

# Kvalitativne promjene IQF smrznute jadranske srdele ulovljene u zimskom razdoblju

---

Škafec, Jakov

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zadar / Sveučilište u Zadru**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:162:211790>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**



**Sveučilište u Zadru**  
Universitas Studiorum  
Jadertina | 1396 | 2002 |

Repository / Repozitorij:

[University of Zadar Institutional Repository](#)



Sveučilište u Zadru

Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu  
Diplomski sveučilišni studij održivo upravljanje vodenim ekosustavima

**Jakov Škafec**

**Kvalitativne promjene IQF smrznute jadranske  
srdele ulovljene u zimskom razdoblju**

**Diplomski rad**

Zadar, 2022.

Sveučilište u Zadru

Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu  
Diplomski sveučilišni studij održivo upravljanje vodenim ekosustavima

**Kvalitativne promjene IQF smrznute jadranske srdele ulovljene u zimskom razdoblju**

Diplomski rad

Student/ica:

Jakov Škafec

Mentor/ica:

Izv.prof.dr.sc. Bosiljka Mustać

Komentor/ica:

Doc.dr.sc. Lav Bavčević

Zadar, 2022.



## Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, **Jakov Škafec**, ovime izjavljujem da je moj **diplomski** rad pod naslovom **Kvalitativne promjene IQF smrznute jadranske srdele ulovljene u zimskom razdoblju** rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio mojega rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši bilo čija autorska prava.

Izjavljujem da ni jedan dio ovoga rada nije iskorišten u kojem drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi.

Sadržaj mojega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Zadar, 11. rujna 2022.

## *Zahvala*

*Zahvaljujem se mentorici izv.prof.dr.sc. Bosiljki Mustać na velikoj pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada te komentoru doc.dr.sc. Lavu Bavčeviću na stručnim savjetima prilikom izrade i analize statističkog djela istraživanja. Također, želio bih zahvaliti dr.sc. Bruni Petani za korisne savjete i usmjeravanje u izradi rada.*

*Zahvaljujem se Zavodu za javno zdravstvo grada Zadra (služba za zdravstvenu ekologiju i zaštitu prirode) koji je napravio kemijsku i mikrobiološku analizu uzoraka. Nadalje, zahvalio bih se i Veterinarskom zavodu u Splitu koji je u svom laboratoriju za analitičku kemiju i rezidue te laboratoriju za analitičku kemiju proveo drugi dio analize za ovo istraživanje.*

*Zahvaljujem se Ribarskoj zadruzi Omega 3 koja je prikupila ribu potrebnu za istraživanje.*

*Zahvaljujem se odjelu za ekologiju, agronomiju i akvakulturu što su mi ustupili korištenje laboratorija „Sfinga“ u istraživačke svrhe.*

*Zahvaljujem se obitelji na puno strpljenja i na podršci kako psihičkoj tako i financijskoj tijekom mog dugogodišnjeg studija.*

*Velika zahvala djevojci koja je bila podrška kroz sve teške trenutke u izradi rada.*

*Hvala i svim prijateljima koji su mi studentske dane učinili posebnim.*

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	3
2.1. Kemijske karakteristike ribe.....	3
2.2. Važnost srdele u prehrambenoj industriji.....	5
2.2.1. Sezonske promjene kemijskog sastava kod srdele.....	7
2.3. Post-mortem promjene i proces kvarenja.....	7
2.3.1. Autolitičke promjene.....	9
2.3.2. Mikrobiološke promjene .....	11
2.3.3. Stvaranje histamina .....	13
2.3.4. Oksidacija lipida .....	15
2.4. HACCP.....	17
2.4.1. Principi u HACCP-u .....	18
2.5. Tehnologije konzervacije sitne plave ribe.....	19
2.5.1. IQF tehnologija smrzavanja.....	20
3. CILJEVI I SVRHA RADA.....	23
4. MATERIJALI I METODE .....	24
4.1. Uzorkovanje ribe .....	24
4.2. Metodologija prilikom analize uzorka .....	27
4.3. Priprema i postupanje s uzorcima .....	28
5. REZULTATI.....	29
5.1. Biometrija.....	29
5.2. Mikrobiološka analiza svježih uzoraka .....	29
5.3. Kemijska analiza svježe i smrznute ribe .....	32
5.4. Oksidativni procesi.....	39
6. RASPRAVA .....	44

7. ZAKLJUČAK .....	50
8. POPIS LITERATURE .....	51

# **Kvalitativne promjene IQF smrznute jadranske srdele ulovljene u zimskom razdoblju**

## **Sažetak**

Ribljí proizvodi predstavljaju izuzetno važan segment u ljudskoj prehrani, što se očituje u razvoju riblje industrije koja pruža konzumentima širok spektar ribljih proizvoda. Kroz posljednjih nekoliko desetljeća ova prehrambena industrija doživjela je procvat prvenstveno u tehnološkom smislu što je vidljivo kroz razne nove tehnologije obrade ribe. Smrzavanje podrazumijeva složen postupak koji ukoliko se ne obavi pravilno pridonosi rapidnom propadanju hrane. Pravilno smrzavanje pospešuje očuvanje kvalitete ribe odnosno njenih nutritivnih vrijednosti. Kvaliteta ribe također ovisi o postupanju prije same procedure smrzavanja, kao i načinu skladištenja finalnog proizvoda. U ovom radu napravljena je komparacija kvalitativnih promjena za svježú srdelu skladištenu na temperaturi od 0 do 3°C i srdelu smrznutu IQF tehnologijom. Promjena kvalitativnih parametara se temeljila na promjeni kemijskih parametra poput promjene u mastima, bjelančevinama i vodi. Drugi dio rada bazirao se na mikrobiologiju, gdje je analiziran broj kolonija sulfitreducirajućih klostridija, *Enterobacteriaceae* i aerobnih mezofilnih bakterija. Nadalje, kako bi se utvrdila ispravnost same namirnice utvrđen je i stupanj oksidacije lipida pomoću tiobarbiturnog testa i peroksidnog broja. Također je napravljen i test kako bi se utvrdila količina histamina koja je potencijalno opasna za ljudsko zdravlje. Statistička obrada kemijskih i mikrobioloških parametara nije pokazala signifikantne promjene između svježeg uzorka i smrznutog uzorka srdele. Osim toga analizom tiobarbiturnog testa za svježú srdelu dokazana je značajna razlika malondialdehida u vremenskom periodu što implicira na određeni stupanj oksidacije lipida. Međutim, tiobarbiturnim testom za smrznutu srdelu nije ustanovljena signifikantna promjena malondialdehida što upućuje da ne postoji oksidacija lipida u uzorku srdele smrznute IQF tehnologijom. Peroksidni broj u svježim i smrznutim uzorcima ribe nije ukazao na značajnu razliku. Također, količina histamina u svježoj i u smrznutoj srdeli nije prikazala signifikantnu promjenu.

