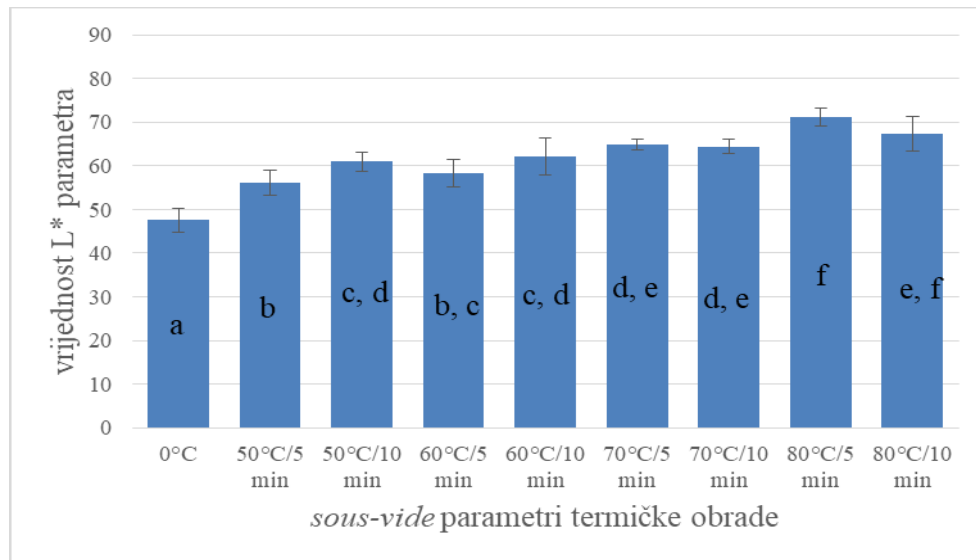
Iz prikazanih rezultata vidimo da nema statistički značajnih razlika ($P > 0,05$) u kalu termičke obrade između kontrolnih uzoraka te uzoraka termički obrađenim na temperaturama od 50°C i 60°C. No, već na uzorcima kuhanim na 70°C vidi se značajniji gubitak na masi, pogotovo na onima dulje termički tretiranim (npr. gubitak od 14,06 % u uzorku tretiranom 10 min na 70°C, u odnosu na gubitak od 8,36 % kod uzorka kuhanog na 70°C, ali 5 minuta). To se može objasniti na način da pri temperaturama od 40°C do 60°C dolazi do skupljanja poprečnih vlakana na osi, što proširuje već prisutnu prazninu između vlakana i endomizija, koji ih okružuju. No, na temperaturama od 60°C do 70°C mreža vezivnog tkiva i mišićna vlakna se skupljaju uzdužno, proporcionalno s porastom temperature, što uzrokuje veliki gubitak vode tijekom termičke obrade. Voda je izbačena pritiskom koji djeluje na skupljanje vezivnog tkiva u izvanstaničnoj praznini (Offer, 1984). Offer i sur. (1989) potvrdili su da se taj gubitak tekućine javlja pretežno iz uzdužnih kanala mreže snopova vlakana. Većina vode u živom mišićju vezana je u miofibrilima (80 %), u prostorima između debelih i tankih filamenata (Offer i sur., 1989). Bilo kakve velike promjene u distribuciji vode unutar strukture mišićja, nužno proizlaze iz promjena

u tom razmaku. Lateralno skupljanje rešetke filamenta uzrokovano je padom pH bliže izoelektričnoj točki, rigornoj kontrakciji i denaturaciji miozina (Offer i Knight, 1988).

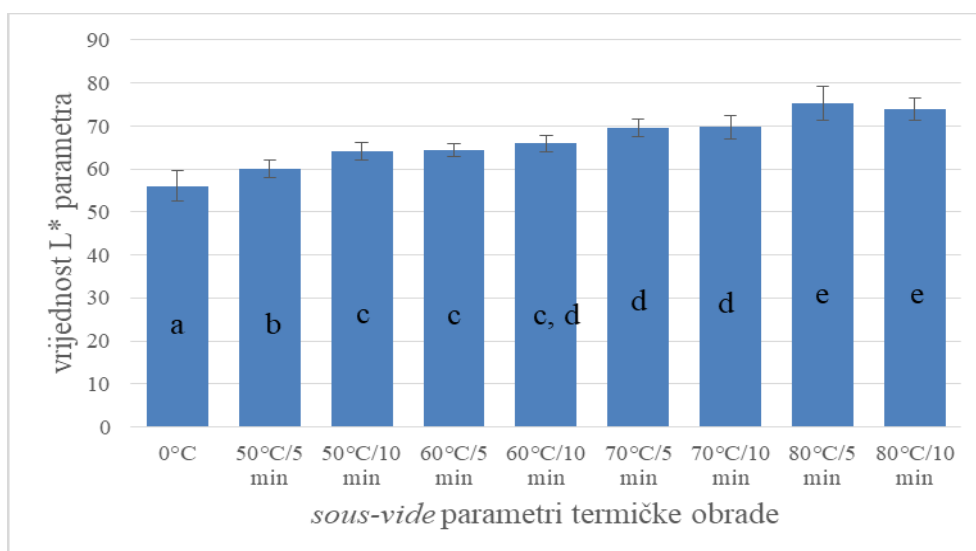
Iz do sad rečenog, jasno se vidi da povišena temperatura termičke obrade dovodi do povećanja kila u uzorcima bakalara, što negativno utječe na kvalitetu proizvoda. Međutim, trajanje skladištenja u hladnom ima pozitivan doprinos zadržavanju vode u ribi. Najveći gubitak na masi u svim ispitivanim uzorcima prisutan je kod uzoraka skladištenih 1 dan u hladnom te što se povećavaju dani hladnog skladištenja, gubitak na masi tijekom termičke obrade je manji. To se poklapa s rezultatima koje su dobili Cropotova i sur., 2019. ispitujući utjecaj skladištenja i *sous-vide* termičke obrade na uzorcima fileta skuše. Smanjuje gubitka mase tijekom kuhanja u uzorcima skuše, događa se vjerojatno zbog strukturnih promjena koje se javljaju u mišićima i vezivnom tkivu ribe nakon kuhanja (Ofstad i sur., 1993), uključujući reapsorpciju vode oslobođene rastvorenim miofibrilarnim proteinima i njezinom raspodjelom između intra- i izvanstaničnih prostora (Belitz i sur., 2009). Prema izvedenom modelu gubitak vlage u filetima skuše termički obradenim *sous-vide* metodom rezultat je toplinske denaturacije i skupljanja mišićnih proteina, koji djelomično reapsorbiraju ispuštenu vodu tijekom hladnog skladištenja (Cropotova i sur., 2019).

4.2. PROMJENA BOJE

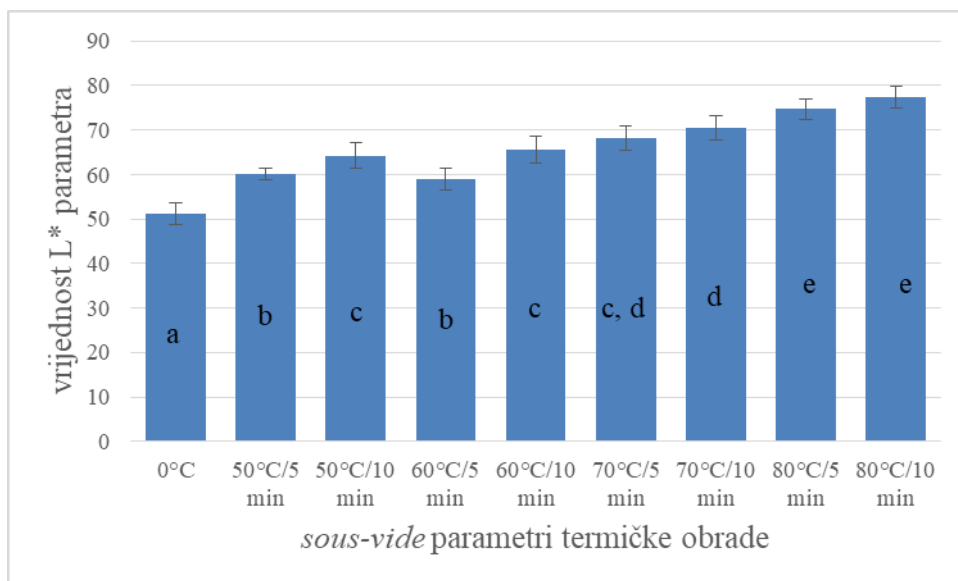
Rezultati promjene boje prikazni su na slikama 12-20 kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija rezultata dobivenih mjerenjem L^* , a^* i b^* parametara na 2 uzoraka bakalara jednako termički obrađena i skladištena, ovisno o broju dana skladištenih u hladnom. Za svaki uzorak provedena su po 3 mjerenja na različitim dijelovima ribe.



