

# Uporaba biljnih ekstrakata u svrhu poboljšanja oksidacijske stabilnosti odabranih proizvoda ribarstva

---

**Granić, Glorija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:843341>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-13**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**UPORABA BILJNIH EKSTRAKATA U SVRHU**  
**POBOLJŠANJA OKSIDACIJSKE STABILNOSTI**  
**ODABRANIH PROIZVODA RIBARSTVA**

**ZAVRŠNI RAD**

**GLORIJA GRANIĆ**

**Matični broj: 2**

**Split, rujan 2018.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA**  
**TEHNOLOGIJA**

**UPORABA BILJNIH EKSTRAKATA U SVRHU**  
**POBOLJŠANJA OKSIDACIJSKE STABILNOSTI**  
**ODABRANIH PROIZVODA RIBARSTVA**  
**ZAVRŠNI RAD**

**GLORIJA GRANIĆ**

**Matični broj: 2**

**Split, rujan 2018.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY**

**USE OF PLANT EXTRACTS FOR IMPROVEMENT OF  
OXIDATIVE STABILITY OF SELECTED SEAFOODS**

**BACHELOR THESIS**

**GLORIJA GRANIĆ**

**Parent number: 2**

**Split, September 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

### ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Tema rada:** je prihvaćena na 3. Sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

**Mentor:** Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

**Pomoć pri izradi:** Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat

### UPORABA BILJNIH EKSTRAKATA U SVRHU POBOLJŠANJA OKSIDACIJSKE STABILNOSTI ODABRANIH PROIZVODA RIBARSTVA

Glorija Granić, 2

#### **Sažetak:**

U ovom radu istraživana je uporaba biljnih ekstrakata (ružmarina, mravinca, lavande, matičnjaka i vriska te njihovih mješavina) u svrhu poboljšanja oksidacijske stabilnosti mariniranih kozica i ribljeg ulja. Tiobarbiturni test (TBARS) se koristio u analizi sekundarnih produkata oksidacije u mariniranim kozicama, a rancimat metoda u ispitivanju oksidacijske stabilnosti ulja. Kod TBARS metode najbolji učinak pokazao je ekstrakt mravinca, dok je od mješavina se najboljom pokazala ona koje sadrži svih pet ispitivanih ekstrakata u jednakom omjeru. Općenito učinak mješavina je bio znatno bolji nego li učinak dodatka pojedinačnih ekstrakata. Kod rancimat metode (3 g ulja, 120°C, 20 L/h), dobiveni rezultati ukazuju na to da ekstrakt vriska pokazuje najveću antioksidacijsku učinkovitost (0,640 h), dok se od testiranih mješavina najboljom pokazala mješavina ekstrakta ružmarina i lavande (0,623 h).

**Ključne riječi:** proizvodi ribarstva, oksidacijska stabilnost, biljni ekstrakti, TBARS, Rancimat.

**Rad sadrži:** 31 stranicu, 14 slika, 6 tablica, 30 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### **Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Doc. dr. sc. Danijela Skroza, predsjednik
2. Doc. dr. sc. Franko Burčul, član
3. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić, mentor

**Datum obrane:** 27. rujna 2018. g.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 33

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Food Technology**

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Thesis subject:** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 3

**Mentor:** Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor

**Technical assistance:** Ph. D. Vida Šimat, Associate Professor

### USE OF PLANT EXTRACTS FOR IMPROVEMENT OF OXIDATIVE STABILITY OF SELECTED SEAFOODS

Glorija Granić, 2

#### **Abstract:**

In this study the use of herbal extracts (from rosemary, oregano, lavender, lemon balm and winter savory and their mixtures) in marinated shrimps and fish oil was investigated in order to improve their oxidative stability of . The thioribarbituric test (TBARS) was used in the analysis of secondary oxidation products in marinated shrimps, and rancimat method for the oxidation stability test of oil. Using TBARS method, the best effect was shown by the oregano extract, while the best results were obtained using the mixture that contain all five plant extracts in equal proportions. Generally, the effects of the mixtures were considerably better than those provided by the addition of individual extracts. The result obtained by the rancimat method (3 g of oil, 120°C, 20 L/h) indicated that the winter savory extract possess the highest antioxidant efficiency (0.640 h), while among tested mixtures the best results were provided by the mixture of rosemary and lavender extracts (0.623 h).

**Key words:** fishery products, oxidative stability, plant extracts, TBARS, Rancimat.

**Thesis contains:** 31 pages, 14 figures, 6 tables, 30 references

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee:**

1. Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor
2. Ph. D. Franko Burčul, Assistant Professor
3. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor

**Defence date:** September 27, 2018

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 33.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju,  
Kemijско-tehnološkog fakulteta u pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić  
Mekinić, u razdoblju od veljače do rujna 2018. godine.*

*Ovaj rad financira je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897.*



## **ZAHVALA**

*Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić, bez čije pomoći ovaj rad ne bi bio moguć, na uloženom vremenu, trudu i stručnom savjetovanju tijekom izrade ovog završnog rada, a također i tijekom cijelog ovog ciklusa školovanja.*

*Posebno zahvaljujem obitelji, kolegama i prijateljima na podršci koju su mi pružali tijekom cijelog studija.*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Tiobarbiturnim testom (TBARS metoda) odrediti parametre oksidacije tj. sekundarne produkte oksidacije u mariniranim kozicama,
- Istražiti oksidacijsku stabilnost čistog ribljeg ulja i ulja s dodacima biljnih ekstrakata korištenjem rancimat metode (3 g ulja, 120°C, 20 L/h),
- Analizirati utjecaj uporabe biljnih ekstrakata ružmarina, mravinca, matičnjaka, lavande i vriska te njihovih mješavina na oksidacijsku stabilnost mariniranih kozica i ribljeg ulja,
- Usporediti utjecaj na produljenje/sniženje oksidacijske stabilnosti pojedinačnih biljnih ekstrakata u odnosu na mješavine istih.

## SAŽETAK

U ovom radu istraživana je uporaba biljnih ekstrakata (ružmarina, mravinca, lavande, matičnjaka i vriska te njihovih mješavina) u svrhu poboljšanja oksidacijske stabilnosti mariniranih kozica i ribljeg ulja. Tiobarbiturni test (TBARS) se koristio u analizi sekundarnih produkata oksidacije u mariniranim kozicama, a rancimat metoda u ispitivanju oksidacijske stabilnosti ulja. Kod TBARS metode najbolji učinak pokazao je ekstrakt mravinca, dok je od mješavina se najboljom pokazala ona koje sadrži svih pet ispitivanih ekstrakata u jednakom omjeru. Općenito učinak mješavina je bio znatno bolji nego li učinak dodatka pojedinačnih ekstrakata. Kod rancimat metode (3 g ulja, 120°C, 20 L/h), dobiveni rezultati ukazuju na to da ekstrakt vriska pokazuje najveću antioksidacijsku učinkovitost (0,640 h), dok se od testiranih mješavina najboljom pokazala mješavina ekstrakta ružmarina i lavande (0,623 h).

**Ključne riječi:** proizvodi ribarstva, oksidacijska stabilnost, biljni ekstrakti, TBARS, Rancimat.

## **ABSTRACT**

In this study the use of herbal extracts (from rosemary, oregano, lavender, lemon balm and winter savory and their mixtures) in marinated shrimps and fish oil was investigated in order to improve their oxidative stability of . The thiobarbituric test (TBARS) was used in the analysis of secondary oxidation products in marinated shrimps, and rancimat method for the oxidation stability test of oil. Using TBARS method, the best effect was shown by the oregano extract, while the best results were obtained using the mixture that contain all five plant extracts in equal proportions. Generally, the effects of the mixtures were considerably better than those provided by the addition of individual extracts. The result obtained by the rancimat method (3 g of oil, 120°C, 20 L/h) indicated that the winter savory extract possess the highest antioxidant efficiency (0.640 h), while among tested mixtures the best results were provided by the mixture of rosemary and lavender extracts (0.623 h).

**Key words:** fishery products, oxidative stability, plant extracts, TBARS, Rancimat.

## SADRŽAJ

UVOD.	1
1. OPĆI DIO .	2
1.1. Riba i riblje ulje .	2
1.1.1. Povijesni pregled i značaj .	2
1.1.2. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost .	3
1.2. Procesi kvarenja .	9
1.2.1. Enzimski i mikrobiološki procesi kvarenja .	9
1.2.2. Kemijski procesi kvarenja .	11
1.2.3. Stabilizacija ulja .	13
2. EKSPERIMENTALNI DIO .	16
2.1. Određivanje parametara oksidacijske kod mariniranih kozica	17
2.2. Određivanje oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja .	19
3. REZULTATI I RASPRAVA .	21
3.1. Tiobarbiturni test (TBARS metoda).	21
3.2. Rancimat metoda .	25
4. ZAKLJUČAK .	28
5. LITERATURA.	29

## UVOD

Za razvoj gotovo svih proizvoda morskog podrijetla važno je poznavati kemijsku prirodu i sastav sirovina od kojih su isti proizvedeni. Riba, ali i ostali morski organizmi, su važan izvor esencijalnih i nutritivno vrlo važnih aminokiselina kao što su eikosapentaoična kiselina (EPA) i dokozaheksaenska kiselina (DHA) za koje su dokazani brojni pozitivni učinci na ljudsko zdravlje. Ipak, zbog visokog stupnja nezasićenosti navedenih kiselina, iste su lako podložne oksidaciji pod utjecajem različitih fizikalnih i kemijskih čimbenika što je jedan od najvećih problema s kojima se danas susreće prehrambena industrija.