**Ključne riječi:** Ribljí proizvodi, prehrambena industrija, kvaliteta ribe, IQF tehnologija smrzavanja, mikrobiološki sastav, kemijski sastav, oksidacija lipida



# Qualitative changes in IQF frozen Adriatic sardines caught trough winter period

## Abstract

Fish products represent an extremely important segment in the human diet, which is reflected in the development of the fish industry. Therefore providing consumers with a wide range of fish products. Over the last few decades, this food industry has flourished primarily in terms of technology, which is evident through various new fish processing technologies. Freezing is a complex process that, if not done properly, contributes to the rapid deterioration of food. Proper process helps with preservation of the quality of fish and its nutritional values. The quality of the fish also depends on the treatment before the freezing procedure itself, as well as the method of storage. In this paper, a comparison of qualitative changes was made for fresh sardine stored at a temperature of 0 to 3°C and sardine frozen with IQF technology. The change in qualitative parameters was based on a change in chemical parameters such as a change in fats, proteins and water. The second part of the paper was based on microbiology, where the number of colonies of sulfite-reducing clostridia, *Enterobacteriaceae* and aerobic mesophilic bacteria was analyzed. Furthermore, in order to determine the correctness of the food itself, the degree of lipid oxidation was determined using the thiobarbiturate test and the peroxide number. A test was also made to determine the amount of histamine that is potentially dangerous to human health. Statistical analysis of chemical and microbiological parameters did not show significant changes between the fresh sample and the frozen sample of sardine. In addition, the analysis of the thiobarbiturate test for fresh sardines proved a significant difference in the number of malondialdehyde over time, which implies a certain degree of lipid oxidation. However, the thiobarbiturate test for frozen sardine did not reveal a significant change in the number of malondialdehyde, which indicates that there is no lipid oxidation in the sample of sardine frozen by IQF technology. Peroxide number in fresh and frozen fish samples showed no significant difference. Also, the amount of histamine in fresh and frozen sardines did not show a significant change.

**Key words:** Fish products, food industry, fish quality, IQF freezing technology, microbiological composition, chemical composition, lipid oxidation

## 1. UVOD

FAO (engl. Food and Agriculture Organization of the United Nation) definira ribarstvo kao ulov i uzgoj akvatičnih (vodenih) organizama što znači da ribarstvo obuhvaća čitav niz aktivnosti koje su povezane s iskorištavanjem živih organizama u moru i kopnenim vodama diljem svijeta (FAO, 2014). Jurisdikciju nad ribarstvom u Republici Hrvatskoj ima Ministarstvo poljoprivrede te ga dijeli u dvije kategorije, a to su: gospodarski i negospodarski ribolov (Par et al., 2006; Kanski, 2019). Ribarstvo u Republici Hrvatskoj predstavlja veoma važan izvor prihoda, a također treba naglasiti i važnost ribarstva u prehrambenoj industriji. Evidentno je da se radi o kompleksnoj grani poljoprivrede te obuhvaća širok spektar djelatnosti s naglaskom na iskorištavanje faune podmorja (Kanski, 2019).

Najbolji pokazatelj ekonomske važnosti ribarstva jest BDP odnosno bruto domaći proizvod koji u Republici Hrvatskoj varira od 0,2% pa do 0,7%. Iako ovaj postotak ne izgleda relevantan treba naglasiti da niti jedna država, izuzevši Island, ne dobiva više od 1% bruto domaćeg proizvoda iz ribarstva. Nadalje, važnost ovog sektora vidljiva je i u broju zaposlenih koji se odnosi na više segmenata (npr. na ulov, uzgoj i preradu ribe) (Vrgoč, 2012).

Riba i riblji proizvodi od značajne su važnosti za priobalne gradove Republike Hrvatske, postoje razni statuti u kojima se spominje ova vrijedna prehrambena namirnica. Statuti gradova poput Splita, Rijeke ili Dubrovnika spominju razne metode prerade ribe gdje je veliki naglasak na konzervacijskim tehnikama poput sušenja i soljenja. Osim ekonomske važnosti, riba daje i brojne blagodati za ljudsko zdravlje, poput bjelančevina i masti (Cvrtila & Kozračinski, 2006; Jović et al., 2010).

Srdela (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792.) (Slika 1.) pripada porodici Clupeidae te se smatra jednom od ekonomski najvažnijih vrsta Jadranskog mora. Zadržava se u zoni pelagijala te spada u migratorne vrste. Dubina na kojoj se može pronaći varira između 25-55 metara danju, ali noću se ova niša smanjuje na 15-35 metara dubine. Spolnu zrelost postiže u prvog godini života, a iznad 14 centimetara duljine sve jedinke postaju spolno zrele. Mrijest srdele odvija se na 20 do 25 metara dubine, a vremenski period je ovisan o području obitavanja, a u Jadranu se odvija od jeseni te do kraja zime (Jardas, 1996; Fishbase, 2022). Srdela se svrstava u migratorne vrste, a upravo je mrijest uz prehranu jedan od razloga masovne migracije. Nadalje, jato se u sezoni mrijesta kreće prema otvorenom moru, a nakon mrijesta srdela se vraća u obalne vode (Mustać & Sinovčić, 2010).