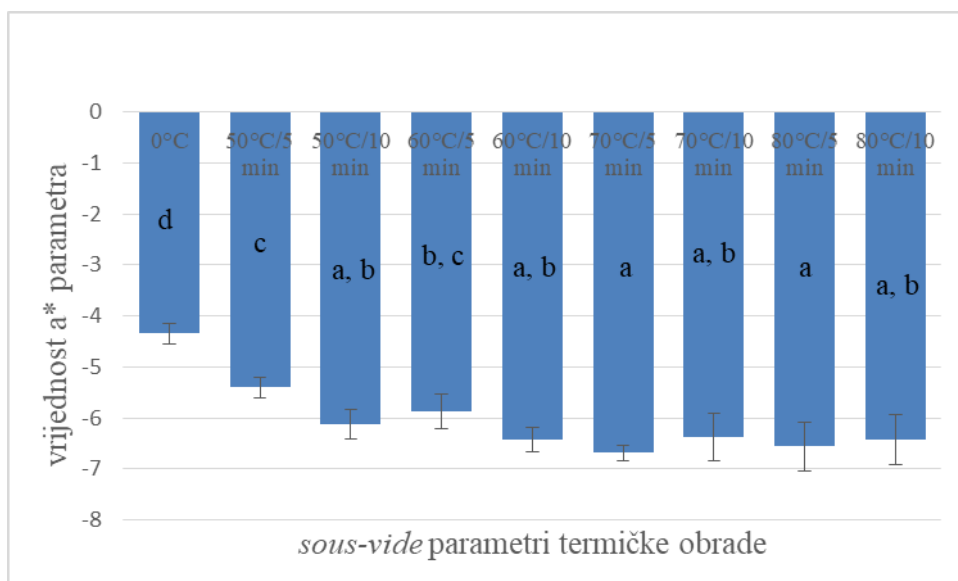
Slika 12. Ovisnost L^* vrijednosti o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 1 dan na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



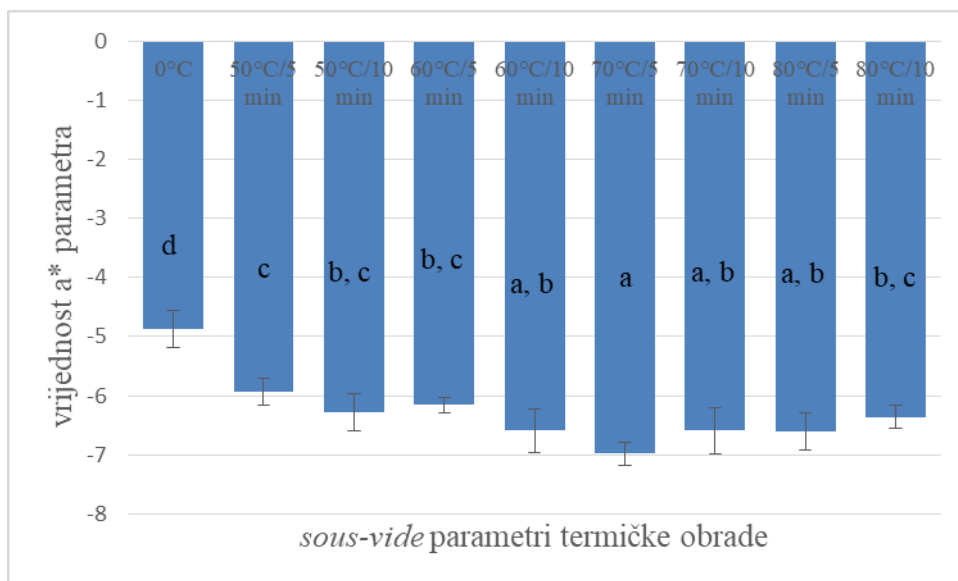
Slika 13. Ovisnost L^* vrijednosti o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 4 dana na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



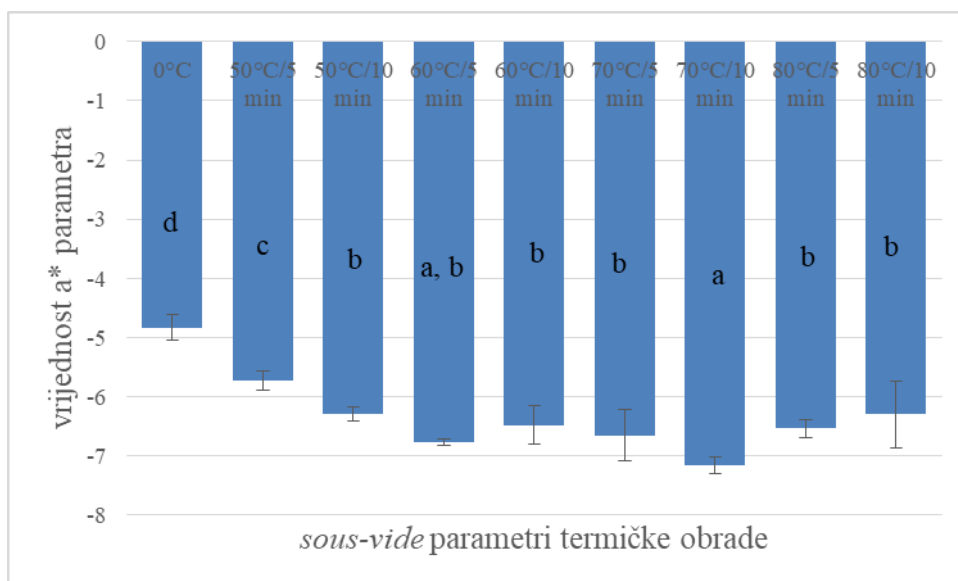
Slika 14. Ovisnost L* vrijednosti o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 8 dana na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



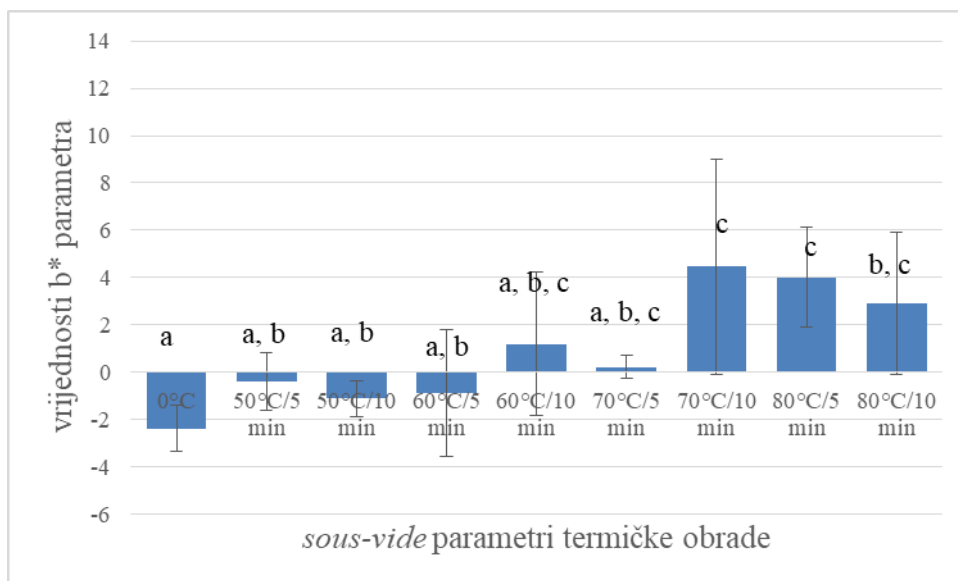
Slika 15. Ovisnost a* vrijednosti o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 1 dan na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



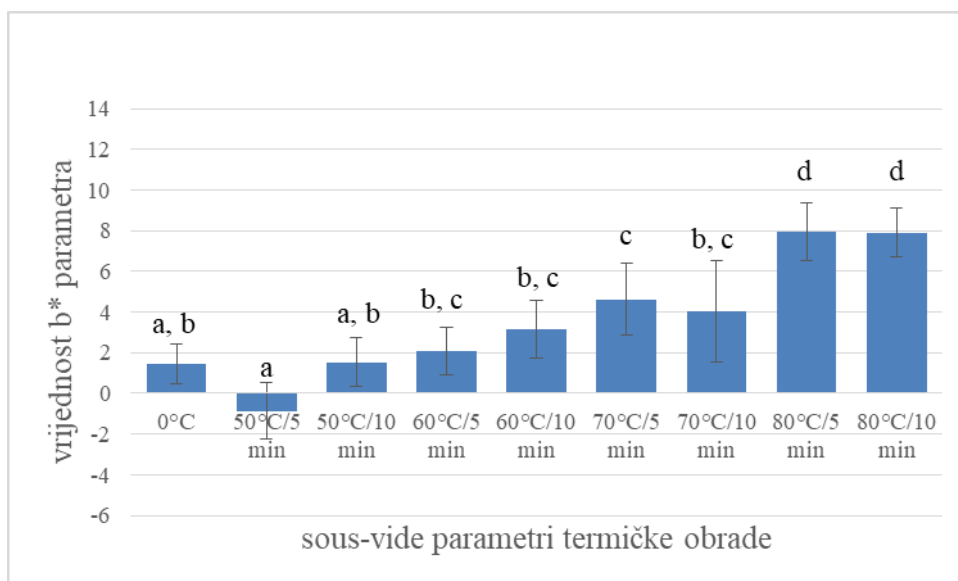
Slika 16. Ovisnost a* vrijednosti o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 4 dana na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