Zbog bogatstva ribljeg ulja omega-3 masnim kiselinama (EPA i DHA) i medicinskih spoznaja njegove široke djelotvornosti, ono postaje sve popularnije na tržištu koje svakodnevno istražuje najučinkovitije metode sprječavanja oksidacije. U prehrambenoj industriji je dodatak začina, biljaka i biljnih ekstrakata u različite proizvode u svrhu sprječavanja oksidacije, mikrobiološkog kvarenja i produljenja vijeka trajanja poznato od davnina. Kako je mariniranje jedan od najstarijih kemijskih metoda zaštite i jedan od najznačajnijih postupaka konzerviranja proizvoda iz mora, u ovom radu je istražen potencijal dodatka različitih biljnih ekstrakata u sprječavanju oksidacije ribljeg ulja rancimat metodom kao i utjecaj dodatka ekstrakata na sprječavanje oksidativnog kvarenja mariniranih kozica što je testirano primjenom TBARS metode.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Riba i riblje ulje

### 1.1.1. Povijesni pregled i značaj

Proizvodi ribarstva su već stoljećima dio ljudske prehrane, a kao dokaz tome postoje fosilizirani ostaci ulovljenih riba stari gotovo 400 000 godina. Unatoč tome, hranidbena vrijednost ulja izoliranog iz jetre bakalara bila je poznata, ili barem pretpostavljena, tek krajem 19. stoljeća. Suvremena teorija da riblje ulje ima preventivni učinak na pojavu i razvoj kardiovaskularnih bolesti predložena je tek pedesetih godina prošlog stoljeća. Temeljem ove teze provedeno je istraživanje na populaciji Eskima na Grenlandu čija je prehrana oskudna voćem i povrćem, ali izrazito bogata kolesterolom i zasićenim masnim kiselinama. Prema modernim teorijama zdrave prehrane Eskimi bi, obzirom na prehrambene navike, trebali imati veliku učestalost pojave kardiovaskularnih oboljenja što nikako ne potvrđuju rezultati znanstvenih studija. Najučestalije bolesti i broj oboljelih na uzorku populacije autohtonih Eskima vidljivi su u tablici 1. (1).

**Tablica 1.** Prikaz oboljenja na uzorku 1500 grenlandskih Eskima, Upernarvik, 1950.-1974. (1)

Oboljenje	Stvarni broj oboljelih	Očekivani broj oboljelih
Karcinom (svi slučajevi)	46	53
Moždani udar (apopleksija)	25	15
Peptički ulkus	19	29
<b>Miokardijalni infarkt</b>	<b>3</b>	<b>40</b>
Psorijaza	2	40
Bronhitis/ astma	1	25
Dijabetes	1	9
Multipla skleroza	0	2

Obzirom da su dobiveni rezultati značajno odstupali od onih očekivanih, istraživači su posebno počeli obraćati pozornost na ulogu konzumacije ribe i ribljeg ulja u prevenciji navedenih oboljenja. Rezultati dobiveni u ovoj studiji, potaknuli su veliki val istraživanja i na drugim ljudskim zajednicama koje u svakodnevnoj prehrani konzumiraju značajne količine proizvoda ribarstva. Slični rezultati su dobiveni i u istraživanjima koja su uključivala stanovnike Japana, Španjolske i Portugala.

Godišnje se na svjetskoj razini za proizvodnju ribljeg ulja koristi 25 do 30 milijuna tona ribe. Obzirom da se posljednjih godina bilježi pad proizvodnje ribljeg ulja (sa gotovo 1,6 milijuna tona 1997. godine na oko 1,1 milijuna tona u 2011. godini te na 900 000 tona u 2012. godini), a potražnja za omega-3 masnim kiselinama se znatno povećala, navedeno je rezultirao povećanjem tržišne cijene ribljeg ulja (1).

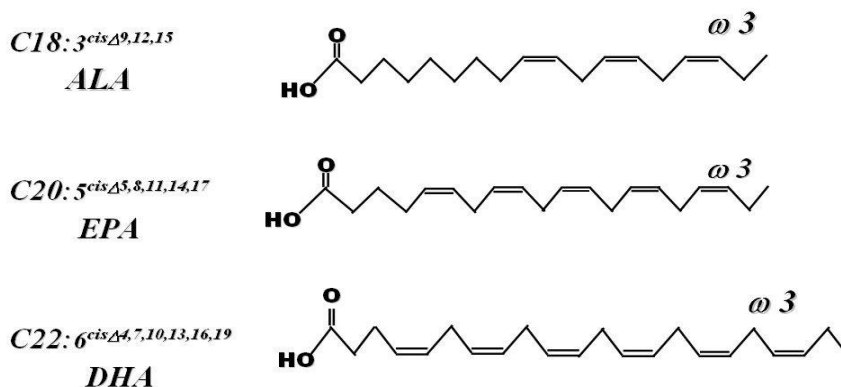
### **1.1.2. Kemijski sastav i nutritivna vrijednost**

Jestive masti i ulja uglavnom se sastoje od molekula triglicerida čiji kostur čini glicerol na kojeg su vezane tri masne kiseline. Iako prvenstveno razlikujemo zasićene i nezasićene masne kiseline, za riblje ulje je značajna prisutnost esencijalnih višestruko nezasićenih masnih kiselina što čini ujedno i osnovnu razliku između ribljeg ulja i biljnih ulja. Esencijalne masne kiseline ne mogu se sintetizirati u organizmu, pa ih je stoga potrebno unositi hranom (2).

Omega-3 masne kiseline važne su za ljudsko tijelo i imaju brojne funkcije u održavanju njegove vitalnosti, a znanstvena istraživanja koja se na njima svakodnevno provode dokazuju njihovo pozitivno djelovanje. Razlikujemo tri vrste omega-3 kiselina (3):

- ALA ( $\alpha$ -linolenska kiselina, engl.  *$\alpha$ -linolenic acid*)
- DHA (dokozaheksaenska kiselina, engl. *docosahexaenoic acid*)
- EPA (eikozapentaenska kiselina, engl. *eicosapentaenoic acid*).





**Slika 1.** Kemijske strukture najznačajnijih omega-3 masnih kiselina (4)

U nutritivnom pogledu, riba i proizvodi ribarstva čine osnovu pravilne i uravnotežene prehrane jer su izrazito bogati bjelančevinama i zdravim masnim kiselinama. Oko 40 % ribljeg ulja sastavljeno je od dugolančanih masnih kiselina (koje sadrže 14-22 ugljikovih atoma) od čega je 60-84 % nezasićenih. Općenito, morske ribe su, za razliku od slatkovodnih, nutritivno bogatije jer čak 88 % otpada na visokonezasićene masne kiseline sa 5-6 dvostrukih veza. Ipak ova značajka ih čini podložnijima oksidacijskim procesima i kvarenju. Obzirom da se unosom nezasićenih masnih kiselina u organizam smanjuje udio kolesterola u krvi, na taj se način preventivno djeluje na mogućnost kardiovaskularnih i srčanih oboljenja. Riba se na osnovu udjela i raspodjele masti u tijelu dijeli na bijelu i plavu ribu. Plava riba masti pohranjuje u stanicama po cijelome tijelu, dok ih bijela riba skladišti u jetri i manjim dijelom u trbušnoj šupljini. Stoga o lokalizaciji masti u ribi ovisi i način njene izolacije u postupku proizvodnje ribljeg ulja (5).

ALA je esencijalna kiselina pa se mora unositi prehranom, dok ljudsko tijelo u ograničenim količinama može sintetizirati DHA i EPA iz ALA. Zbog toga je važno u svakodnevnu prehranu uključiti namirnice bogate i DHA i EPA. Preporučeni dnevni unos nije određen nego varira o dobi, spolu i zdravstvenom stanju pojedinca. Za zdravu i uravnoteženu prehranu preporučuje se konzumacija ribe najmanje dva puta tjedno, pri čemu bi unos EPA i DHA u prosjeku iznosio 0,3-0,45 g/danu (3).

U tablici 2. prikazane su preporučene dnevne doze unosa alfa-linolenske kiseline za različite skupine. dok je u tablici 3. prikazan kemijski sastav različitih ribljih vrsta.

**Tablica 2.** Prikaz preporučenog dnevnog unosa ALA (3)

Životna dob/ spol	Preporučena dnevni unosa ALA (g/dan)
Muškarci (dob 19+)	1,6
Žene (dob 19+)	1,1
Trudnice	1,4
Dojilje	1,3

**Tablica 3.** Kemijski sastav (udio u %) različitih vrsta morskih riba (5)

Vrsta ribe	Nutritivna komponenta		
	Voda (%)	Lipidi (%)	Bjelančevine (%)
Bakalar	79,8-85,1	0,1-0,9	13,4-19
List	78,9-80,8	0,5-3,8	15,7-18,4
Inćun	69,9-80,8	0,7-14,5	16,2-19,4
Srdela	66,8-78,1	0,9-17,2	15,4-17,6
Ugor	60,0	8,0-13,0	14,4
Palamida	63,5	11,3	23,9
Tuna	59,0-72,0	4,0-16,0	21,0-27,0

Glavni prehrambeni izvori omega-3 masnih kiselina su plava riba (sardina, skuša, tuna, inćuni) te ribe hladnih mora (haringa, losos, bakalar), alge i zooplankton te sjemenke i orašasti plodovi. Konkretno, ALA najčešće nalazimo u biljnim uljima, orašastim plodovima, lanenim sjemenkama i proizvodima od soje dok se riba, proizvodi ribarstva, a posebno riblje ulje, smatraju glavnim i najznačajnijim prehranbenim izvorima dugolančanih derivata ALA, DHA i EPA (3).