Slika 1. Srdela (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1972.) (Louro et al., 2019)

Srdela je kao prehrambeni proizvod sklona brzom kvarenju. Samo kvarenje se najbolje očituje u oksidaciji lipida, a razlog tome je postotak masti koji varira ovisno o vremenskom razdoblju. Kako bi se spriječilo kvarenje odnosno konzervirala riba, veliki se naponi ulažu u razne tehnike konzervacije. Jedna od tih tehnika je IQF tehnologija brzog smrzavanja. IQF (Individual Quick Freezing) je tehnologija koja koristi hladnu zračnu masu ili rjeđe tekući dušik da bi pojedinačno zamrzнула proizvod. Cilj zamrzavanja je očuvanje kvalitete proizvoda te sprječavanje mikrobiološke aktivnosti (Šoša, 1989; Bremner, 2002). Poboľšanjem tehnologije dolazi i do strožih kontrola kvalitativnih parametara. Ove kontrole predviđene su kako bi se utvrdila moguća degradacija u kvaliteti same namirnice koja može potencijalno biti opasna po ljudsko zdravlje. Kvalitativni parametri uključuju promjene u količini i strukturi proteina, masti, ugljikohidrata, vode, ali i oksidacijske promjene te razinu histamina (Aubourg et al., 1998).

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Kemijske karakteristike ribe

Bjelančevine koje pronalazimo u ribljem mesu donekle se razlikuju od onih u životinjskome (Marošević, 1982). Postotak proteina u ribi može varirati ovisno o vrsti te se kreće između 12% i 24%, dok za srdelu Šoša (1989) navodi vrijednost od 15 do 17% (Tablica 1.). Bjelančevine koje se nalaze u ribi osobito su vrijedne zbog brze probavljivosti koja traje 2 do 3 sata u prosjeku te je iskoristivost 93-98 %. Također, postoje i brojne druge beneficije poput sastava aminokiselina osobito esencijalnih od kojih su najvažnije metionin, lizin, triptofan, arginin i histidin. Bjelančevine koje pronalazimo u ribama dijele se u 3 različite skupine, a to su: strukturalne, sarkoplazmatske i vezivno-tkivne. Prva skupina odnosno strukturalne bjelančevine tvore najveću skupinu te one čine 70-80%, kod sisavaca je ta brojka nešto manja i iznosi 40%. Zatim, druge po redu su sarkoplazmatske bjelančevine poput mioalbumina, globulina te enzima čiji udio iznosi između 25% i 30%. Nadalje, zadnju skupinu čine vezivno-tkivne bjelančevine, gdje ubrajamo kolagen koji je u ribama zastupljen oko 3% dok u drugim razredima, poput sisavaca, ova skupina može sačinjavati i do 17% (Huss, 1995).

Tablica 1. Kemijski sastav morskih riba (Šoša, 1989)

hranjive tvari / nutrient compounds	Voda, % / Water, %	Mast, % / Fat, %	Bjelančevine, % / Proteins, %
Bakalar / Cod	79,8-85,1	0,1-0,9	13,4-19,0
List / Sole	78,9-80,8	0,5-3,8	15,7-18,4
Iverak / Flounder	75,4-79,0	0,5-9,6	18,0-18,8
Inćun / Anchovy	69,9-80,8	0,7-14,5	16,2-19,4
Srdela / Sardine	66,8-78,1	0,9-17,2	15,4-17,6
Cipal / Mullet	76,3	1,4	21,1
Ugor / Sea eel	60,0	8,0-13,0	14,4
Palamida / Pelamid	63,5	11,3	23,9
Tuna / Tuna	59,0-72,0	4,0-16,0	21,0-27,0

Kada govorimo o aminokiselinskom sastavu mesa ribe valja naglasiti da ne postoji signifikantna razlika ako se uspoređuje sa sastavom mesa kopnenih životinja, ali razlika se može uočiti u raznim fizikalnim svojstvima. Primjerice izoelektrična točka u strukturnim bjelančevinama ribe gdje pH varira između 4,5 i 5,5. Također, treba naglasiti i kolagen koji je kod ribe termolabilan i sadrži veći broj labilnih unakrsnih veza. Svježe meso ribe sadrži i relativno malu koncentraciju neproteinskog dušika te se on nalazi u kemijskim spojevima poput amonijaka, uree i trimetilamina, ali i ova manja koncentracija naveliko utječe na neka svojstva ribe poput mirisa i okusa. Skladištenje i/ili zrenje ribe najviše doprinosi naglom rastu koncentracije ovih spojeva te je veoma važno pravilno rukovanje ribom (Huss, 1995; Bogut et al., 1996).

Riblje meso sadrži relativno puno vode, usporedno s mesom endotermnih životinja te se količina procjenjuje na 60-80% (Tablica 1.). Voda u ribi se nalazi u dvije kategorije, prva je slobodna voda, a druga vezana voda. Razlika leži u tome da slobodna voda ima ulogu otapala, primarno mineralnih tvari i ponekih bjelančevina koje su topive, a vezana voda ima drugačija svojstva, svojstva koja su generalno vezana uz meso primjerice okus mesa, konzistencija mesa te elastičnost (Cvrtila & Kozačinski, 2006).