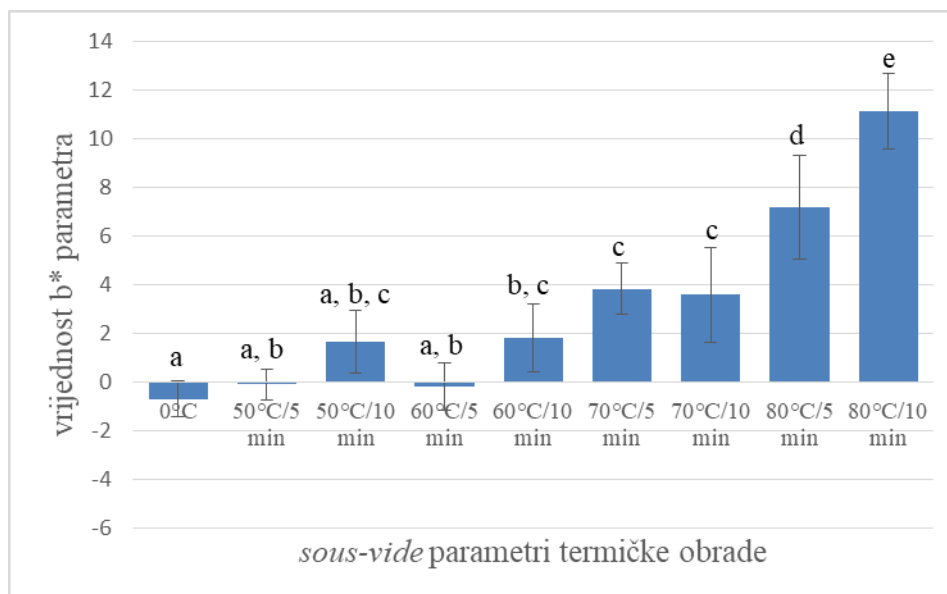
Slika 17. Ovisnost a* vrijednosti o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 8 dana na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



Slika 18. Ovisnost b* vrijednosti o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 1 dan na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



Slika 19. Ovisnost b* vrijednosti o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 4 dana na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)

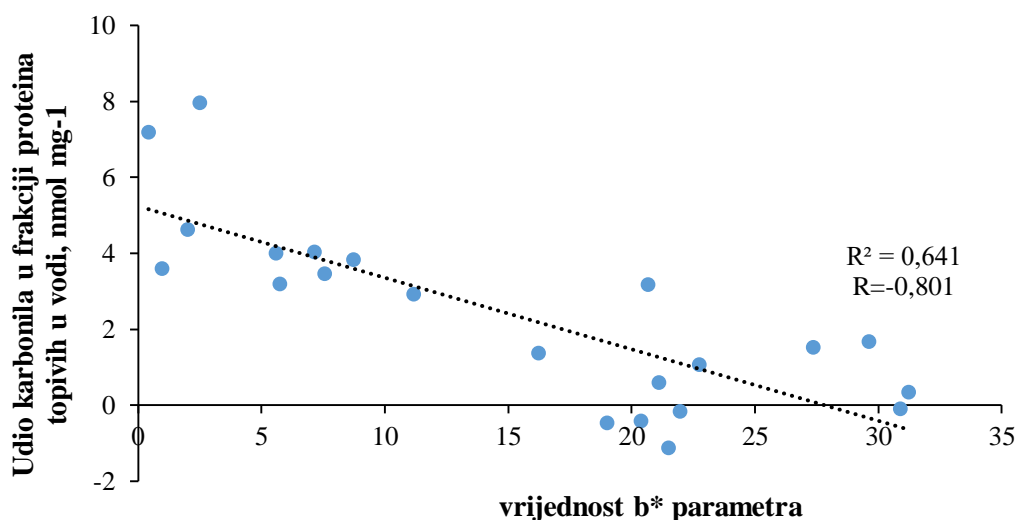


Slika 20. Ovisnost b* vrijednosti o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 8 dana na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)

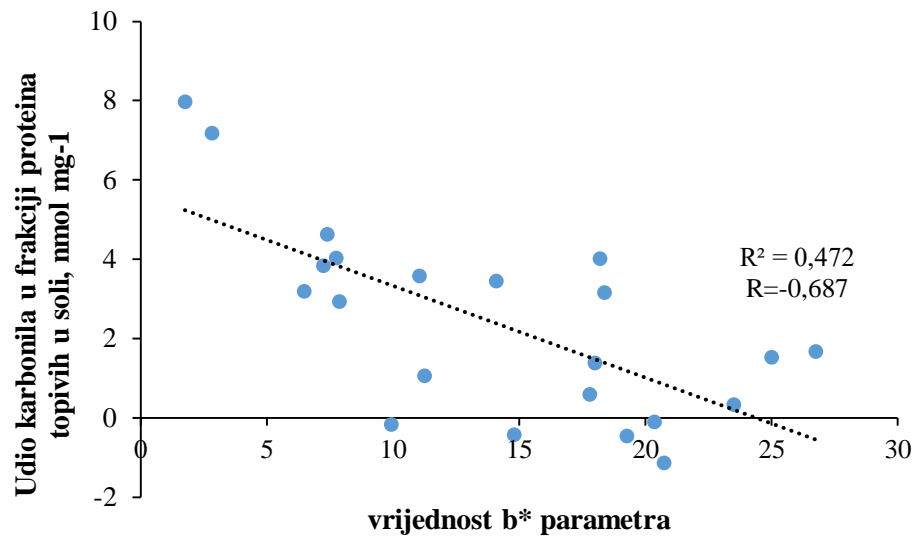
Parametar L*, predstavlja mjeru svjetline iskazanu u vrijednostima od 0 do 100 (0 = crno; 100 = bijelo), pri čemu najvišu vrijednost od 70,57 ima ispitivani uzorak skladišten 8 dana u ledu te tretiran na 80°C, 10 minuta, a najnižu 47,57 kontrolni uzorak, skladišten 1 dan u hladnom. Vrijednosti uzoraka obrađenih na različitim temperaturama statistički se značajno razlikuju ($P < 0,05$) te povećavaju sukladno s povećanjem temperature termičke obrade. Moguće objašnjenje za veću svjetlinu fileta bakalara tretiranog višom temperaturom povezano je s većom denaturacijom i agregacijom sarkoplazmatskih i miofibrilarnih proteina, koji povećavaju rasipanje svjetlosti (Christensen i sur., 2011). Temperatura zagrijavanja, povećava L* vrijednost fileta bakalara zbog degradacije termo-labilnih proteinskih spojeva, kao i gubitak vode koja utječe na lom svjetlosti u filetu bakalara (Oz i Seyar, 2016). Mišićne stanice nabubrene zadržanom vodom i čvrsto međusobno povezane absorbiraju više svjetla (što boju mišićja čini tamnijom), što se može povezati s činjenicom da su pri nižim temperaturama tretiranja (50°C i 60°C) proteini manje denaturirani i vežu više vode, stoga je boja mišićja tamnija, nego na višim temperaturama tretiranja (70°C i 80°C). Također, iz grafova na slikama 12., 13. i 14. može se vidjeti da L* vrijednost ovisi i o duljini termičke obrade te tako uzorci koji su tretirani duže – 10 minuta imaju veću L* vrijednost od kraće tretiranih uzoraka.

Osim parametra L*, vrijednosti parametra a* također su povezani s denaturacijom proteina. Prisutna je statistički značajna razlika ($P < 0,05$) između vrijednosti parametra a* kontrolnih uzoraka i termički obrađenih uzoraka, što je povezano s denaturacijom i agregacijom proteina, te se tako ograničava dubina prodora kisika u mišićno tkivo i oksigenacija mioglobina u svijetlo crveni oksimioglobin (Christensen i sur., 2011).

Vrijednost parametra b* ukazuje na spektar nijansi između plave i žute boje, a njegova veća vrijednost označava izraženost žutog dijela spektra. Došlo je do povećanja b* vrijednosti kao posljedice skladištenja te duljeg trajanja i više temperature termičke obrade. Povećanje b* vrijednosti *sous-vide* kuhanih uzoraka, u svojim rezultatima dobili su i Cropotova i sur., (2018), kao posljedicu duljeg trajanja termičke obrade i skladištenja. Povećanje inteziteta žutog dijela spektra *sous-vide* kuhanih uzoraka tijekom vremena skladištenja najvjerojatnije je posljedica nakupljanja spojeva žućkaste boje nastalih raspadom primarnih i sekundarnih proizvoda oksidacije, što daje pozitivne koleracijske vrijednosti (Nguyen i sur., 2013). Povećanjem udjela ukupnih karbonila, dolazi i do povećanja vrijednosti b* parametra, odnosno do povećanog inteziteta žutog dijela spektra. Iz grafova na slikama 21 i 22 vidljiva je umjereno jaka povezanost ($|r| = 0,687$; slika 22) i jaka povezanost ($|r| = 0,801$; slika 21) (Udovičić i sur., 2007) ukupnih karbonila i b* parametra, iz kojih se može zaključiti da sukladno porastu udjela ukupnih karbonila, raste i b* vrijednost.