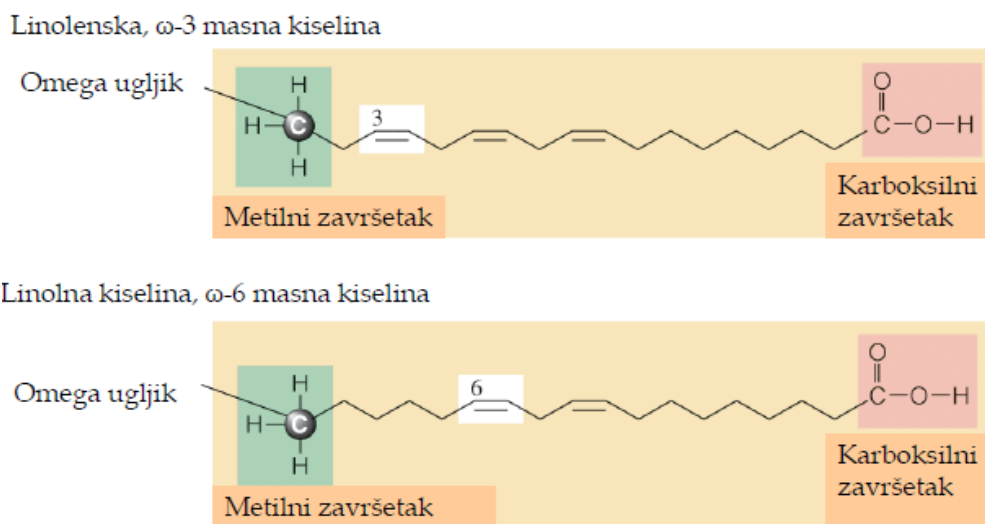
Zbog svog blagotvornog učinka i kao najznačajniji izvor omega-3 masnih kiselina riblje ulje sve češće postaje dijelom prehrane modernog čovjeka, što direktnom konzumacijom, što kao sastavni dio različitih dodataka prehrani. Iz tog razloga se riblje ulje odnosno masne kiseline nerijetko unose prehranom u obliku kapsula koje mahom postaju tržišni trend. Osim omega-3 kiselina, riblja ulja također sadrže i značajne

količine mononezasićenih i zasićenih masnih kiselina, kao i male količine omega-6 masnih kiselina (2). Riblje ulje i preparati (kapsule) koje ga sadrže prikazani su na slici 2.



**Slika 2.** Izgled ribljeg ulja u tekućem stanju i u kapsulama (6)

Glavna strukturna razlika između omega-3 i omega-6 masnih kiselina prikazana je na slici 3 i temelji se na označavanju obzirom na položaj prve dvostruke veze obzirom na metilni kraj lanca (7).



**Slika 3.** Razlika u kemijskoj strukturi između omega-3 i omega 6 masnih kiselina (7)

Jedina strukturna razlika između ovih dviju kiselina leži u položaju prve dvostruke veze u odnosu na metilnu skupinu na kraju ugljikovodičnog lanca. Ipak, bez obzira na minimalne strukturne razlike, ove dvije masne kiseline imaju u potpunosti različito djelovanje na naš organizam. Nusprodukti razgradnje omega-6 masnih kiselina uzrokuju rast stanica tumora, zgrušavanje krvi, upalne procese itd., dok omega-3 kiseline djeluju upravo suprotno. Za naš organizam nužan je unos i jednih i drugih jer biodostupnost omega-3 masnih kiselina u tkivima ovisi i o međusobnom odnosu unesenih omega-3 i omega-6 kiselina (8).

Kod ribljeg ulja, za razliku od biljnih, značajnu ulogu imaju i metali. Metali u ribljem ulju djeluju kao katalizatori pa tako ubrzavaju kemijske procese kvarenja i oksidacije, zbog čega su riblja ulja puno podložnija kvarenju nego li biljna ulja. U okoliš mogu dospjeti prirodnim putem ili kao štetne tvari emisijama iz antropogenih izvora (metalurška industrija, odlagališta otpada i dr.), što je danas mnogo češće. Mogućnost akumuliranja metala u biološkim sustavima odnosno bioakumulacija je jedna od najznačajnijih karakteristika metala. Metali na taj način ulaze u hranidbeni lanac i štetno djeluju na cijeli ekosustav (9).

U tablici 4. prikazan je sadržaj vitamina A i D te vitamina B kompleksa u različitim vrstama riba te u ribljem ulju. Mineralne tvari se nalaze u obliku soli, a najznačajnije su soli natrija, kalija, kalcija, magnezija i fosfora (5).

**Tablica 4.** Sadržaj vitamina u različitoj ribi (5)

Vrsta ribe	A (IU/g)	D (IU/g)	B1 (tiamin) ( $\mu$ /g)	B2 (riboflavin) ( $\mu$ /g)	B3 (niacin) ( $\mu$ /g)	B5 (pantotenska kiselina) ( $\mu$ /g)	B6 (piridoksin) ( $\mu$ /g)
Bakalar	0-50	0	0,7	0,8	20	1,7	1,7
Haringa	20-400	300-1000	0,4	3,0	40	10	4,5
Riblje ulje	200-10000	20-300	-	3,4	15	403	-

Naravno, jedinstveni opis kemijskog sastava riba ne postoji obzirom da on ovisi o brojnim čimbenicima poput vrste ribe, njezinog geografskog staništa, vrsti vodenog staništa, dobi, spolnoj zrelosti, veličini, načinu ishrane, itd.

Osim navedenih sastojaka ribe koji su važni za ljudsku prehranu i imaju pozitivan učinak za ljudsko zdravlje, tijekom prerade, manipulacije i skladištenja ribe potrebno je voditi računa o potencijalnim procesima oksidacije pri čemu nastaju različiti organski spojevi poput aldehida, ketona ili peroksida. Ovi spojevi nemaju samo utjecaj na organoleptička svojstva već su brojni od njih i toksični. Djelovanjem enzima lipaze, u tkivu ribe se tokom skladištenja postupno događa hidroliza masti prilikom čega nastaju slobodne masne kiseline i glicerol (10).

Lipidni peroksidi pri djelovanju iona željeza ili bakra stvaraju brojne organske produkte razgradnje od kojih mnogi mogu imati vrlo štetno djelovanje. Najčešći produkt lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA) koji je ujedno i najopasniji. MDA je mutageni produkt koji tvori štetne komplekse koje nalazimo u stanicama različitih organa. Ovaj spoj pokazuje izraziti afinitet prema lizinskom aminokiselinskom dijelu DNK, a napadom na gvaninski ostatak izaziva mutagena oštećenja. Još jedna činjenica štetnog djelovanja je ta da se MDA u organizmu razgrađuje do malonatne kiseline koja djeluje kao kompetitivni inhibitor u Krebsovom ciklusu. Najčešće korištena metoda za mjerenje stupnja oksidacije u ribljim proizvodima upravo se temelji na određivanju sekundarnih produkata lipidne oksidacije korištenjem tzv. tiobarbiturnog testa tj. spektrofotometrijsko određivanje fluorescentno ružičastog kompleksa tiobarbiturna kiselina-malondialdehid (engl. *TBA-MDA complex*) (10).

Posljednjih nekoliko desetljeća značaj omega-3 masnih kiselina za ljudsko zdravlje, zahvaljujući istraživanjima koja dokazuju pozitivan učinak u prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja, kontinuirano se povećava. One u ljudskom organizmu snižavaju razinu triglicerida pa prvenstveno pozitivno djeluju na srce i krvne žile te u prevenciji i terapiji malignih i kardiovaskularnih bolesti. Mnogobrojna klinička i epidemiološka istraživanja ukazala su na pozitivan učinak omega-3 masnih kiselina u razvoju djece, a novije spoznaje ukazuju i na blagotvorno djelovanje kod raznih psihičkih bolesti, uključujući depresiju, demenciju, poremećaj aktivnosti i deficita pažnje (engl. *attention deficit hyperactivity disorder* - ADHD) kao i na Alzheimerovu bolest (11).

## **1.2. Procesi kvarenja**

Ulje je, osim kemijskim reakcijama, podložno i mikrobiološkim i enzimskim procesima koji dovode do nepoželjnih promjena i kvarenja, mijenjajući mu na taj način organoleptičke karakteristike i nutritivna svojstva, uzrokujući gubitak dijela bioloških tvari, vitamina i provitamina, esencijalnih masnih kiselina i drugih spojeva.

Posljedica kvarenja su, kao što je ranije spomenuto, razgradni produkti, isparljivi karbonilni spojevi i niže molekularne masne kiseline koje ulju daju neugodan okus i karakterističan miris užglosti. Neki razgradni produkti, poput peroksida, polimera, a najčešće prethodno opisanog MDA, mogu biti štetni za zdravlje pa se takve masti i ulja koriste isključivo u tehničke svrhe (12).

Obzirom na uzroke, procese kvarenja dijelimo na:

- enzimске i mikrobiološke procese kvarenja
- kemijske procese kvarenja.

### **1.2.1. Enzimski i mikrobiološki procesi kvarenja**

Da bi došlo do ove vrste kvarenja neophodno je prisustvo enzima ili mikroorganizama te njima odgovarajući uvjeti poput temperature, sadržaja i aktiviteta vode, određene pH vrijednosti, itd.

Procesi kvarenja koje uzrokuju enzimi su karakteristični za sirovine u kojima su sadržana ulja i masti dok su procesi kvarenja izazvani mikroorganizmima karakteristični za prerađevine i proizvode koji ih sadržavaju.

Osnovne reakcije koje su značajne za enzimске i mikrobiološke procese kvarenja su:

- hidrolitička razgradnja
- $\beta$ -ketooksidacija (13)

#### **a) Hidrolitička razgradnja**

Do kvarenja uzrokovanog hidrolitičkom razgradnjom dolazi u prisustvu vode i lipolitičkih enzima (lipaza) pri čemu dolazi do hidrolize triacilglicerola. Kod ove reakcije dolazi do cijepanja esterske veze masnih kiselina i alkohola glicerola te kao produkti nastaju slobodne masne kiseline koje za posljedicu imaju povećanje kiselosti, a istovremeno mogu nastati mono- i digliceridi te glicerol. Ipak, bez obzira na navedene uvjete koji odgovaraju ovoj vrsti kvarenja (prisutnost vode i enzima), pri temperaturama višim od 80°C, kao i pri onim nižim od -20°C, dolazi do inaktivacije enzima pa je hidrolitička razgradnja spriječena. Ova vrsta kvarenja se javlja prvenstveno u sirovini, kao i kod lipida onih proizvoda koji sadrže veći udio vode (npr. mesni i mliječni proizvodi). Stupanj nastalih hidrolitičkih promjena odnosno napretka ove vrste kvarenja, prati se određivanjem udjela slobodnih masnih kiselina u uzorcima. (13)

#### **b) $\beta$ -ketooksidacija**

Do reakcija  $\beta$ -ketooksidacije dolazi uslijed djelovanja mikroorganizama, plijesni iz grupe *Aspergillus* i *Penicillium* te djelovanjem bakterijskih vrsta *Bacillus mesentericus* i *Bacillus subtilis*.