Kemijski gledano masti su tvari građene od kombinacije triglicerida i viših masnih kiselina. Količina masti u ribljem mesu veoma je varijabilna te se upravo zbog toga ribe po količini masti dijele na tri kategorije. Prva kategorija obuhvaća nemasne ribe odnosno ribe čiji postotak masti ne prelazi 3 %. U drugoj kategoriji uvrštavaju se srednje masne ribe čiji postotak masti varira od 3 % do 8 % i treća kategorija u koju se svrstavaju ribe čiji postotak masti nadilazi 8 %. Masti koje se nalaze u ribljem mesu podosta se razlikuju od onih u endotermnim životinjama, naime većina ribljih masti sastoji se od dugačkih lanaca koji sadrže od 14 do 22 C atoma. Nezasićene masne kiseline generalno tvore veći dio masti ribe, kod morske ribe ova brojka seže sve do 88 % visoko nezasićenih masnih kiselina povezanih s 5 ili 6 dvostrukih veza. Upravo zbog toga je riblje meso sklonije kvarenju i procesu oksidacije. Riba se također može podijeliti prema mjestu pohrane masti na plavu i bijelu ribu, gdje plava riba kao skladište masti koristi stanice koje se nalaze po cijelom tijelu dok bijela pohranjuje masne zalihe u jetru te nešto i u trbušnu šupljinu (Ackman & Mcleod, 1988).

Od svih mikrokonstituenata ugljikohidrati ili saharidi u mesu ribe tvore najmanji postotak, odnosno variraju između 0,5 i 0,8 %. Ugljikohidrati kroz životni ciklus ribe imaju nutritivnu ulogu te se smatra da dobro hranjena riba koja ne podliježe stresu ima veću količinu glikogena. Nedostatna količina glikogena također utječe na pH ribljeg mesa koji biva blago

kiseo te upravo ovo pridonosi bržem kvarenju same namirnice (Cvrtila & Kozačinski, 2006; Petricorena, 2015).

## **2.2. Važnost srdele u prehrambenoj industriji**

Ribarstvo predstavlja jednu od najznačajnijih prehrambenih grana. Riblji proizvodi prepoznatljivi su kao nutritivno vrijedni te je zbog toga poželjno maksimalno sačuvati pojedina svojstva odnosno spriječiti moguće kvarenje. U Jadranskom moru srdela se smatra jednom od ekonomski i nutritivno najvrjednijih proizvoda, osim blagodati koje pruža ljudskom zdravlju nezamjenjivi je dio ekosustava. U Republici Hrvatskoj osobito priobalnim regijama srdela se smatra kraljicom mora te je od davnina zadužena za prehranjivanje poglavito otočke populacije (Riba Hrvatske, 2021).

Blagodati koji srdela pruža u nutritivnom smislu su brojne, ova činjenica postala je evidentna u današnje vrijeme kad se riba i riblji proizvodi promoviraju kao zdrava hrana. Nutritivna važnost srdele leži u esencijalnim masnim kiselinama koje obiluju polinezasićenim masnim kiselinama (PUFA). Uz masne kiseline veliku ulogu imaju i esencijalne aminokiseline (AA) koji se odlikuju lakom probavljivošću, a potrebni su za balansiranu prehranu. Zadnji segment pripada vitaminima i mineralima koje pronalazimo u srdeli. Upravo ovi makrokonstituenti i mikrokonstituenti pospješuju kognitivno i fizičko zdravlje organizma (Bell et al., 1986).

Primjerice, srdela i njeni proizvodi obiluju omega-3 masnim kiselinama koje reduciraju kardiovaskularne probleme uključujući i srčani udar kod odraslih individua. Nadalje, istraživanja impliciraju na brojne beneficije prilikom kognitivnog razvitka dojenčadi i mlađe populacije. Također, srdela kao visokoproteinska namirnica osigurava izvanredan omjer danog proteina u odnosu na kilokalorije koje su unesene i time osigurava uravnoteženu prehranu uz dobar energetski unos. Srdela obiluje esencijalnim masnim kiselinama. Najpoznatija esencijalna masna kiselina u srdeli je omega-3 masna kiselina. U ovu skupinu ubrajamo 11 različitih vrsta masnih kiselina, međutim za srdelu su tipične dvije: eikozapentaenska kiselina (EPA) i dokozaheksaenska kiselina (DHA), ostalih 9 masnih kiselina generalno se prepisuju biljnom podrijetlu (Tablica 2.). EPA (eikozapentaenska kiselina) i DHA (dokozaheksaenska kiselina) pospješuju određene tjelesne funkcije, ali koriste se i kao prevencija za razne bolesti. Primjerice EPA reducira simptome depresije te je veoma bitna u prevenciji upala. Dokozaheksaensku kiselinu pronalazimo u koži i mrežnici, a uloga je strukturalna. Dodatna konzumacija pospješuje vid dojenčadi te poboljšava kognitivne procese. Nedostatak

dokozahexaenske kiseline indicira na poremećaje poput ADHD, razne poteškoće u učenju te je čak povezano s pojavom Alzheimerove bolesti (Johnson, 1991; Gómez-Pinilla, 2008; Šimat et al., 2020).

Tablica 2. Kompozicija masnih kiselina u srdeli (BelHadj et al., 2016)

Acid group		Fatty acid	Chemical formula	% in non-oxidized oil	Retention time (min)
Polyunsaturated fatty acids (PUFAs)	Omega 3	DHA	C22:6	25.09	29.597
		EPA	C20:5	19.61	23.995
		ALA ( $\alpha$ -Linolenic acid)	C18:3	1.99	24.573
	Omega 6	Arachidonic acid	C20:4	0.63	23.497
		5, 8, 11 Eicosatrienoic acid	C20:5	0.38	24.310
	Omega 9	8,11 Octadecadienoic acid	C18:2	0.7	15.675
Monounsaturated fatty acids		Nervonic acid	C24:1	0.86	35.822
		Palmitoleic acid	C16:1	1	9.885
		Oleic acid	C18:1	5.36	16.024
		cis-Vaccenic acid	C18:1	1.92	16.236
		13 Docosenoic acid	C22:1	1.39	31.124
Saturated fatty acids		Capric acid	C10:0	0.13	3.899
		Myristic acid	C14:0	0.22	6.983
		Pentadecanoic acid	C15:0	0.02	8.362
		Palmitic acid	C16:0	1.64	10.325
		Stearic acid	C18:0	2.02	17.163
		Arachidic acid	C20:0	0.58	26.141
		Docosanoic acid	C22:0	0.35	31.886

DHA: docosahexaenoic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; ALA:  $\alpha$ -linolenic acid.