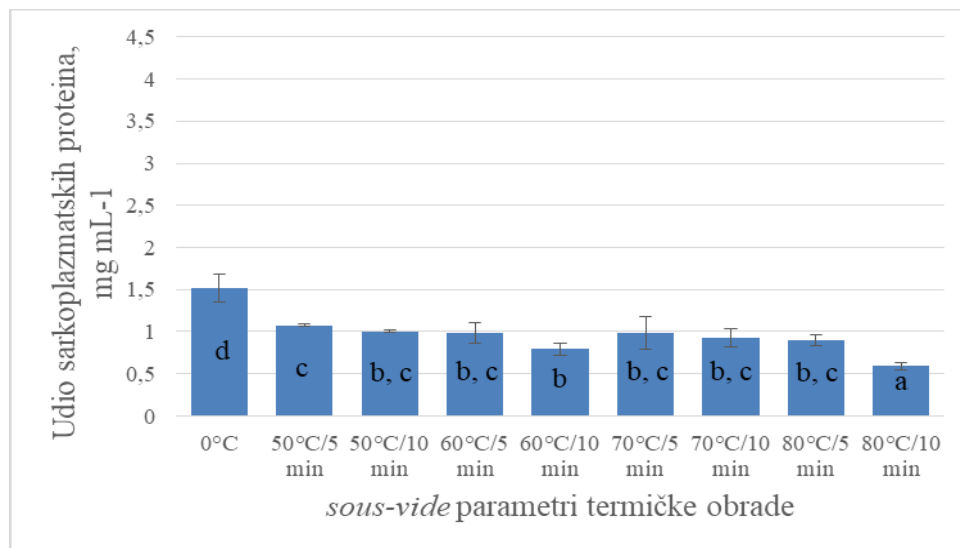
Slika 21. Odnos ukupnih karbonila (nmol mg^{-1}) u frakciji sarkoplazmatskih proteina i b* parametra – inteziteta žutog dijela spektra



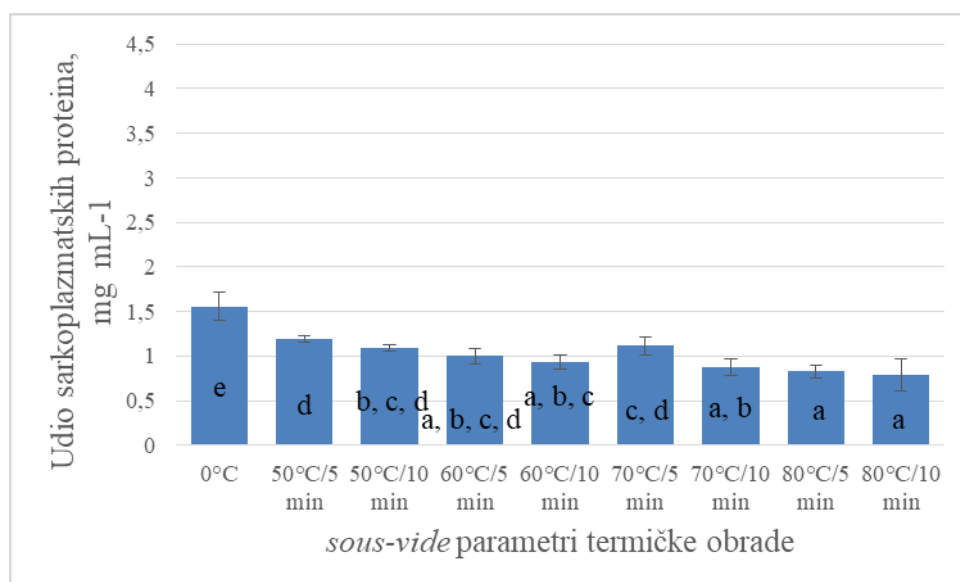
Slika 22. Odnos između ukupnih karbonila (nmol mg^{-1}) u frakciji miofibrilarnih proteina i b* parametra – inteziteta žutog dijela spektra

4.3. TOPLJIVOST PROTEINA

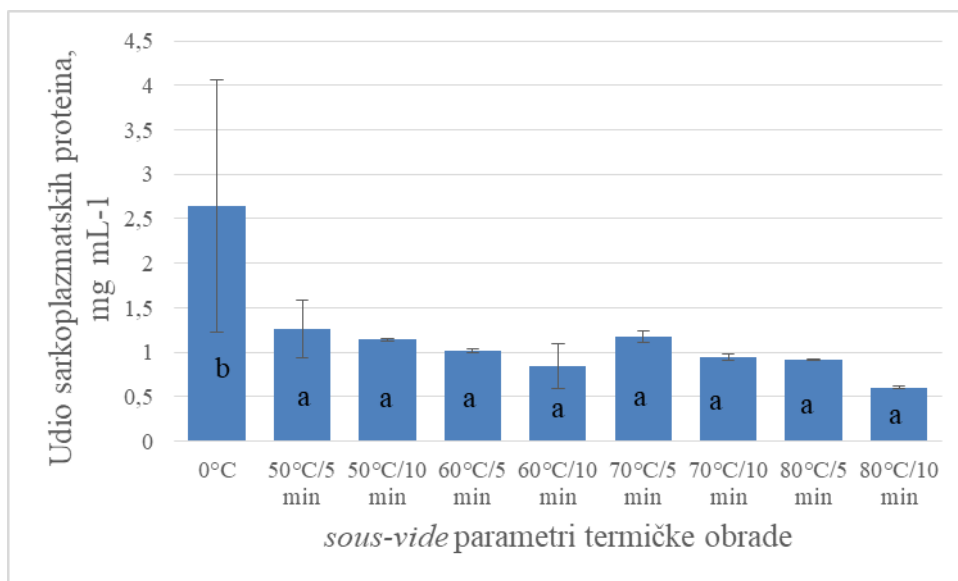
Rezultati udjela sarkoplazmatskih i miofibrilarnih proteina prikazani su na slikama 23-28 kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija rezultata mjerenih na 2 jednako termički obrađena i skladištena uzorka bakalara ovisno o broju dana hladnog skladištenja. Za svaki uzorak provedena su po 2 paralelna mjerenja.



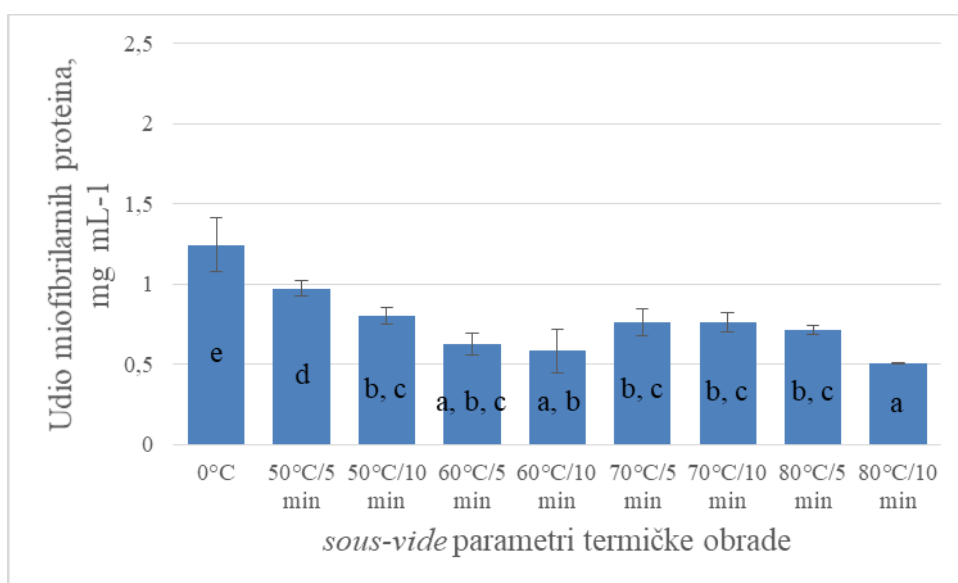
Slika 23. Ovisnost udjela sarkoplazmatskih proteina (mg mL^{-1}) o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 1 dan na $+4^\circ\text{C}$ (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