Kod ovih procesa mikroorganizmi u prisustvu kisika iz zraka napadaju zasićene masne kiseline i to metilensku skupinu u  $\beta$ -položaju u odnosu na karboksilnu skupinu (odakle potječe i naziv reakcije). Kao rezultat nastaju  $\beta$ -keto kiseline kao primarni produkti i metil keton kao sekundarni produkt. Neugodan miris, karakterističan za ovu vrstu kvarenja, poznat kao „miris užglosti“, posljedica je upravo prisustva metil ketona. Budući da je  $\beta$ -ketooksidacija uzrokovana aktivnošću mikroorganizama, sprječava se upravo provođenjem postupaka kojima se oni inhibiraju i uništavaju, poput procesa pasterizacije, sterilizacije, prilagođavanja pH sredine ili pak dodatkom konzervansa (14).

### 1.2.2. Kemijski procesi kvarenja

Kemijski procesi koji dovode do kvarenja ulja su:

- autooksidacija
- termooksidacijske promjene
- reverzija (15).

#### a) Autooksidacija

Do autooksidacije dolazi djelovanjem kisika iz zraka na nezasićene masne kiseline, a obzirom da gotovo sva ulja i masti sadrže manje ili više nezasićenih masnih kiselina, autooksidacija je vrsta kvarenja koja se javlja gotovo kod svih vrsta masti. Hoće li do autooksidacije doći brže ili sporije ovisi o sastavu masti, načinu njena čuvanja, skladištenja i eventualno prisutnim sastojcima koji ubrzavaju odnosno usporavaju ovu reakciju. Oksidacijom se gube esencijalne masne kiseline, ali također dolazi i do oksidacije vitamina i provitamina. Budući da brojni nastali produkti oksidacije djeluju toksično, veoma je važno spriječiti kvarenje tijekom proizvodnje, prerade, skladištenja i upotrebe ulja (16).

Gledajući brzinu oksidacije sastojaka ulja, ona je znatno brža kod višestruko nezasićenih komponenti u usporedbi s onim mononezasićenim ili zasićenim, zbog čega prve smatramo ključnim za ovaj proces kvarenja (15).

Mehanizam autooksidacije objašnjava se teorijom slobodnih radikala kao što je prethodno spomenuto, a odvija se u tri faze:

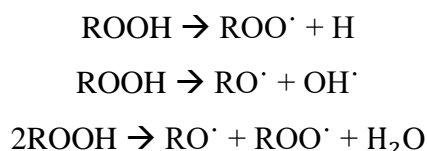
- početak reakcije (inicijacija)
- tijek reakcije (propagacija)
- završetak reakcije (terminacija).

Slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule koji u svojoj strukturi imaju jedan ili više nesparenih elektrona i uzrok su visoke i neselektivne reaktivnosti (17).

#### Početak reakcije (inicijacija)

Kisik napada molekule nezasićenih masnih kiselina (RH) i pri tome se stvaraju slobodni radikali ( $R\cdot$ ) masnih kiselina, kao što je vidljivo u jednadžbama (18,19).

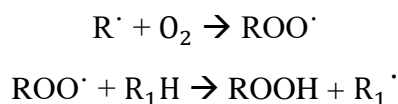




Kao rezultat ovih reakcija nastaju slobodni radikali. U početnoj fazi nema nastalih hidroperoksida ili su prisutni u izuzetno malim količinama, pa je ova faza vrlo spora (18).

### **Tijek reakcije (propagacija)**

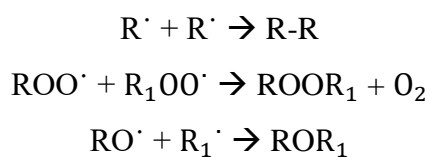
Iz slobodnih radikala masnih kiselina nastaju hidroperoksidi (ROOH) i slobodni radikali peroksida (ROO $\cdot$ ) vezanjem kisika. Hidroperoksidi, primarni produkti oksidacije su labilni pa se dalje razgrađuju (najviše pod utjecajem temperature) na slobodne radikale (RO $\cdot$ , ROO i dr.) i ostale produkte oksidacije. Ovi produkti su poznati kao sekundarni i tu spadaju različiti aldehidi, ketoni, alkoholi, masne kiseline i dr., od kojih su neki zaslužni za užegao miris karakterističan za oksidiranu mast. Slobodni radikali, kao izrazito reaktivne molekule, napadaju nove lance masnih kiselina i ponovno stvaraju hidroperoksidi i slobodne radikale peroksida (18,19).



Kod ovih reakcija vezivanjem kisika nastaju hidroperoksidi i slobodni radikali peroksida, dok se nestabilni hidroperoksidi razgrađuju

### **Završna faza (terminacija)**

Nakon faze propagacije reakcija oksidacije se lančano nastavlja dalje sve dok slobodni radikali ne reagiraju međusobno. Međusobnom reakcijom stvaraju se polimeri koji su inaktivni i stabilni pa time i završava proces autooksidacije, kao što je prikazano (20):



## **b) Termooksidacijske promjene**

Zagrijavanjem masti iznad 150°C u prisustvu zraka, uz oksidacijske produkte (hidroperoksida i njihovih razgranatih produkata), nastaju i produkti termooksidacije (dimeri i polimeri triglicerida, oksipolimeri, cikličke masne kiseline itd.) koji su toksični i štetno djeluju na ljudsko zdravlje. Utjecaj temperature na oksidaciju masti varira i najčešće se događa prilikom procesa termičke obrade hrane kao što su procesi prženja, pečenja i sl., a osim o sastavu masnih kiselina, ovisi i o udjelu antioksidansa i prooksidansa u mastima. Općenito, što je stupanj nezasićenosti masnoće veći, tokom zagrijavanja nastaje više produkata termooksidacije koji uzrokuju vidljive promjene izgleda i sastava, kao što su tamnija boja i porast viskoziteta, dok pojedine promjene nisu vidljive već se parametri moraju odrediti kemijskim ili fizikalnim metodama (21).

## **c) Reverzija**

Reverzija je reakcija koja se češće javlja kod biljnih ulja nego li kod masnoća animalnog porijekla i ribljih ulja, a očituje se pojavom i razvojem neugodnog mirisa tijekom skladištenja, koji je posebno naglašen ako se takvo ulje zagrijava. Još uvijek nije u potpunosti poznat uzrok reverzijske promjene, ali se pretpostavlja se da je ona posljedica djelovanja razgradnih produkata nekih negliceridnih sastojaka i linolenske kiseline. Ipak, u praksi su ipak pronađeni načini kojima se reverzija može ublažiti kao što su pravilna provedba načina rafinacije, djelomična hidrogenacija i dodatak limunske kiseline (12).

### **1.2.3. Stabilizacija ulja**

Oksidacijska stabilnost ulja ovisi o brojnim faktorima, a da bi se ovaj proces zaustavio potrebno je djelovati u usporavajućoj fazi propagacije na način da se deaktiviraju slobodni radikali u sustavu. Pri ovom procesu važnu ulogu imaju antioksidansi koji usporavaju autooksidacijsko kvarenje ulja i na taj način poboljšavaju njegovu stabilnost (22).

Antioksidansi su tvari koje prisutne u malim količinama sprječavaju ili usporavaju proces oksidacijskog kvarenja i produžuju održivost ulja (23).

Dakle, antioksidansi usporavaju oksidaciju masti, međutim ukoliko su dodani nakon završetka indukcijske faze, nemaju utjecaja na procese kvarenja. Stoga, da bi se što uspješnije spriječio autokatalitički proces i da bi antioksidansi mogli djelovati, potrebno ih je dodati u svježe ulje ili mast čiji je peroksidni broj manji od 1 meq O<sub>2</sub>/kg masti (21).

Antioksidansi se općenito dijele na primarne i sekundarne. U primarne ubrajamo galate, butil-hidroksianisol (BHA), butil- hidroksitoluen (BHT), tokoferole, fenolne spojeva, askorbate te ekstrakte biljaka i začina. Među sekundarne antioksidanse ubrajamo etilendiamin-tetra-octenu kiselinu (EDTA), limunsku kiselinu, fosforu kiselinu i određene aminokiseline, Sekundarni antioksidansi djeluju na način da uklanjaju metalne ione koji potpomažu fazu inicijacije u procesu autooksidacije (22). Naravno, povećanjem koncentracije antioksidansa povećava se i oksidacijska stabilnost ulja, međutim ako se pojedini antioksidansi dodaju u većoj koncentraciji od preporučene oni mogu djelovati potpuno suprotno i ubrzati oksidacijsko kvarenje ulja (prooksidativno djelovanje) (24).

Iako je poznat velik broj prirodnih i sintetskih antioksidansa, nisu svi pogodni za korištenje u stabilizaciji jestivih ulja i masti, a oni čije je korištenje najučestalije prikazani su u tablici 5 (25).

**Tablica 5.** Najčešći prehrambeni antioksidansi (25)

<b>Prirodni</b>	<b>Sintetski</b>
Karotenoidi	Butil hidroksianisol
Flavonoidi	Butil hidroksitoluen
Fenolne kiseline	Propil galat
Tokoferoli i tokotrienoli	Tercijarni butilhidrokinon

Tokoferoli i karotenoidi su najpoznatiji prirodni antioksidansi, a u novijim znanstvenim istraživanjima sve popularniji su i biljni ekstrakti poput ekstrakata ružmarina, kadulje, mravinca, lovora, matičnjaka, maslinovog lista te drugih začinskih i ljekovitih biljaka. Među prirodne antioksidanse koji su uspješno dokazali svoje

djelovanje ubrajamo i velik broj fenolnih spojeva, neke aminokiseline i dipeptidi, fosfolipidi, hidrolizati proteina, karotenoidi te anorganske soli (26)

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom radu za ispitivanje oksidacijske stabilnosti odnosno parametara oksidacije u proizvodima ribarstva; ribljem ulju i mariniranim kozicama, kojima su dodani biljni ekstrakti, korištene su dvije metode. Uzorcima ribljeg ulja određena je oksidacijska stabilnost bez i sa dodatkom ekstrakata začinskog bilja korištenjem Rancimat metode (Rancimat, 743, Metrohm USA, Inc, Florida, SAD), dok je na mariniranim uzorcima mesa kozice za određivanje stupnja oksidacije primijenjena je spektrofotometrijska metoda tiobarbiturnog testa ili kraće zvana TBARS metoda (engl. *Tiobarbituric Acid Reactive Substances*) pri čemu je korišten uređaj UV-VIS spektrofotometar (Lambda EZ 201, Perkin-Elmer, SAD).