Količina mikroelemenata poput vitamina i minerala također ide u prilog srdeli kao zdravoj namirnici. Naime, u srdeli pronalazimo vitamin B u većim količinama koji pomaže pretvorbi energije kako bi kardiovaskularni sustav i mišići bolje funkcionirali. Nedostatak vitamina B koji se osobito javlja kod ljudi koji ne konzumiraju meso rezultira umorom, gubitkom apetita te u ekstremnijim situacijama oštećenjem živaca. Vitamin D se isto tako može pronaći u ovoj namirnici u većim količinama, on pospješuje imunološki sustav, ali pomaže i kod pojave raznih autoimunih bolesti. Od minerala srdela pretežito sadržava fosfor, kalcij, magnezij i kalij. Ovi minerali obnavljaju i pospješuju gustoću stanica kostiju te na taj način služe u prevenciji bolesti poput osteoporoze (Tilami & Sampels, 2018; Šimat et al., 2020)

### 2.2.1. Sezonske promjene kemijskog sastava kod srdele

Na udio lipida u tkivu sitne plave ribe ponajviše utječe reproduktivni ciklus. Cjelokupna količina lipida varira od 1,71 % pa sve do 16,10 % (w/w). U Jadranskom moru, srdela ima najveću količinu masti u ljetnom periodu (kolovoz), kad je u razdoblju spolnog mirovanja, a najniža koncentracija zabilježena je krajem zimskog perioda (veljača) kada se intenzivno mrijesti. Primijećena je obrnuto proporcionalna veza između količine vlage i postotka lipida; povećanjem udjela vlage (srednja vrijednost 74,03 %) drastično pada udio masti. Nadalje, treba naglasiti i da postoje dvije konstante kroz cijelu godinu, a to su postotak pepela i nutricionistički, a i komercijalno bitnija konstanta proteini. Na varijaciju postotka lipida često utječe više čimbenika (Marin et al., 2010; Šimat, 2020). Amenzoui et al. (2006) zabilježio je pad u hranjenju jata srdele u zimskom periodu, a kao glavna posljedica se navodi nedostatak zooplanktona. Dakle uz faktor hranjenja postoji i spolna reprodukcija srdele koja uvelike utječe na razinu masti, naime srdele troše zimi kad se mrijeste rezerve lipida koje su nagomilavale kroz proljetni i ljetni period (Amenzoui et al., 2006).

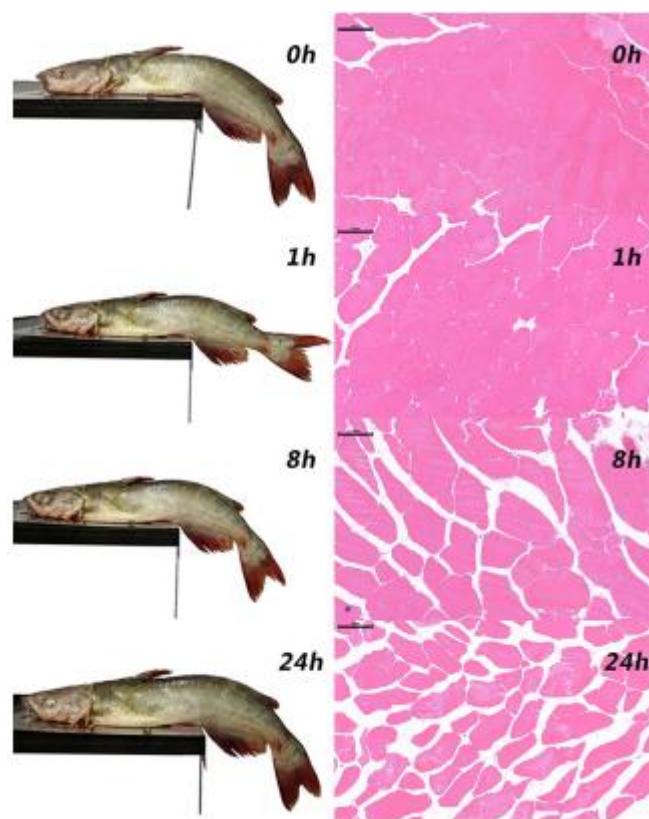
### 2.3. Post-mortem promjene i proces kvarenja

Termin konzervacija odnosno očuvanje hrane postaje sve popularniji u današnje doba, upravo zbog velikog pritiska brzorastuće populacije kao i potrebe za skladištenjem i transportom hrane (Ghali el al., 2010). Prezervacija se odnosi na očuvanje kvalitativnih svojstva hrane, ali i na produljenje roka trajanja. Kada govorimo o postocima pretpostavlja se da jedna trećina ukupno proizvedenog voća i povrća odlazi u otpad zbog kraćeg roka trajanja i nestručnog rukovanja hranom (Harvey, 1978; Kader, 2005). Nadalje, procjenjuje se da 10 posto svih žitarica propadne (ovaj broj odnosi se na države u razvoju). Osim gubitka hrane ovo je itekako veliki financijski udarac, naime Kanada godišnje gubi 984 miliona dolara samo na štetu izazvanu propadanjem žitarica (Ghali el al., 2010).