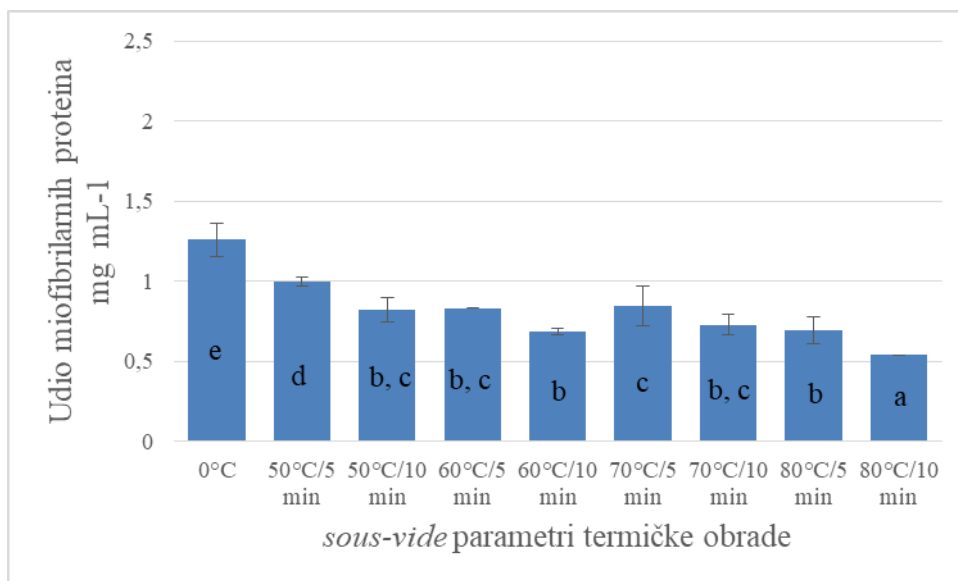
Slika 24. Ovisnost udjela sarkoplazmatskih proteina (mg mL^{-1}) o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 4 dana na $+4^\circ\text{C}$ (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



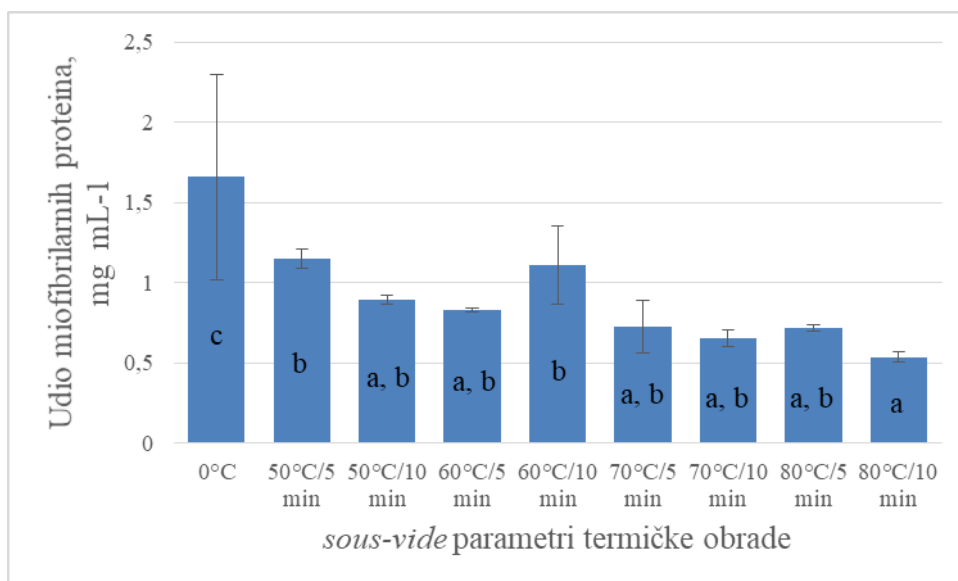
Slika 25. Ovisnost udjela sarkoplazmatskih proteina (mg mL^{-1}) o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 8 dana na $+4^\circ\text{C}$ (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



Slika 26. Ovisnost udjela miofibrilarnih proteina (mg mL^{-1}) o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 1 dan na $+4^\circ\text{C}$ (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



Slika 27. Ovisnost udjela miofibrilarnih proteina (mg mL^{-1}) o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 4 dana na $+4^\circ\text{C}$ (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



Slika 28. Ovisnost udjela miofibrilarnih proteina (mg mL^{-1}) o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 8 dana na $+4^\circ\text{C}$ (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)

Prema rezultatima prikazanim na slikama 23-28, ukupna količina ekstrahiranih proteina uglavnom je povećana za *sous-vide* kuhanog bakalara skladištenog u hladnom, što je sukladno

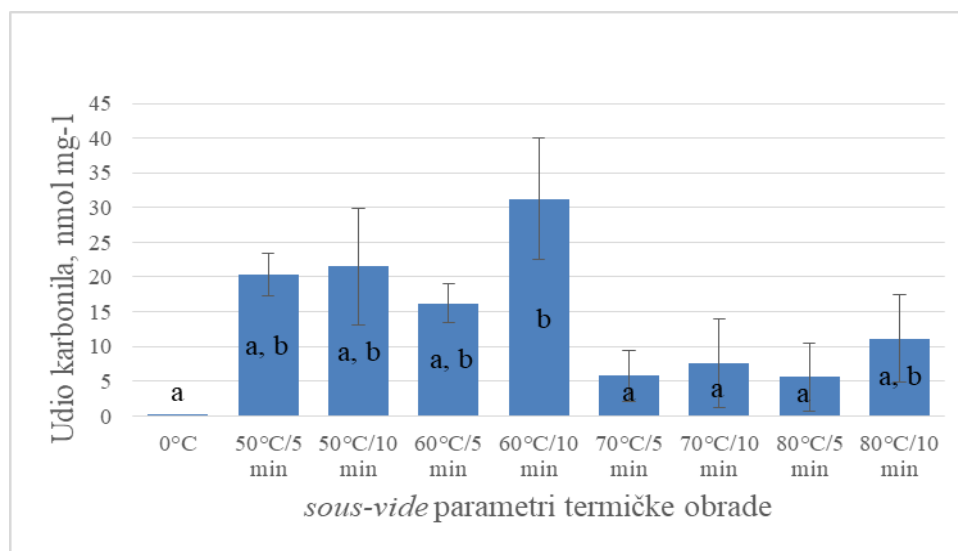
rezultatima dobivenim u istraživanju (Kaale i sur., 2016) kod kojeg je pronađen znatan utjecaj hladnog skladištenja na proteine topljive u vodi ili u otopini soli. U kontrolnim uzorcima najbolje se vidi utjecaj hladnog skladištenja, budući da oni nisu termički obrađeni. Razlika u vrijednostima između uzoraka skladištenih u hladnom 1, 4 i 8 dana vidljiva je u frakcijama i sarkoplazmatskih i miofibrilarnih proteina, gdje je u oba slučaja vidljiva pozitivna koleracija povećanja udjela proteina s duljim skladištenjem.

Odstupanja, vidljiva u ispitivanim uzorcima frakcije miofibrilarnih proteina, skladištenog 8 dana u hladnom te termički obrađenom na 60°C, 10 minuta te uzorka skladištenog 4 dana u hladnom te termički obrađenom na 70°C, 5 minuta, moguća su zbog različitih omjera proteina u mišiću te u različitom trajanju i brzini miješanja (Kaale i sur., 2016).

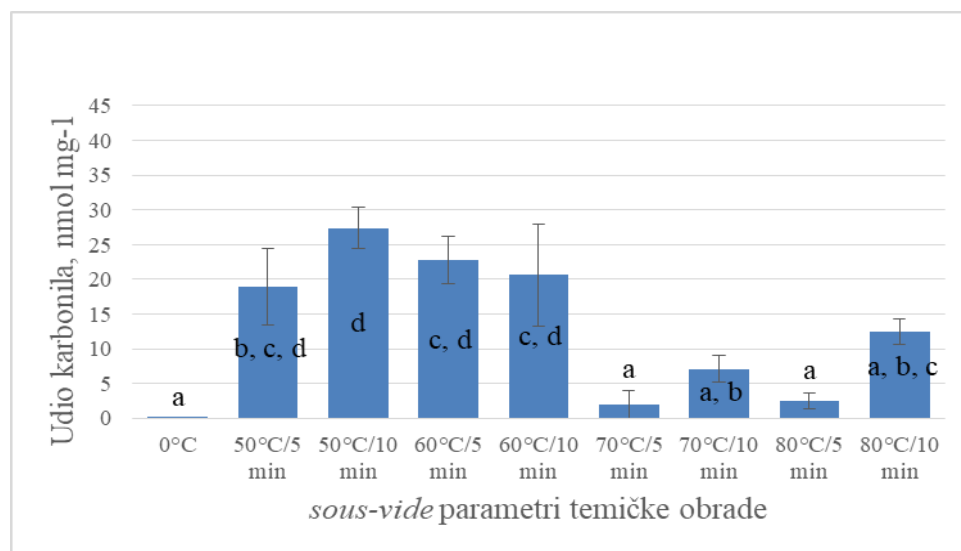
Smanjenje udjela u vodi topljivih - sarkoplazmatskih i u otopini soli topljivih – miofibrilarnih proteina, ukazuje na denaturaciju proteina djelovanjem topline. Denaturacija je povećana s duljim trajanjem toplinske obrade i povećanjem temperature. Također, može se uočiti da kuhanje *sous-vide* ima glavni negativni učinak na topljivost sarkoplazmatskih i miofibrilarnih proteina u filetu bakalara. Međutim, uzimajući u obzir da je miofibrilarna mreža uglavnom odgovorna za zadržavanje vode u ribljem mesu (Hultmann i Rustad, 2002), pretpostavljamo da je smanjenje topljivosti bjelančevina topljivih u soli doprinijelo reapsorpciji slobodne vode nabubrenim i solubiliziranim miofibrilarnim proteinima koji formiraju gel nakon kuhanja. Stoga je gubitak kuhanja smanjen uslijed strukturnih promjena kod proteina topljivim u otopini soli, kao što su bubrenje fibrila, geliranje i reapsorpcija tekućine pomoću denaturiranih proteina (Cropotova i sur., 2018; Schnepf, 1989). Ova pretpostavka je potvrđena pozitivnom značajnom povezanošću između gubitka mase tijekom kuhanja te udjela miofibrilarnih proteina u *sous-vide* termički obrađenim uzorcima skuše tijekom hladnog skladištenja (Cropotova, 2018). Dakle, *sous-vide* termička obrada značajno je smanjila topljivost miofibrilarnih proteina u ispitivanim uzorcima bakalara, u usporedbi sa sarkoplazmatskim, povećavajući tako gubitak na masi zbog narušavanja strukture miofibrilarnoj mreži mišića ribe.