Ekstrakti biljaka pripremljeni su kao dio prethodnog istraživanja i to su bili ekstrakti ružmarina, matičnjaka, lavande, mravinca i vriska. Kao ekstrakcijsko otapalo kod pripreme ekstrakata navedenih biljaka korištena je destilirana voda, a ekstrakcija se provodila u ultrazvučnoj kupelji tijekom 2 sata pri temperaturi 60°C. Omjer biljnog materijala (g) i vode (mL) bio je 15:100.

Osim čistih ekstrakata testirane su i njihove mješavine koje su pripremljene miješanjem određenih ekstrakata u različitim omjerima kao što je prikazano u tablici 6.

**Tablica 6.** Sastav testiranih mješavina biljnih ekstrakata

Oznaka	Korišteni biljni ekstrakti	Omjer ekstrakata
Mješavina 1	R + MR + L	3 : 1 : 1
Mješavina 2	R + L + V	3 : 2 : 1
Mješavina 3	R + L	3 : 2
Mješavina 4	R + MR	3 : 2
Mješavina 5	R + MR + L	1 : 1 : 1
Mješavina 6	R + MR + L + V + M	1 : 1 : 1 : 1 : 1

\*ružmarin (R), mravinac (MR), lavanda (L), vrisak (V), matičnjak (M)

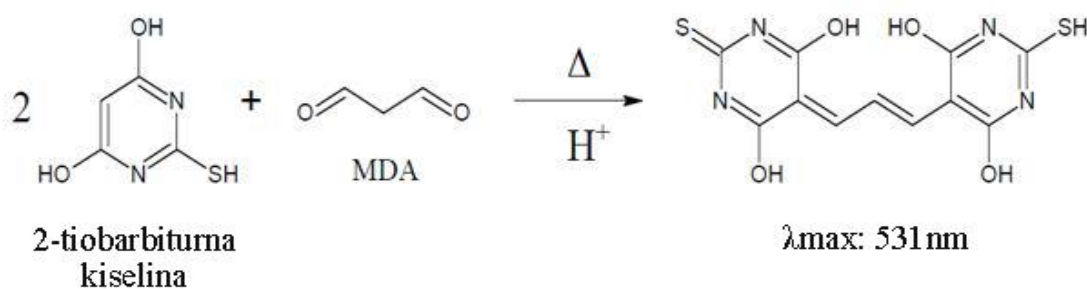
## 2.1. Određivanje oksidacijskih parametara u mariniranim kozicama

Kao što je opisano u općem dijelu rada, procesi oksidacije u hrani koja sadrži lipide dovode do njene užeglosti. Takve pojave jedne su od najznačajnijih negativnih promjena koje se javljaju u namirnicama prilikom njihove prerade, proizvodnje, manipulacije, upotrebe i skladištenja.

Kod određivanja stupnja razvoja oksidacijskih procesa u hrani najčešće se koristi tiobarbiturni test koji se temelji na određivanju sekundarnih produkata lipidne oksidacije. Jedan od najvažnijih produkata lipidne oksidacije nezasićenih masnih kiselina je malondialdehid (MDA), koji se ujedno smatra i izrazito kancerogenim.

Kod tiobarbiturnog testa, MDA pri uvjetima niskog pH i visoke temperature reagira s 2-tiobarbiturnom kiselinom (TBK<sub>2</sub>) pri čemu nastaje ružičasto obojeni MDA-TBK<sub>2</sub> kompleks (slika 4) čija se koncentracija određuje spektrofotometrijski. Izgled tj. nastalo obojenje otopina nakon reakcije prikazan je na slici 5.

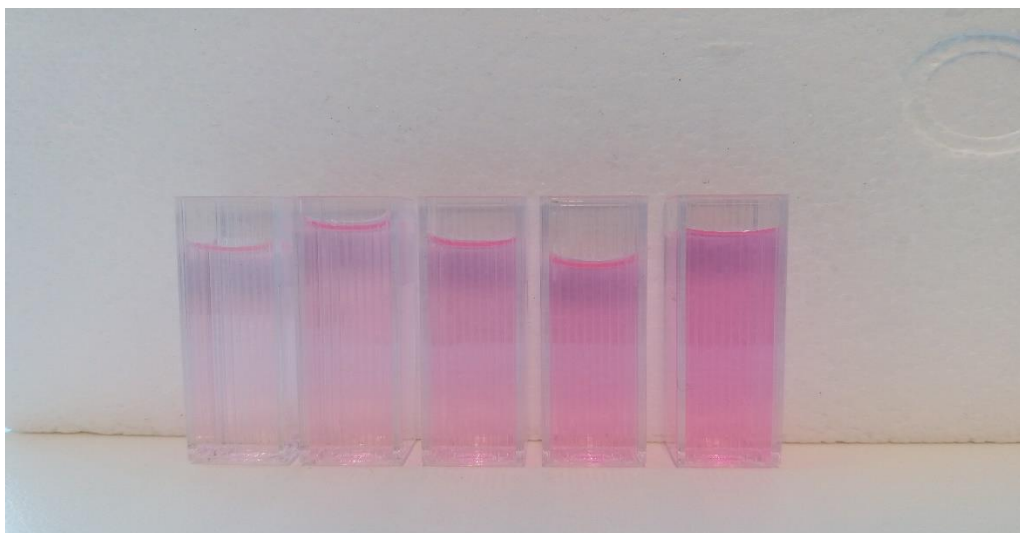
Nastalo obojenje ima apsorpcijski maksimum pri 532-535 nm, a koncentracija MDA je proporcionalna stupnju oksidacije uzorka. Budući da TBK, osim s MDA, reagira i s drugim spojevima, obavezno je dodavanje nekog antioksidansa kako bi se spriječile takve reakcije tijekom homogenizacije i filtracije uzorka. U tu svrhu najčešće se dodaju propil-galat i etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (10).



Slika 4. Reakcija nastajanja MDA-TBK<sub>2</sub> kompleksa (27)

U ovom istraživanju ispitani su sekundarni produkti lipidne oksidacije nastali u mesu kozica tijekom njegova mariniranja u klasičnoj marinadi koja je sadržavala smjesu vode i obezbojenog vinskog octa u omjeru 3:1 i 6% soli, kao i u marinadama u koje su dodani različiti volumeni biljnih ekstrakata ili mješavina. Za svaki uzorak je marinirano

50 g kozica kojima je dodano 100 mL nalijeva. Nakon mariniranja u trajanju od 7 dana, kozice su ocijeđene i prebačene u suncokretovo ulje u kojem su prije analiza stajale dva mjeseca.



**Slika 5.** Izgled otopina po nastanku MDA-TBK<sub>2</sub> kompleksa (vlastita fotografija)

#### **Postupak određivanja:**

20 g mesa kozice se pomiješa s 40 mL 7,5% otopine trikloroctene kiseline (TCA) koja je pripremljena otapanjem 75 g TCA, 1 g propil galata te 1 g EDTA u destiliranoj vodi do konačnog volumena 1000 mL.

Uzorak se potom homogenizira uz pomoć štapnog miksera, nakon čega se ostavi da odstoji tijekom 30 minuta. Homogenizirana smjesa se filtrira preko Whatman 1 filter papira, nakon čega se po 5 mL filtrata otpipetira u plastične falcon epruvete. U svaku epruvetu doda se 5 mL otopine TBK (0,02 M), epruvete se začepe te se urone u vodenu kupelj zagrijanu na 100°C tijekom 40 minuta. Nakon toga uzorci se ohlade, a alikvoti prenesu u kivete koje idu na spektrofotometrijsko mjerenje pri valnoj duljini od 538 nm. Slijepa proba umjesto filtrata sadrži jednaku količinu destilirane vode.

Rezultati su izraženi preko baždarne krivulje ( $y = 9,0371x - 0,0088$ ,  $r^2=0,9999$ ) dobivene za pet točaka otopine standarda 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) i izraženi su u  $\mu\text{M}$  malondialdehida (MDA)/100 g (28,29).

## 2.2. Određivanje oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja

Rancimat metoda je jedna od najkorištenijih metoda određivanja oksidacijske stabilnosti masti i ulja. Ova metoda predstavlja tipičnu konduktometrijsku metodu koja se temelji na mjerenju provodljivosti destilirane vode koja tijekom vremena apsorbira hlapljive produkte oksidacije ulja. Uzorak ulja je izložen povišenoj temperaturi (100°C) i propuhivanju strujom zraka (20 L/h). Pod takvim uvjetima potpomognuta je oksidacija ispitivanog uzorka ulja, a hlapivi produkti oksidacije, nošeni strujom zraka, se prenose u posudu za mjerenje u kojoj se nalazi voda. Na temelju podataka koji bilježe porast provodljivosti destilirane vode koja je apsorbirala produkte oksidacije izrađuje se rancimat krivulja na kojoj je jasno vidljiv indukcijski period, odnosno vrijeme tijekom kojeg je uzorak stabilan i nije došlo do akcelerirane oksidacije (30). Izgled postavljenog uzorka ulja na Rancimat uređaj prikazan je na slici 6.



**Slika 6.** Uzorci ulja postavljeni na uređaj Rancimat (vlastita fotografija)



### **Postupak određivanja:**

Na analitičkoj vagi se u epruvete (reakcijske posude) izvaže po 3 g ribljeg ulja. U dvije epruvete se stavi samo riblje ulje i one služe kao slijepa proba, dok se u ostale doda po 100  $\mu$ L biljnog ekstrakata ili njihove mješavine.