Prve postmortalne promjene perceptivne su prirode tj. odnose se na promjene koje se mogu senzorički determinirati kao što su: izgled proizvoda, miris, tekstura i naposljetku okus. Rigor mortis (mrtvačka ukočenost) je vizualno najdramatičnija promjena, a započinje odmah nakon uginuća jedinke. U početnoj fazi riblja muskulatura bude opuštena tj. elastične strukture, ali već nakon par sati (ovisno o faktorima poput: vrsti ribe, temperaturi, baratanju te o stanju



jedinke) riba gubi fleksibilnost te dolazi do ukočenosti svih mišića (Slika 2.). Pod uvjetima ekstremne temperature rigor mortis snažnije zahvaća ribu što može prouzrokovati slabljenje mišićnih vlakana tj. rupture u filetima. Temperatura koja ubrzava rigor mortis odnosi se na razlike ambijentalne temperature mora i one na kopnu, a povećanje razlike dovodi do brže i jače mrtvačke ukočenosti. Važno je naglasiti da i stanje ribe znatno utječe na brzinu nastupanja stanja, primjerice riba koja je osiromašena glikogenskom rezervom zbog manjka plijena u moru ili drugih nepovoljnih uvjeta brže podliježe ovim promjenama. Osim toga, stupanj stresa na ribu ima veliki utjecaj. Rigor mortis ima značajnu ulogu u preradi ribe, naime riba koja je podlegla ovoj promjeni daje filete daleko manje kvalitete. Nadalje, postotak mišićnih vlakana također opada pod utjecajem rigor mortisa (Slika 2.) (Azam et al., 1990; Abe & Okuma, 1991).



Slika 2. Rigor mortis; lijeva strana prikazuje fizički oblik ribe u vremenskom periodu od 24 sata, a desna strana prikazuje mišićna vlakna u periodu od 24 sata (Shi et al., 2020)

Kvalitativne promjene uključuju i senzoričke postmortalne promjene te se dijele po fazama. U prvoj fazi riba je svježija te je okus još postojan. Neke vrste mogu davati blago metalan okus. Ova faza obično traje od dva do tri dana nakon ulova. Drugu fazu karakterizira gubitak svojstvenog okusa i mirisa, odnosno meso postaje neutralno, ali još nije neugodan okus i tekstura mesa. U trećoj fazi primjetni su znakovi kvarenja poput neugodnih mirisa te pojava sluzi. Jačina mirisa i sekreta ovisi o vrsti ribe i načinu kvarenja (aerobno, anaerobno). Jedan od hlapljivijih spojeva koji se javlja u ovoj fazi je trimetilamin (TMA) koji nastaje bakterijskom redukcijom trimetilamin N-oksida (TMAO), upravo trimetilamin daje karakterističan "riblji" smrad. Okus ribe varira, u početku je blago kiselkast te je ovo specifično za masnu ribu. Kasnija faza daje ribi miris sumpora te tekstura mesa postaje mekana i vodenasta ili suha i žilava. U četvrtoj fazi riba se smatra pokvarenom (Huss, 1995; Gogus et al., 2006).

### 2.3.1. Autolitičke promjene

Proces kvarenja odvija se u tri različita oblika: prvi je kemijski, drugi pod utjecajem enzima, a treći se odnosi na mikrobiološku aktivnost. Gubitak od 25 posto svih proizvoda poljoprivrede i akvakulture prepisuje se kemijskom i mikrobiološkom kvarenju. Proces kvarenja se proučava godinama te je konstatirano da postoje minimalno dva tipa, bakterijski i pomoću enzima. Također, dokazano je da su procesi kvarenja međusobno neovisni dakle enzimske promjene neće utjecati na mikrobiološke, ali mogu međusobno korelirati. Autoliza podrazumijeva proces vlastite razgradnje (Huss, 1995).

U trenutku smrti snabdijevanje mišićne muskulature kisikom prestaje, razlog tome je da srce ne cirkulira krv kroz škrge gdje postaje obogaćena kisikom. Posljedično tome razgradnja hranjivih tvari biva uvelike smanjena. U normalnim uvjetima zaliha glikogena ili lipida se razgrađuje pomoću tkivnih enzima u nizu kemijskih reakcija što rezultira ugljičnim dioksidom, vodom i ATP-om (adenozin trifosfat). Ovaj tip respiracije odvija se u dva oblika: aerobni i anaerobni. Veći dio ihtiofaune proizvodi energiju pomoću glukoze nakon što srce prestane kucati, ovaj proces kao krajnje produkte daje mliječnu i pirogroždanu kiselinu. Nadalje, ATP nastaje u procesu glikolize, ali samo 2 mola po molu glukoze (anaerobno), dok za ovaj isti proces u aerobnim uvjetima te kad se odvija u mitohondrijima dobivamo 36 mola ATP-a za svaki mol glukoze. Nakon smrti organizam ne uspijeva u anaerobnim uvjetima održati minimalnu količinu ATP-a odnosno razina pada ispod 7-10 mol/g tkiva što uzrokuje rigor mortis. Nusprodukt koji se javlja u tkivima je laktat te snižava pH vrijednost, primjerice kod

bakalara ova vrijednost pada od 6,8 što je normalna vrijednost na 6,1. Vrstama poput skuše krajnji rigor mortis rezultira pH vrijednosti od 5,8, a tunama ponekad padne i na 5,4. Količina izlučene mliječne kiseline varira od vrste do vrste te primarno ovisi o zalihama ugljikohidrata u tkivima. Ribe generalno imaju manju zalihu od terestričkih sisavaca te se sama kiselina luči u daleko manjem obujmu (Bogut et al., 2016). Chiba et al. (1991) otkrili su da samo nekoliko minuta stresa prouzrokovanog lovom smanjuje pH za 0,5. Nadalje, isto istraživanje pokazalo je da krvarenje ribe uvelike smanjuje količinu mliječne kiseline u organizmu ribe. Važnost smanjenja pH vrijednosti leži u kvalitativnim promjenama organizma, naime redukcijom pH dolazi do smanjenja proteina odnosno djelomične denaturacije i gubitka vode. Ribe u stanju rigor mortisa reduciraju količinu vlage u mišićnom tkivu te se time sam proizvod ne može obraditi termički (daljnja denaturacija proteina) (Mukundan, 1986).