4.4.OKSIDACIJA PROTEINA

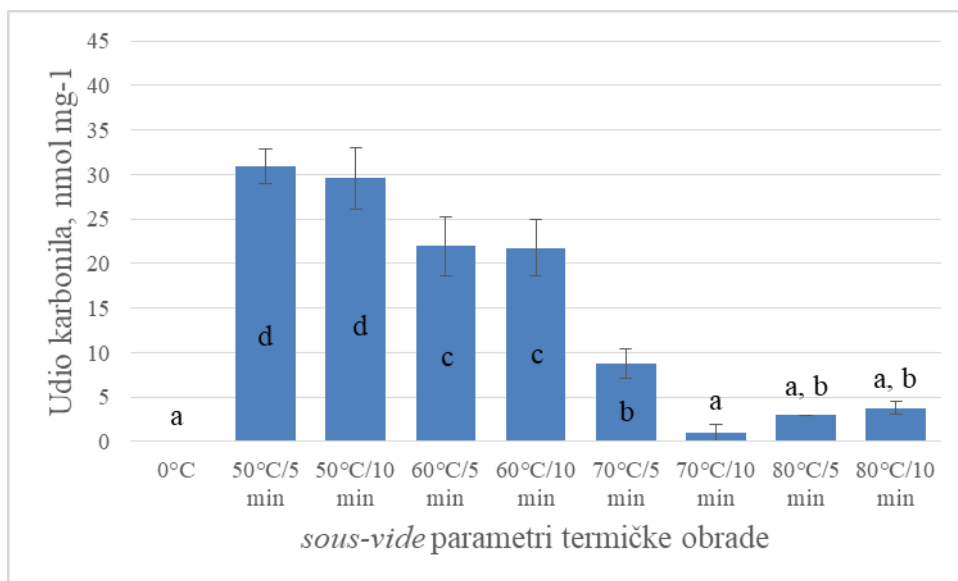
Rezultati oksidacije sarkoplazmatskih i miofibrilarnih proteina prikazani su na slikama 29-34 kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija udjela karbonila, mjenjenih na 2 jednako termički obrađena i skladištena uzorka bakalara ovisno o broju dana hladnog skladištenja. Za svaki uzorak provedena su po 2 paralelna mjerenja.



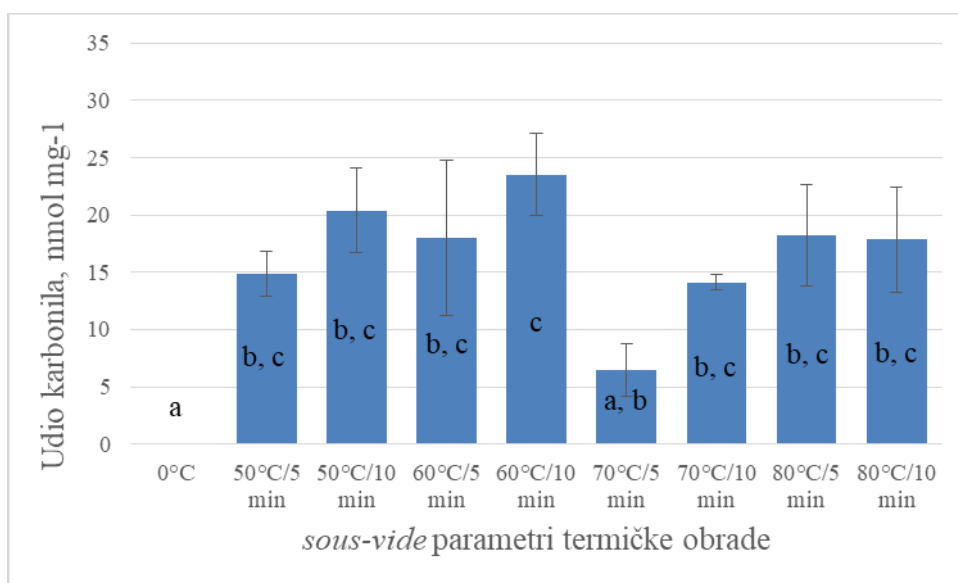
Slika 29. Ovisnost udjela oksidacije sarkoplazmatskih proteina (nmol mg^{-1}) o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 1 dan na $+4^\circ\text{C}$ (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



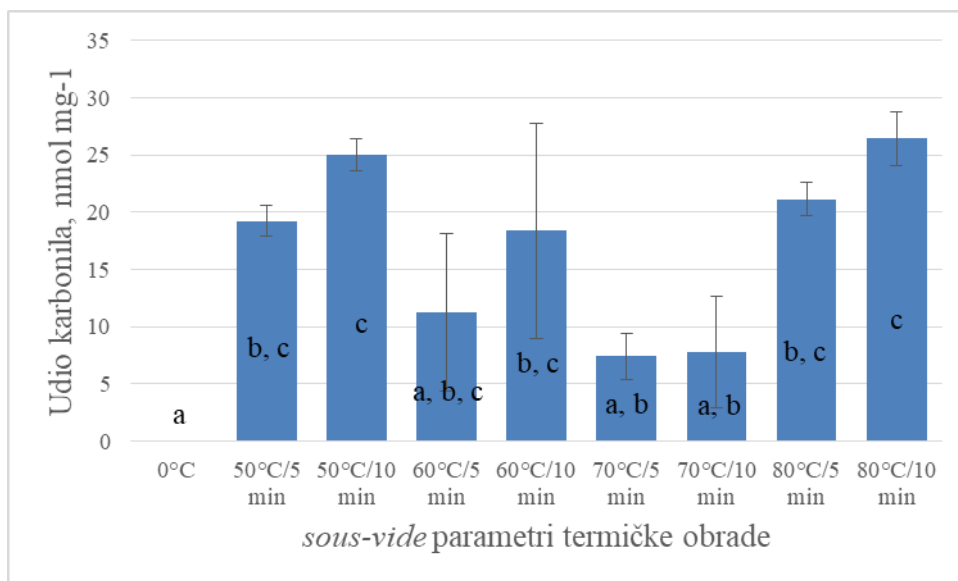
Slika 30. Ovisnost udjela oksidacije sarkoplazmatskih proteina (nmol mg^{-1}) o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 4 dana na $+4^\circ\text{C}$ (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



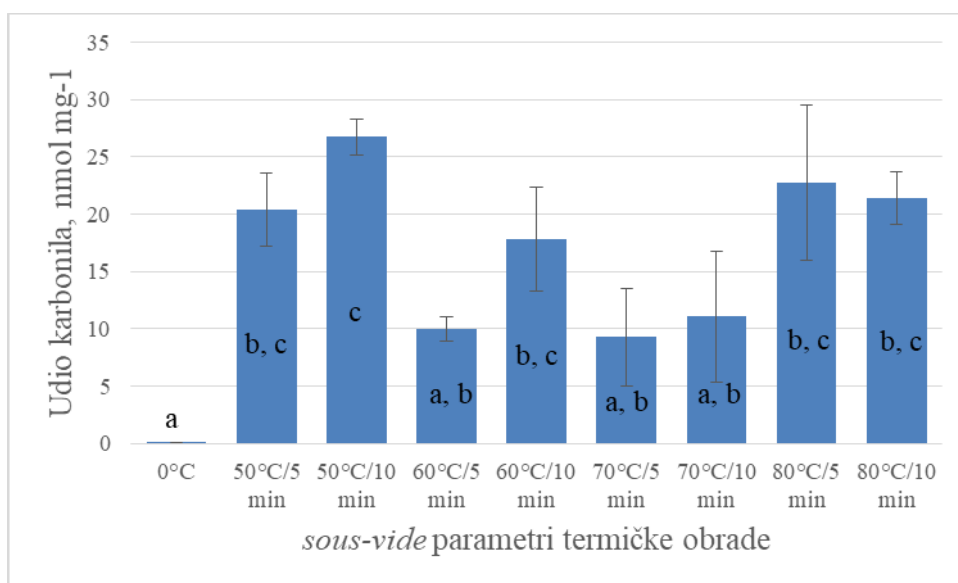
Slika 31. Ovisnost udjela oksidacije sarkoplazmatskih proteina (nmol mg⁻¹) o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 8 dana na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