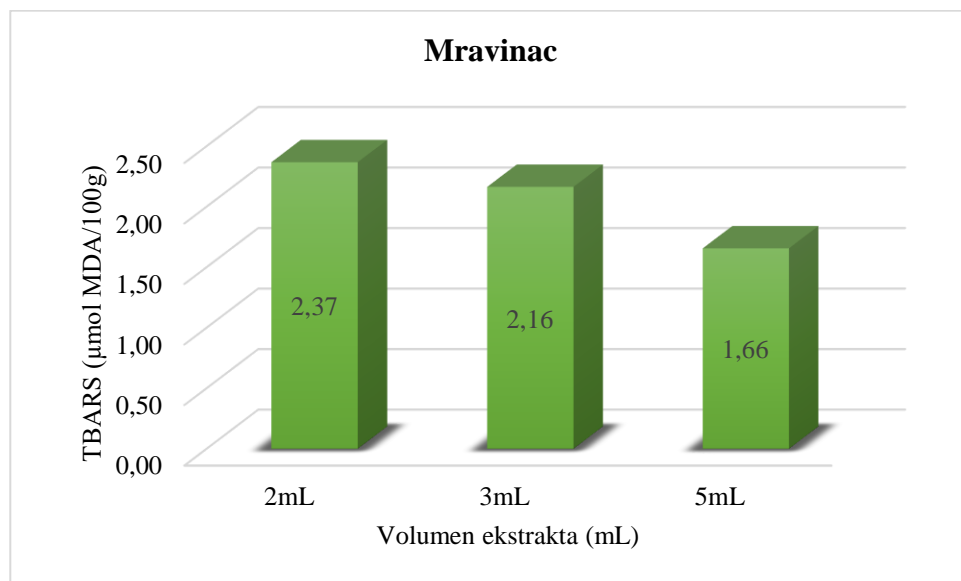
Testiranje oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja, sa i bez dodatka ekstrakata, se provodi pri 100°C te pri protoku zraka od 20 L/h. Točka infleksije koja se automatski odredi na dobivenoj rancimat krivulji pokazatelj je trajanja indukcijskog vremena i vrijeme je oksidacijske stabilnosti uzorka nakon čega počinje njegova izrazito brza oksidacija. Usporedbom oksidacijske stabilnosti samog ulja i onog u koje je dodan ekstrakt ili mješavina ekstrakata moguće je odrediti utjecaj dodatka na oksidacijsku stabilnost ulja, odnosno da li ono produljuje ili skraćuje oksidacijsku stabilnost uzorka.

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istraživana je uporaba biljnih ekstrakata u svrhu poboljšanja oksidacijske stabilnosti odabranih proizvoda ribarstva. Korišteni su ekstrakti ružmarina, mravinca, lavande, matičnjaka i vriska te različite mješavine istih, te dvije najpoznatije metode za ispitivanje stupnja oksidacije lipida, tiobarbiturni test (TBARS) u analizi sekundarnih produkata oksidacije u mariniranim kozicama i rancimat metoda kod ispitivanja oksidacijske stabilnost ribljeg ulja.

#### 3.1. Tiobarbiturni test (TBARS metoda)

TBARS metoda temelji se na određivanju sekundarnih produkata lipidne oksidacije. Budući da je malondialdehid (MDA) jedan od najvažnijih, ujedno i najštetnijih produkata, tiobarbiturnim testom se, kao što je opisano u prethodnom poglavlju, spektrofotometrijski određuje njegova koncentracija nakon reakcije nastanka MDA-TBK<sub>2</sub> kompleksa. U konačnici, određena TBARS vrijednost je mjera oksidacijskog stanja mariniranih kozica (10). Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 7-12, izraženi u vidu koncentracije MDA izražene u  $\mu\text{mol MDA}/100\text{ g}$  kozica.

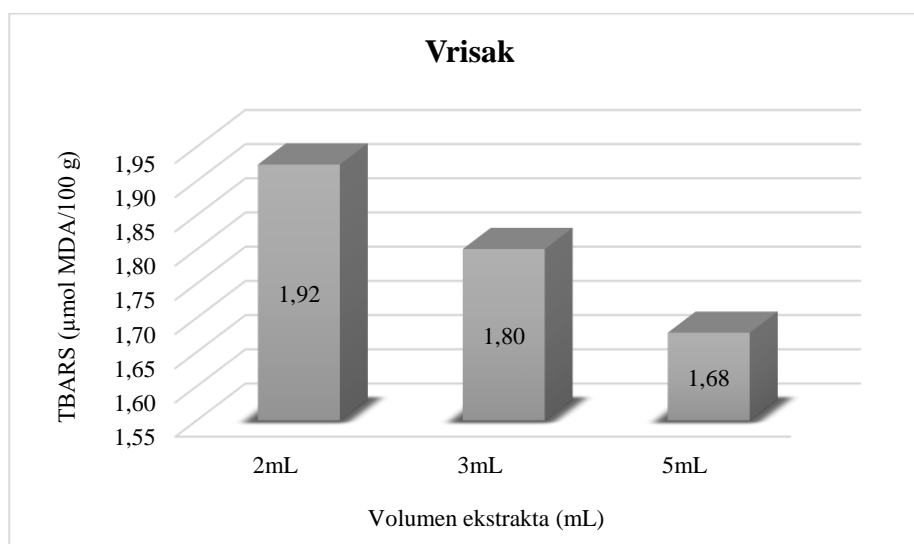


**Slika 7.** Grafički prikaz određene TBARS vrijednosti u uzorku kozica nakon mariniranja uz dodatak ekstrakta mravinca

Kao što je vidljivo iz prikazanih rezultata, TBARS vrijednost je obrnuto proporcionalna povećanju volumena (koncentracije) dodanog ekstrakta što je potvrđeno u slučaju primjene svih testiranih ekstrakata.

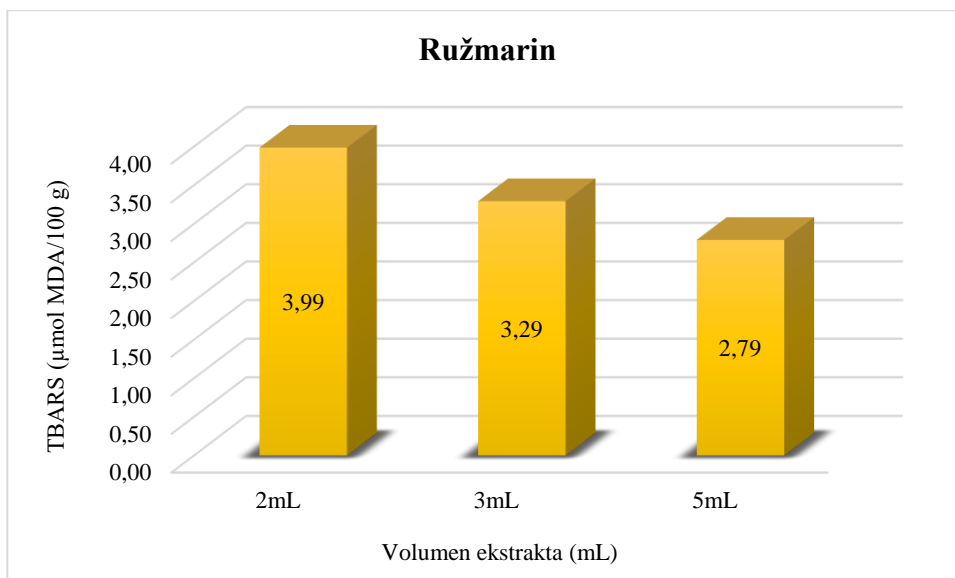
TBARS u uzorcima kozica mariniranim uz dodatak ekstrakta mravinca kretao se u rasponu od 1,66 do 2,37  $\mu\text{mol MDA}/100\text{ g}$ , s tim da je dodatak najvećeg volumena ekstrakta (5 mL) rezultirao je najvećom vrijednošću.

Kao što je vidljivo sa slike 8. dodatak iste količine ekstrakta vriska tijekom mariniranja kozica u 100 mL nalijeva rezultirao je s TBARS vrijednosti od 1,68  $\mu\text{mol MDA}/100\text{ g}$ .