Kao što je već prije spomenuto mrtvačka ukočenost nastupa kad razina ATP-a padne ispod određene granice. Adenozin trifosfat ne služi samo kao izvor energije već i za skrućivanje mišićnog tkiva. Kontrola mišića odvija se pomoću kalcija i enzima ATP-aze. Padom koncentracije  $Ca^{+2}$  ispod  $1\mu M$  aktiviraju se ATP-aze te reduciraju slobodni ATP što rezultira interakcijom kontrakcijskih proteina aktina i miozina te posljedično tome zatezanje mišićnih vlakana odnosno skrućivanje. Drugi dio rigor mortisa “opuštanje” je proces koji još uvijek nije do kraja pojašnjen, ali uvijek rezultira relaksacijom mišićnih vlakana te se povezuje s aktivacijom nekoliko enzima (razgradnja određenih elemenata rigor mortisa). Prva evidentna promjena jest degradacija ATP-a. Razgradnjom adenozin trifosfata dobiva se adenozin difosfat (ADP), adenozin monofosfat (AMP), inosin monofosfat (IMP) i hipoksantin (HX). Način razgradnje je generalno jednaka za svu ihtiofaunu, dok brzina varira od vrste do vrste. Proučavanjem autolitičke promjene dobivena je formula za izračunavanje svježine ribe (Niu & Lee, 2000):

$$K\% = \frac{\{Ino\} + \{Hx\}}{\{ATP\} + \{ADP\} + \{AMP\} + \{IMP\} + \{Ino\} + \{Hx\}} \times 100$$

U ovoj formuli K predstavlja indeks svježine izražen u postocima te daje relativnu svježinu na temelju autolitičkih promjena u post-mortem fazi jedinke. Povećanje K vrijednosti predstavlja smanjenu svježinu ribe. Nadalje ova formula nije primjenjiva za sve vrste primjerice bakalar i lignje postižu maksimalnu K vrijednost jako brzo te iz tog razloga indeks svježine nije primjenjiv na svim akvatičkim organizmima (Niu & Lee, 2000). Nepravilno rukovanje također pospješuje autolizu. Produkti autolize omogućuju idealno okruženje za razvitak mikroorganizama te se time dodatno degradira kvaliteta ribe (Huss, 1995; Niu & Lee, 2000).

### 2.3.2. Mikrobiološke promjene

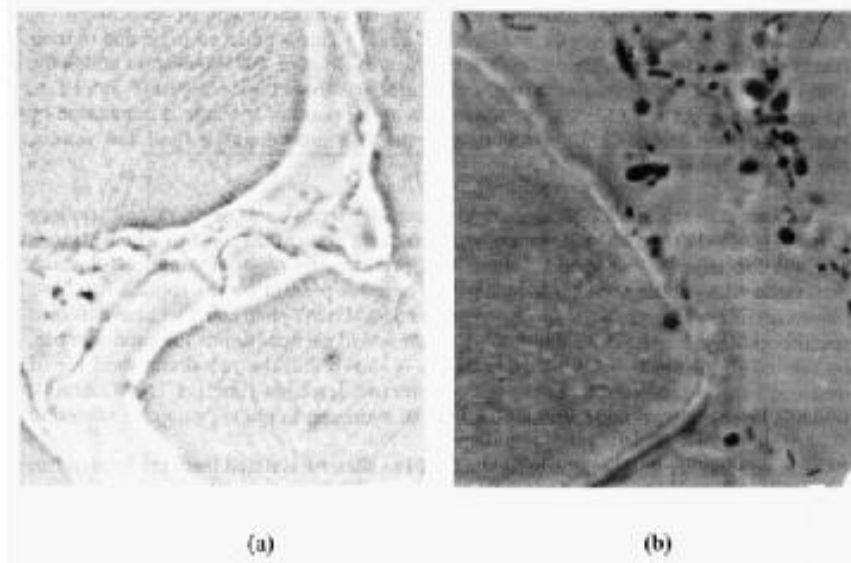
Mikroorganizmi kod ihtiofaune obitavaju na vanjskim površinama poput škrge i kože te u crijevima kod svježe ulovljene ribe. Broj mikroorganizama veoma je varijabilan te se u literaturi navodi da na ribljoj koži može obitavati između  $10^2$ -  $10^7$  cfu ("colony forming unit"). Škrge i crijeva obično sadrže od  $10^3$  do  $10^9$  cfu/g. Razlozi varijabilnosti broja mikroorganizama su brojni. Primjerice bakterijska flora može ovisiti o okolišnim uvjetima, riba koja je obitavala u hladnijem mediju također često sadržava manji broj bakterija od one koja obitava u toplome (Gram & Dalgaard, 2002; Gram, 2009). Riblja površina sadržava veliki broj bakterija raznih vrsta te se dijele ovisno o temperaturnim nišama. Bakterije se dijele ovisno o temperaturnim nišama na psihrofilne, mezofilne, termofilne, također u literaturi se navode i psihrofobni organizmi. Psihrofilne bakterije podnose niže temperature, mogu opstati na  $0^{\circ}\text{C}$  te im je optimalna temperatura za rast i razvoj  $25^{\circ}\text{C}$ . Nadalje, najbrži rast psihrofilnih organizama zabilježen je na  $15^{\circ}\text{C}$ , a maksimalna temperatura za opstanak je  $20^{\circ}\text{C}$ . Mezofilne bakterije podržavaju širok temperaturni raspon, između  $20^{\circ}\text{C}$  i  $45^{\circ}\text{C}$ . Također, u ovu nišu pripada i tjelesna temperatura čovjeka pa su samim time i česta tema istraživanja. Termofilni organizmi obitavaju na područjima visokih temperatura, mogu rasti i na temperaturi od  $90^{\circ}\text{C}$ .