Slika 32. Ovisnost udjela oksidacije miofibrilarnih proteina (nmol mg⁻¹) o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 1 dan na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



Slika 33. Ovisnost udjela oksidacije miofibrilarnih proteina (nmol mg⁻¹) o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 4 dana na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)



Slika 34. Ovisnost udjela oksidacije miofibrilarnih proteina (nmol mg⁻¹) o parametrima *sous-vide* termičke obrade ispitivanih uzoraka skladištenih 8 dana na +4°C (različita slova u stupcima prikazuju različite statistički značajne vrijednosti)

Tijekom *sous-vide* termičke obrade fileta bakalara i skladištenja u hladnom, oksidacija proteina izražena je kao udio ukupnih karbonila. U kontrolnim uzorcima oksidacija proteina gotovo je neznatna, dok se prilikom termičke obrade vrijednost znatno povećala. Iz grafičkih prikaza rezultata vidljiva je značajna statistička razlika ($P < 0,05$) između kontrolnih uzoraka

te uzoraka termički obrađenih na 70°C i 80°C, u odnosu na uzorke obrađene pri temperaturama od 50°C i 60°C. Pri temperaturama od 50°C i 60°C veći udio karbonila prisutan je u frakcijama sarkoplazmatskih proteina. To je vjerojatno posljedica toga što su uzorci nakon kuhanja bili skladišteni u zamrznutom stanju te je došlo do jače agregacije sarkoplazmatskih proteina. No, pri temperaturama od 70°C i 80°C, veći udio karbonila pronađen je u frakciji proteina topljivim u solima. Značajan porast karbonila proteina tijekom skladištenja u zamrznutom stanju nakon kuhanja bakalara može se objasniti uništavanjem staničnih struktura kristalima leda tijekom zamrzavanja te oslobađanjem različitih pro-oksidansa (H₂O₂, željezo, mioglobin, itd.) koji dodatno povećavaju oksidativni status ribe u zamrznutom stanju (Standal i sur., 2018.). Ovaj se fenomen pripisuje krio-koncentraciji prooksidativnih otapala oko proteinskih molekula u ne zamrznutom dijelu vode u uzorku, što dovodi do povećane oksidacije (Standal i sur., 2018). Veći udio karbonila proteina u miofibrilarnim proteinima, u odnosu na sarkoplazmatske može se objasniti činjenicom da su proteini topljivi u solima osjetljiviji su na više temperature i dulje vrijeme skladištenja zbog čega dolazi do denaturacije (Duun i Rustad, 2007). Tijekom skladištenja, najmanje vrijednosti udjela karbonila pronađene su kod uzoraka skladištenih samo 1 dan u hladnom, u odnosu na uzorke bakalara skladištene 4 i 8 dana, što ukazuje na činjenicu da se duljim skladištenjem oksidacija proteina povećava.

U ovom radu ispitan je utjecaj različitih parametara *sous-vide* metode i hladnog skladištenja na uzorke bakalara, kao nemasne ribe. *Sous-vide* metoda moćan je alat moderne kuhinje, jer pruža gotovo savršenu reproducibilnost, bolju kontrolu završetka termičke obrade namirnice te redukciju štetnih mikroorganizama na prihvatljive vrijednosti, pri ne tako visokim temperaturama obrade. Budući da su se dosadašnji radovi većinom oslanjali na zdravstvenu sigurnost namirnica obrađenih *sous-vide* metodom, novija istraživanja proučavaju utjecaj metode na promjenu tehnoloških i senzorskih karakteristika obrađene namirnice. Upravo zato sam u ovom radu htjela spojiti 2 znanstveno aktualne teme: *sous-vide*, kao jednu vrlo blagu metodu termičke obrade, kojom se nastoje u što većoj mjeri zadržati nutritivna svojstva namirnice te oksidaciju proteina, područje čiji utjecaj na kvalitetu proizvoda još uvijek nije dovoljno razjašnjen. Dobivena saznanja iz ovog rada mogu doprinjeti boljem razumijevanju promjena na proteinima, koje se događaju tijekom *sous-vide* obrade te dovode do promjena tehnoloških i senzorskih karakteristika te kvalitete proizvoda. Ove promjene u prehranbenim namirnicama su od velike važnosti, budući da određuju njihov vijek trajanja pri hladnom skladištenju.

5. ZAKLJUČCI

Temperatura i trajanje *sous-vide* termičke obrade te skladištenje u hladnom dovode do promjena senzorskih i tehnoloških karakteristika bakalara. Provedenim istraživanjem utvrđene su sljedeće promjene:

1. Gubitak mase tijekom kuhanja *sous-vide* metodom povećavao se sukladno povećanjem temperature. Hladno skladištenje djeluje pozitivno na gubitak mase tijekom termičke obrade na način da je duljim skladištenjem u hladnom gubitak na masi tijekom termičke obrade manji.
2. Duljina i temperatura termičke obrade odrazila se na boju uzoraka te se tako vrijednost L^* parametra povećavala se s povećanjem temperature. Dulje vrijeme kuhanja – 10 minuta u svim uzorcima rezultiralo je većom vrijednošću L^* parametra od kraćeg vremena kuhanja – 5 min. Vrijednost b^* parametra povećavala se sukladno s povećanjem temperature kuhanja. Pronađena je povezanost između parametra b^* i oksidacije proteina izražene kao udio ukupnih karbonila, te se povećanjem udjela ukupnih karbonila povećala i vrijednost b^* parametra, odnosno intezitet žutog dijela spektra fileta bakalara.
3. Udio proteina topljivih u vodi smanjio se povećanjem temperature, zbog denaturacije proteina.
4. Udio proteina topljivih u otopini soli smanjio se povećanjem temperature, zbog denaturacije proteina.
5. Pri temperaturama od 50°C i 60°C veći udio karbonila prisutan je u frakcijama sarkoplazmatskih proteina, dok je pri višim temperaturama, od 70°C te 80°C veći udio karbonila prisutan u frakcijama miofibrilarnih proteina.
6. Oksidacija proteina kod termički neobrađenih uzoraka gotovo je neznatna, dok se udio karbonila značajno povećao u termički obrađenim uzorcima.
7. Hladno skladištenje djeluje negativno na oksidaciju proteina tijekom termičke obrade na način da je duljim skladištenjem u hladnom udio karbonila u svim uzorcima bio veći.

8. LITERATURA

- Anonymous (2017) Gadus, < <https://hr.wikipedia.org/wiki/Gadus>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2019.
- Anderson, M.L., Ravesi, E.M. (1968) Relation between protein extractability and free fatty acid production in cod muscle aged in ice. *J. Fish Res. Bd. Canada* **25**, 2059-2069.
- Amézquita A. (2004) Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. Ph.D. dissertation, University of Nebraska-Lincoln.
- Baldwin, D. (2011) Sous vide cooking: A review. *Int. J. Gastr. Food Sci.* **1**:15-30.
- Barbieri G., Rivaldi P. (2008) The behaviour of the protein complex throughout the technological process in the production of cooked cold meats. *Meat Sci.* **80**, 1132–1137.
- Bem Embarek, P. K., i Huss, H. H. (1993) Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in vacuum packaged pasteurized fish fillets. *Int. J. Food Microbiol.* **20**, 85–95
- Bergslien, H. (1996) Sous vide treatment of salmon (*Salmon salar*). U: Proceedings of the Second European Symposium on sous vide. Leuven, Belgium, str. 281-292.
- Boles, J. A., and Swan J. E. (2002). Meat and storage effects on processing characteristics of beef roasts. *Meat Sci.* **62**, 121 – 127.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brown, J.A., Minkoff, G., and Puvanendran, V. (2003) Larviculture of Atlantic cod (*Gadus morhua*): progress, protocols and problems. *Aquacult.* **227**: 357-372.
- Christensen, L.B., Ertbjerg, P., Asalyng, M.D., Christensen, M. (2011) Effect of prolonged heat treatment from 48°C to 63°C on toughness, cooking loss and color of pork. *Meat Sci.* **88**, 280-285.
- Church, I., (1998) The sensory quality, microbiological safety and shelf life of packaged foods. U:Sous Vide and Cook–Chill Processing for the Food Industry (Ghazala, S., ured.), Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, str. 190–205.