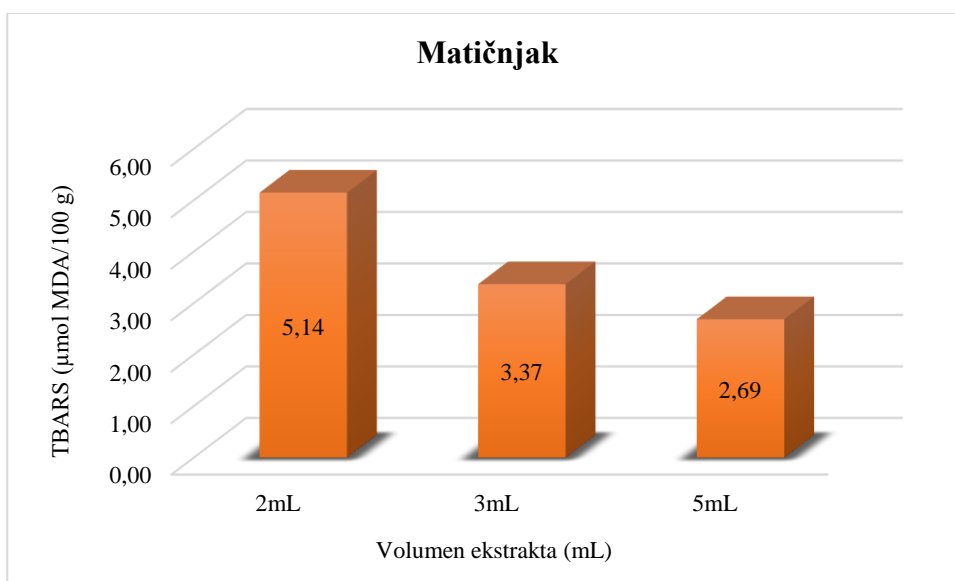


**Slika 8.** Grafički prikaz određene TBARS vrijednosti u uzorku kozica nakon mariniranja uz dodatak ekstrakta vriska

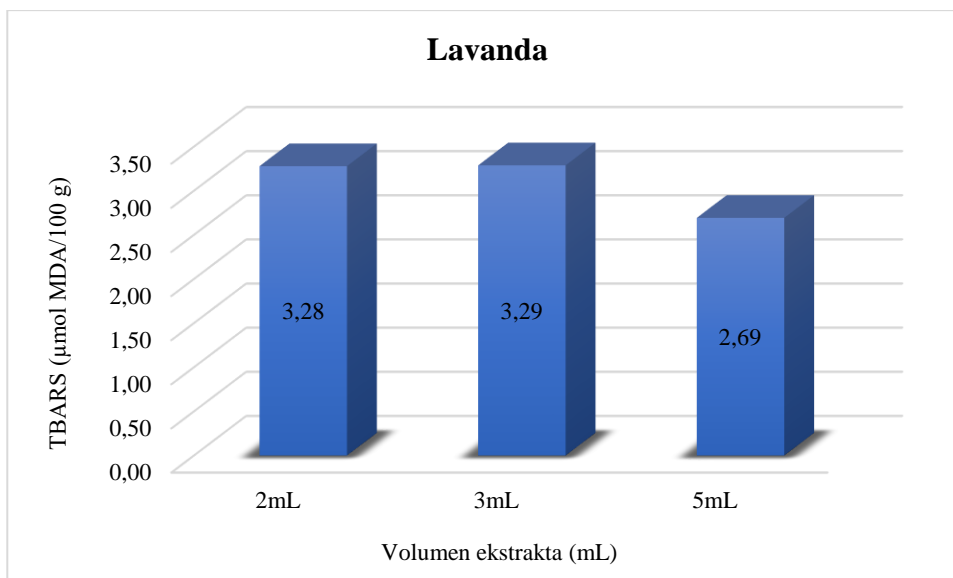
Marinirani uzorci s dodanim ekstraktima ružmarina (slika 9), matičnjaka (slika 10) i lavande (slika 11) su pokazali znatno veće TBARS vrijednosti. Dodatkom 2 mL ekstrakta ružmarina i matičnjaka rezultiralo je s vrijednostima 3,99 i 5,14  $\mu\text{mol MDA}/100\text{ g}$  mesa kozica. Vrijednosti dobivene dodatkom istih ekstrakata, ali u većoj količini od 5 mL, pokazale su niže vrijednosti (2,79 i 2,69  $\mu\text{mol MDA}/100\text{ g}$ ). Dodatak ekstrakta lavande rezultirao je sa TBARS vrijednostima od 3,28  $\mu\text{mol MDA}/100\text{ g}$  u slučaju dodatka 2 mL ekstrakta, te 2,37  $\mu\text{mol MDA}/100\text{ g}$  u slučaju kad je dodano 5 mL.



**Slika 9.** Grafički prikaz određene TBARS vrijednosti u uzorku kozica nakon mariniranja uz dodatak ekstrakta ružmarina



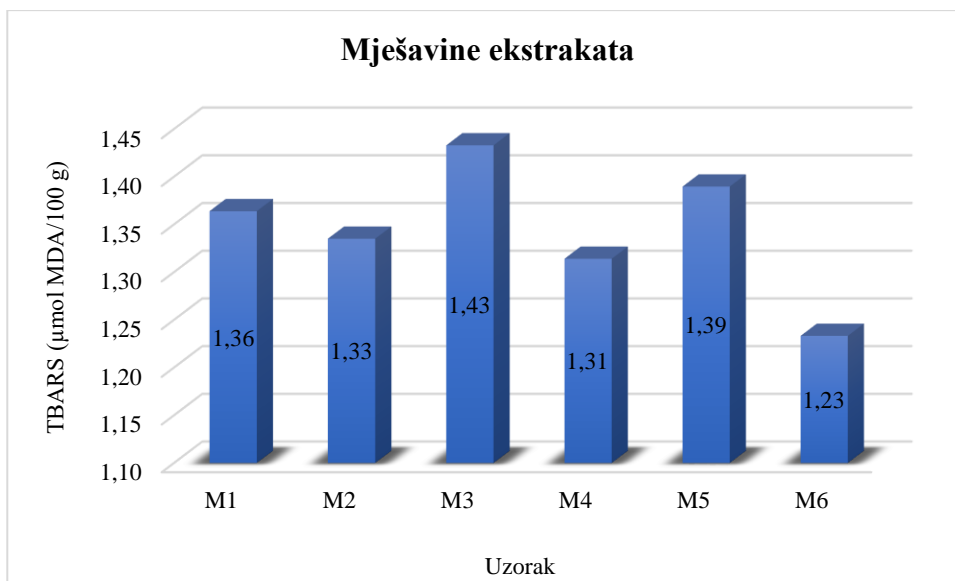
**Slika 10.** Grafički prikaz određene TBARS vrijednosti u uzorku kozica nakon mariniranja uz dodatak ekstrakta matičnjaka



**Slika 11.** Grafički prikaz određene TBARS vrijednosti u uzorku kozica nakon mariniranja uz dodatak ekstrakta lavande

Osim utjecaja dodatka čistih ekstrakata tijekom mariniranja kozica, testirana je i primjena njihovih mješavina koje su definirane u tablici 8. Prema tamo istaknutim podacima vidljivo je da M1 predstavlja mješavinu ekstrakata ružmarina, mravinca i lavande u omjeru 3:1:1, dok M2 predstavlja mješavinu ekstrakata ružmarina, lavande i vrisaka u 3:2:1. M3 mješavina sadrži ekstrakte ružmarina i lavande u omjeru 3:2, a M4 predstavlja isti omjer ružmarina s mravincem. Mješavina M5 predstavlja mješavinu ekstrakata ružmarina, mravinca i lavande u omjeru 1:1:1, dok je M6 mješavina svih korištenih biljnih ekstrakata (ružmarin, matičnjak, lavanda, mravinac i vrisak) u omjeru 1:1:1:1:1.

Rezultati određivanja parametara oksidacije u kozicama koje su marinirane uz dodatak mješavine ekstrakata prikazane su na slici 12.



**Slika 12.** Grafički prikaz određene TBARS vrijednosti u uzorku kozica nakon mariniranja uz dodatak mješavina ekstrakta

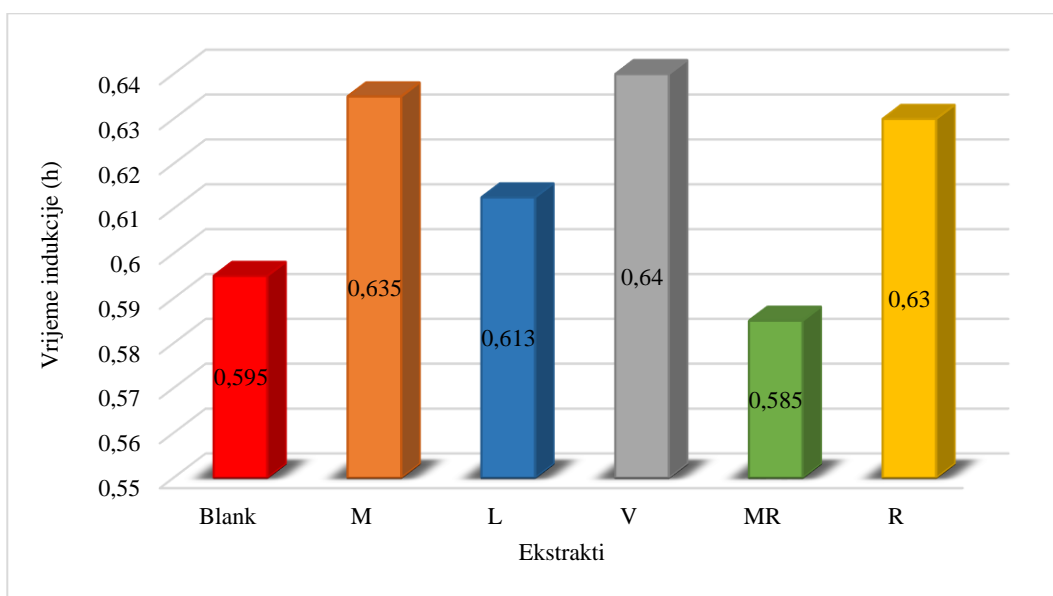
Dobiveni rezultati za testirane mješavine ekstrakata TBARS metodom su bolji nego li su oni dobiveni primjenom čistih ekstrakata. TBARS vrijednosti su se kretale od 1,23 µmol MDA/100 g kod mješavine M6 do 1,43 µmol MDA/100 g kod mješavine M3. Najniži rezultat TBARS vrijednosti u ovom istraživanju je upravo rezultat u slučaju primjene mješavine M6 odnosno smjese ekstrakta svih pet istraživanih biljaka međusobno pomiješanih u omjeru 1:1:1:1:1.

### 3.2. Rancimat metoda

Rancimat metoda je tipična konduktometrijska metoda za određivanje oksidacijske stabilnosti masti i ulja kod koje na temelju porasta provodljivosti destilirane vode koja apsorbira produkte oksidacije se očitava indukcijski period, odnosno vrijeme stabilnosti uzorka ulja (30). Iz prikaza rezultata koji su vidljivi na slici 13 i 14 jasno se vidi da svi uzorci koji imaju indukcijsko vrijeme dulje od onog kojeg je pokazalo samo riblje ulje imaju produljenu oksidacijsku stabilnost, odnosno dodatak ekstrakta je imao pozitivan učinak i spriječena je oksidacija ulja.

Kod svih uzoraka kod kojih je dobiveno kraće vrijeme stabilnosti može se zaključiti da je dodatak ekstrakata imao negativan, odnosno mogući prooksidativni učinak.

Od pojedinačnih biljnih ekstrakata, usporedno sa stupcem čistog ribljeg ulja kojem pod uvjetima od 100°C i protokom zraka 20 L/h induksijski period prosječno traje 0,595 h, vidljivo je da je ekstrakt vriska najviše produžio oksidacijsku stabilnost ribljeg ulja (0,64 h). Ekstrakti matičnjaka i ružmarina pokazuju slične vrijednosti induksijskog perioda od 0,635 i 0,630 h, ekstrakt lavande je imao vrlo mali učinak na stabilnost ribljeg ulja (0,613 h), dok je vrijeme indukcije uzorka s ekstraktom mravinca nešto niže od uzorka čistog ribljeg ulja (0,585 h), što znači da je ekstrakt mravinca u ovom slučaju imao mogući prooksidativni učinak.