- Church, I.J., Parsons, A.L., (2000) The sensory quality of chicken and potato products prepared using cook-chill and sous vide methods. *Int. J. Food Sci. Technol.* **35**, 155–162.
- Creed P.G. (1995) The sensory and nutritional quality of sous vide foods. *Food Control* **6**, 45-52.
- Cropotova, J., Tylewicz, U., Cocci, E., Romani, S., Dalla Rosa, M. (2016) A novel fluorescence microscopy approach to estimate quality loss of stored fruit fillings as a result of browning. *Food chem.* **194**, 175-183.
- Cropotova, J., Mozuraityte, R., Standal, I.B., Afret, K.C., Rustad, T. (2019). The effect of *sous-vide* cooking parameters, chilled storage and antioxidants on quality characteristics of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) in relation to structural changes in proteins. *Food Technol. Biotechnol.* **57**, 191-199.
- Cropotova, J., Mozuraityte, R., Standal, I.B., Grovlen, M.S., Rustad, T. (2019) Superchilled, chilled and frozen storage of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) fillets – changes in texture, drip loss, protein solubility and oxidation. *Int. J. Food Sci. Technol.* doi: 10.1111/ijfs.14136.
- Davies, M.J., Dean, R.T. (1997) Radical-mediated protein oxidation: from chemistry to medicine, New York: Oxford University Press.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. and Davies, M. J. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* **324**, 1–18.
- Dalle-Donnea, I., Rossib, R., Giustarinib, D., Milzani, A., Colombo, R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chim. Acta* **329**, 23–38.
- FAO (2007) Fisheries department. FAO - Food and agriculture Organization, <<http://www.fao.org/documents/card/en/c/8e3e5e3c-b91f-5d25-a70c-ec1fa678e82a>>.
- Pristupljeno 13. kolovoza 2019.
- Foegeding, E.A., Lanier, T.C., Fultin, H.O. (1996) Characteristics of edible muscle tissues. U: Food Chemistry, (Fennema, O.R., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 879-942.
- Gittleson, B., Saltmarch, M., Cocotas, P., McProud, L. (1991) Quantification of the physical, chemical, and sensory modes of deterioration in sous vide processed salmon. *Food Res. Int.* **28**, 117-122.

- Godsell D. (2000) Protein Data Bank Molecule of the month, January: Myoglobin. <http://www.rcsb.org/pdbstatic/education_discussion/molecule_of_the_month/download/myoglobin.pdf>. Pristupljeno 10. kolovoza 2019.
- Grimm, S., Höhn, A., Grune, T. 2012. Oxidative protein damage and the proteasome. *Amino Acids* **42**, 23–38.
- Haard, N.F. (1992) Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Res. Int.* **25**, 289-307.
- Honikel, K.O. (1998) Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat sci.* **49**, 403-413.
- Hultmann, L., Rustad, T. (2004). Iced storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*) – effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *Food Chem.* **87**, 31–41.
- Kaale, L.D., Eikevik, T.M., Rustad, T., Nordtvedt, T.S. (2014). Changes in water holding capacity and drip loss of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle during superchilled storage. *Lebensm. Wiss. Technol.* **55**, 528–536.
- Katavić, I., Baban, Lj., Treer, T., Perica, S., Katavić, I., Božić, M., Žutinić, Đ., Havranek-Lukač, J., Budin, T., Karlović, D., Rendulić, Ž. (2001) Strategija razvitka Republike Hrvatske 'Hrvatska u 21 . stoljeću' – Prehrana. *Morsko ribarstvo* 19-31.
- Katikou, P., Hughes, S.I., Robb, D.H.F. (2001). Lipid distribution within Atlantic salmon (*Salmo salar*) filets. *Aquacult.* **202**, 89-99.
- Kazemi, S., Ngadi, M.O., Gariépy, C. (2011) Protein denaturation in pork longissimus muscle of different quality groups. *Food Bioprocess Technol.* **4**, 102-106.
- Kozarić, Z. (2001) Morfologija riba, 1. izd., Veterinarski fakultet, Zagreb.
- Kurlansky, M. (1997) Cod: A biography of the fish that changed the world, 1. izd., Vintage Canada, London.
- Li, Q., Shi, X., Zhao, Q., Ouyang, J., Xu, F. (2016) Effect of cooking methods on nutritional quality and volatile compounds of Chinese chestnut. *Food Chem.* **201**, 80-86.
- Maforimbo, E., Skurray, G. R. and Nguyen, M. (2007) Evaluation of l-ascorbic acid oxidation on SH concentration in soy-wheat composite dough during resting period. *Food Sci. Technol.* **40**, 338–343.

Meinert L., Andersen L. T., Bredie W. L. P., Bjerregaard C. and Aaslyng M. D. (2007) Chemical and sensory characterisation of pan-fried pork flavour: Interactions between raw meat quality, ageing and frying temperature. *Meat Sci.* **75**, 229-242.

NACMCF (1990) Recommendations for refrigerated foods containing cooked, uncured meat or poultry products that are packed for extended, refrigerated shelf-life and that are ready to eat or prepared with little or no additional heat treatment. NACMCF – National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, Washington, D.C.

Nguyen, M.V., Arason, S., Thorkelsson, G., Gudmundsdottir, A., Thorarinsdottir, K.A., Vu, B.N. (2013) Effects of added phosphates on lipid stability during salt curing and rehydration of cod (*Gadus morhua*). *J.Am. Oil Chem. Soc.* **90**, 317-326.

Offer, G., Restall, D., Trinck, J. (1984) Water-holding in meat. Recent Advances. U: Chemistry of Meat (Bailey, A. J., ured.), The Royal Society of Chemistry, London, str. 71–83.

Offer, G., Knight, P. (1988) The structural basis of water-holding in meat. Part 2: Drip loss. U: Development in Meat Science (Lawrie, R., ured.), Elsevier Applied Science, London, str. 172-243.

Offer, G., Knight, P., Jeacocke, R., Almond, R., Cousins, T., Elsey, J., Parsons, N., Sharp, A., Starr, R., Purslow, P. (1989) The structural basis of the water-holding, appearance and toughness of meat and meat products. *Food microstruct.* **11**, 151-170.

Ofstad, R., Kidman, S., Myklebust, R., and Hermansson, A. M. (1993) Liquid holding capacity and structural-changes during heating of fish muscle: Cod (*Gadus morhua*) and Salmon (*Salmo salar*). *Food Struct.* **12**, 163–174.

Oz, F., Seyar, E. (2016) Formation of heterocyclic aromatic amines and migration level of bisphenol-A in sous-vide-cooked trout fillets at different cooking temperatures and cooking levels. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 3070-3082.

Park, J. W. 2000. Surimi and Surimi Seafood, 1.izd., Marcel Dekker, New York, str. 23-58.

Rasmussen, R.S. (2001) Quality of farmed salmonids with emphasis on proximate composition, yield and sensory characteristics. *Aquacult. Res.* **32**, 767-786.

Schellekens, W., Martens, T. (1992) Sous Vide: State of the Art, EUR 15018 EN, ALMA, Leuven, Belgium.

- Schellekens, M. (1996) New research issues in sous-vide cooking. *Trends Food Sci. Technol.* **7**, 256–262.
- Skipens, D., Johnses, S.O., Skara, T., Sivertsvik, M., Lekang, O. (2001) Optimization of Heat Processing of Farmed Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Muscle with Respect to Cook Loss, Water Holding Capacity, Color and Texture. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **20**, 331-340.
- Standal, I.B., Mozuraityte, R., Rustad, T., Alinasabhematabadi, L., Carlsson, N.G., Undeland, I. (2018). Quality of filleted Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) during chilled and frozen storage: changes in lipids, vitamin D, proteins, and small metabolites, including biogenic amines. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **27**, 338–357.
- Thornberg E. (2005) Effect of heat on meat proteins –Implication on structure and quality of meat products. *Meat Sci.* **70**, 493–508.
- Tilseth, S. (1990) New marine fish species for cold-water farming. *Aquacult.* **85**, 235-245.
- Tunhun, D., Itoh, Y., Morioka, K. and Kubota, S. (2001) Oxidation during washing of fish meat induces a decrease in gel forming ability. *Dev. Food Sci.* **42**, 357–374.
- Vidaček, S. (2013) Tehnologija ribe, Interna skripta, Sveučilište Zagrebu: Prehrambeno biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Visessanguan, W., Benjakul, S. and Tanaka, M. 2003. Effect of microbial transglutaminase on rheological properties of oxidised and non-oxidised natural actomyosin from two species of bigeye snapper. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 105–112.
- Zhang, W., Xiao, S., Ahn, D.U. (2013) Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **53**, 1191-1201.
- Yan, L.J. i Forster, M.J. (2011) Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review. *J. Chromatogr.* **879**, 1308-1315.
- Xiong, Y.L. (2000) Protein oxidation and implications for muscle foods quality. U: Antioxidants in muscle foods (Decker, E.A., Lopez-Bote, C.J., ured.), Wiley, New York, str. 85-111.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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