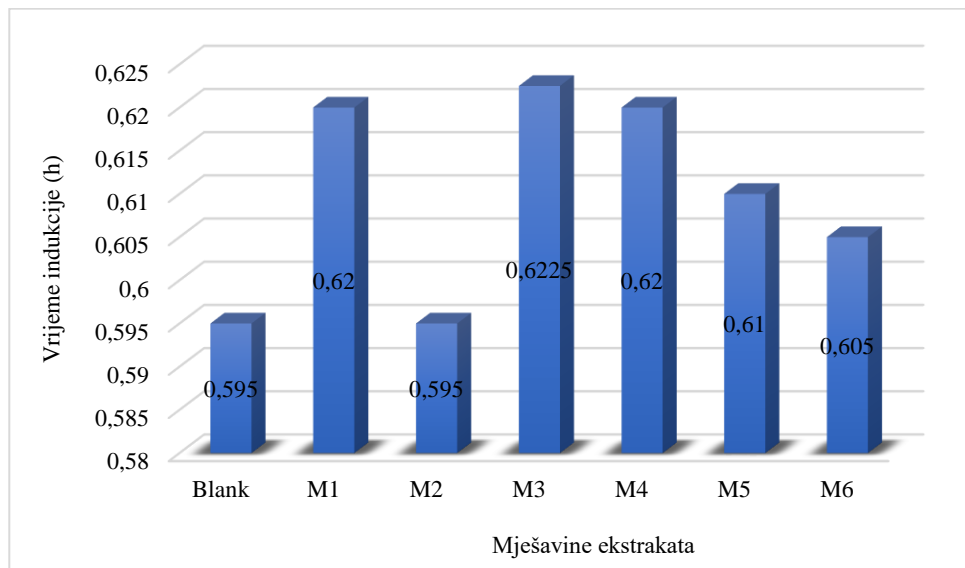


\* M- matičnjak, L- lavanda, V- vrisak, MR- mravinac, R- ružmarin

**Slika 13.** Usporedni prikaz oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja (blank) i ulja s dodanim biljnim ekstraktima

Na slici 14. vidljivi su rezultati oksidacijske stabilnosti ulja za mješavine biljnih ekstrakata. M2 mješavina koja sadrži ekstrakte ružmarina, lavande i vriska nije značajno utjecala na produženje oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja jer je induksijsko vrijeme bilo jednako onom čistog ulja (0,595 h). Mješavina ružmarina, mravinca i lavande (M1) te

mješavina ružmarina i lavande bez mravinca (M4) pokazale su vrijeme oksidacijske stabilnosti ulja od 0,62 h. Mješavina ružmarina, mravinca i lavande (M5) pokazala je nešto slabije djelovanje (0,61 h) prema čemu možemo zaključiti da na oksidacijsku stabilnost ulja znatno utječe sadržaj ekstrakta ružmarina. M6 predstavlja mješavinu svih testiranih biljnih ekstrakata u jednakim omjerima i ona je, iako s neznatnom razlikom, pokazala dulje vrijeme indukcije usporedno s čistim ribljim uljem. Mješavina ružmarina i lavande (M3) pokazala je najbolje antioksidacijsko djelovanje (indukcijsko vrijeme 0,6225 h), no ipak nije nadmašila vrijeme indukcije koje je rezultat primjene samog ekstrakta vriska.



**Slika 14.** Usporedni prikaz oksidacijske stabilnosti ribljeg ulja (blank) i ulja s dodanim mješavinama biljnih ekstrakata



## 4. ZAKLJUČAK

Iz rezultata dobivenih ovim istraživanjem mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Za TBARS metodu:

- primjena biljnih ekstrakata ima pozitivan učinak na stupanj oksidacije mariniranih kozica,
- TBARS vrijednosti su obrnuto proporcionalne volumenu dodanog ekstrakta,
- od individualnih ekstrakata najbolji učinak imao je mravinac,
- sve mješavine su pokazale bolji učinak od primjene pojedinačnih ekstrakata,
- od testiranih mješavina najboljom se pokazala M6 (sve ekstrakti u omjeru 1:1:1:1:1).

Za rancimat metodu:

- primjena svih ekstrakata osim ekstrakta mravinca produljuje oksidacijsku stabilnost ribljeg ulja,
- od testiranih mješavina ekstrakata sve su, osim M2, pokazale mogući oksidativni učinak tj. imale su pozitivno djelovanje na produljenje oksidacijske stabilnosti

Iz prikazanih rezultata i zaključaka vidljivo je da učinak primjene ekstrakata u svrhu sprječavanja oksidacijskih procesa u različitim proizvodima ribarstva je različit što najbolje potvrđuje izrazito dobra aktivnost mravinca u uzorcima mariniranih kozica te moguća prooksidacijska aktivnost u uzorcima ulja. Navedeno zapravo onemogućuje donošenje generalnog zaključka obzirom da isti ovisi o vrsti proizvoda, vrsti ekstrakta, dodanoj količini (volumenu, koncentraciji) načinu njegove pripreme, primijenjenoj metodi koja je korištena kod analiza, ali i o brojnim drugim parametrima.

## 5. LITERATURA

1. Hamilton R, Rice R. Fish oil technology, nutrition and marketing. PJ Barnes & Associates. Cambridge. UK. 1995.
2. Gruger E. Fatty acid composition of fish oils. US Dept of the interior fish and wildlife service. USA. 1967.
3. Food sources of omega-3 fats, Dietitians of Canada; CNF. Canada. 2015.  
<https://www.dietitians.ca/getattachment/de95e92c-3fb3-40db-b457-173de89bdc3a/FACTSHEET-Food-Sources-of-Omega-3-Fats.pdf.aspx>  
(pristupljeno: 18.07.2018.)
4. [https://articles.extension.org/sites/default/files/w/a/a7/Common\\_omega-3\\_polyunsaturated\\_acids.jpg](https://articles.extension.org/sites/default/files/w/a/a7/Common_omega-3_polyunsaturated_acids.jpg) (pristupljeno: 18.07.2018.)
5. Cvrla Ž, Kozačinski L. Kemijski sastav mesa ribe. Meso. 2006;8(6),365-370.
6. <https://yourmedikart.com/organic-herbs-oils/10-jaw-dropping-fish-oil-benefits-uses/> (pristupljeno: 18.07.2018.)
7. Generalić-Mekinić I, Lipidi, Nerecenzirani materijali za predavanje kolegija Kemija hrane, Kemijsko-tehnološki fakultet Split. Sveučilište u Splitu. 2018.
8. Bender D. Omega-3 masne kiseline-svojstva i djelovanje. Dijetetika. 2011;17(92/93),234-240.
9. Sofilić T. Ekotoksikologija- skripta. Metalurški fakultet Sisak. Sveučilište u Zagrebu. 2015.
10. Šimat V, Maršić-Lučić J, Bogdanović T, Dokoza M. Oksidacija masti u ribi i ribljim proizvodima. Meso. 2009;11(6),344-351.
11. Riediger N. A systematic review of the roles of n-3 fatty acids in the health and disease. ADA. USA. 2009;109(4),668-679.
12. Čorbo S. Tehnologija masti i ulja. Sveučilišni udžbenik, Agronomsko-prehrambeno tehnološki fakultet u Sarajevu. 2008.
13. Mokrovičak Ž, Rade D, Štrucelj D. Priručnik za vježbe iz kemije i tehnologije lipida. Durieux. Zagreb, 2002; ISBN: 953-188-117-0.
14. Oštrić-Matijašević B, Vidmar-Andrejašić L. Autooksidacija lipida. Savjetovanje tehnologije industrije ulja. Beograd, 1989.

15. Shahidi F. Handbook of Antioxidants for Food Preservation. Woodhead Publishing, Canada, 2015; ISBN-10: 1782420894.
16. Martin-Polvillo M, Marquez-Ruiz G, Dobarganes M. Oxidative stability of sunflower oils differing in unsaturation degree during long-term storage at room temperature. JAOCS. 2004;81(6)577-583.
17. Labuza T, Dugan L. Kinetics of Lipid Oxidation in Foods. Crit Rev Food Tech. 1971;2(3),355-405.
18. Min D, Smouse T. Flavor chemistry of food and oils, AOCS. USA. 1985; ISBN-10: 0935315128.
19. Weiss T. Food oils and their uses, AVI. UK. 1970; ISBN-10: 0870550934
20. Koprivnjak O. Djevičansko maslinovo ulje- od masline do stola. MIH. 2006; ISBN-10: 953-95365-2-9
21. Sadadinović J, Mičević S, Đonlagić N, Topčagić R, Berbić Z. Praćenje oksidacione stabilnosti masti maslaca i kravljeg masla diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC). Mljekarstvo. 2005;55(3)235-243.
22. Przybilski R. Understanding and measuring the shelf-life of food. Woodhead. USA. 2004; ISBN: 9781855737327.
23. Yanishlieva N, Marinova E. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. Eur J Lipid Sci Tech. 2015;103(11),752-767.
24. Kheradmandi M, Ataye E, Esmaelzadeh Kenari R, Takami S. The antioxidant effect of Mentha pulegium extracts on the stability of canola oil during storage conditions. J Appl Environ Biol Sci. 2015;4(11),112-117.
25. Shahidi F, Zhong Y. Antioxidants: regulatory status. Wiley. USA. 2005. ISBN: 9780471384601.
26. Subhashinee W, Amarowicz R, Shahidi F. Activity of Almonds and Their By-products in Food Model Systems. JAOCS. 2006;83(3),223-230.
27. <https://www.generon.co.uk/other-products-186/malondialdehyde-mda-tbars-assay-443000044.html> (pristupljeno: 12.09.2018.)
28. Vyncke W. 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. Fette Seifen Austrichmittel. 1970;72(12),1084–1087.
29. Lemon DW. 1975. An improved TBA test for rancidity. Fisheries and Oceans, New Series Circular. 1975;(51),1–4

30. Rancimat 743 Metrohm. Ion analysis, Metrohm AG, CH-9101 Herisau, Switzerland. Manual 8.743.8003EN.2009.