U umjerenom pojasu dominiraju gram-negativne bakterije rodova *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* i *Flavobacterium*. Nadalje, bakterije koje često obitavaju na ihtiofauni pripadaju rodovima *Vibrionaceae* te *Aeromonadaceae*. Gram-pozitivne bakterije generalno obitavaju na ihtiofauni tropskih područja. *Enterobacteriaceae* se nalaze u povećanom broju na područjima sa visokim stupnjem zagađenja (Dalgaard, 1995; Dalgaard & Huss, 2020)

Riblje jedinke na sebi sadržavaju veliki broj potencijalno opasnih mikroorganizama, no dobar dio tih organizama ne uzrokuju kvarenje hrane. Istraživanje koje su proveli Alur et al. (1989) pokazalo je enorman rast broja *Micrococcus colpogenes* na populaciji skuša te nisu pronađeni znakovi kvarenja. Ovim istraživanjem istaknuto je da broj bakterija na organizmu ne može nužno služiti kao pokazatelj kvarenja hrane. Valja istaknuti da postoji distinktivna razlika između flora koja uzrokuje kvarenje i bakterijsko kvarenje. Prvi termin se odnosi na bakterije koje se nalaze na ribi kada se već jedinka smatra pokvarenom dok se bakterijsko kvarenje odnosi na bakterije koje uzrokuju neugodne mirise i okuse kod ribe (Herbert, 1971)

Imunološki sustav ihtiofane prevenira bakterijski proboj u tkivo. Nakon uginuća jedinke imunološki odgovor organizma prestaje. U tom trenutku u organizam ulaze mikroorganizmi, bakterijski prodor odvija se kroz kožu, u trbušnu šupljinu kroz gastrointestinalni trakt, a u škrge

i bubreg kroz vaskularni sustav. Kemijska razgradnja organizma postavlja veoma hranjivu podlogu za bakterije te time pospješuje rast nakon smrti. Bakterijska kontaminacija uvelike varira ovisno o vrsti i dužini ribe, metodi kojom je uhvaćena riba, primarnim rukovanjem, higijenskim stanjem plovila te načinom prerade i skladištenjem proizvoda. Bakterijska kontaminacija raste nepravilnim rukovanjem i pohranjivanjem ribe (Slika 3.) (Faser & Sumar, 1998).



Slika 3. Presjek ribe: (a) svježe ulovljene ribe, (b) kontaminirani file koji 12 dana stoji nepropisno poleđen (Ruskol & Bendsen, 1992)

Ribe posjeduju jedinstven sustav za osmoregulaciju, pomoću njega postižu stabilnost unutar organizma, odnosno za morsku ihtiofaunu izbjegavanje dehidracije, a za slatkovodnu ihtiofaunu izbacivanje viška vode. Važan osmoregulator je trimetilamin oksid (TMAO). Ova organska molekula u tijelo dolazi kroz hranu, a pH mu je neutralan i nije toksičan. Nadalje, gram-negativna bakterija poput *Shewanella putrefaciens* pretvara trimetilamin oksid u trimetilamin kako bi dobila energiju. Drugi tjelesni enzimi također mogu reducirati TMAO na dimetilamin i formaldehid. Iako je trimetilamin oksid bezopasan, redukcija na trimetilamin izaziva neugodan miris tj. smrad ustajale ribe. Koncentracija trimetilamina korištena je kao indikator bakterijskog propadanja. Koncentracija od 1,5 miligrama po 100 grama tkiva pokazuje visoku kvalitetu ribe, dok se koncentracija od 10 do 15 miligrama po 100 grama tkiva smatra granično prihvatljivom za konzumaciju. Nadalje, ove koncentracije ne mogu se univerzalno primijeniti odnosno ovise o vrsti, primjerice koncentracija od 1 mg po 100 g tkiva

svugdje se smatra prvoklasna, a kod srdele je maksimalna dozvoljena koncentracija 10 mg po 100 g tkiva (Summers et al., 2017).

Ribljim makrokonstituentima pod utjecajem bakterijskog katabolizma (razgradnja) tvore i druge spojeve koji se povremeno koriste kao indikatori kvarenja. Razgradnjom aminokiseline koja sadrži sumpor nastaju hlapljivi sulfidni spojevi i sumporovodik. Amonijak se dobiva kao posljedica bakterijske razgradnje neproteinskih dušikovih spojeva poput uree. Maksimalna dozvoljena granica za spojeve na bazi dušika u ribi je od 30 do 35 miligrama po 100 grama tkiva (Summers et al., 2016). No postoje i izuzetci, primjerice vrste poput srdela koja ima drugačiji limit te se on proteže od 25 do 35 mg po 100 grama tkiva (Ababouch et al., 1996). Koncentracija ovih spojeva po vrstama veoma je varijabilna ovisno o unutarnjim i vanjskim faktorima. Octena kiselina, propionska kiselina, maslačna kiselina kao i mnoge druge masne kiseline nastaju kao rezultat bakterijske razgradnje te pridonose neugodnom mirisima kvarenja (Bryan, 1988).

### 2.3.3. Stvaranje histamina

Prvi spomen histamina datira iz 1907. godine kad su ga znanstvenici sintetizirali. Histamin je prvi puta u prirodi otkriven tek 1910. godine, dakle 3 godine nakon sinteze u laboratoriju, a smatra se najvažnijim biogenim elementom u ihtiofauni. Kemijski naziv ovog amina glasi beta-imidazoletilamin te mu je formula  $C_5H_9N_3$ . Histamin postoji u svakom živućem organizmu. U slobodnom obliku biva kratkog vijeka jer ga razgrade drugi enzimi. Proces stvaranja histamina ovisi o nekoliko bitnih faktora. Prvi faktor je količina histidina u mišićnoj muskulaturi ihtiofaune, a drugi se odnosi na brojnost bakterijskih mikroorganizama koje mogu stvoriti histidindekarboksilazu (Özoğul & Özoğul, 2019). Riba tvore daleko veću količinu histamina od kopnenih životinja, razlog tome jest količina histidina u bjelančevinama; kod riba seže do 6,5 % dok kod životinja ova brojka varira od 1 do 3 %. Sljedeći bitan faktor je ambijentalna temperatura koja igra značajnu ulogu prilikom tvorbe histamina. Istraživanja su pokazala da za neke vrste poput skuše tvorba započinje oko 17°C, a optimum tvorbe od 20 °C do 25 °C. Osim toga, valja spomenuti da su rukovanje i pohrana ribe važni za količinu histamina u ribi. Istraživanje Galrini et al. (1996) pokazalo je povećani udio histamina koji je nastao kao rezultat nestručnog rukovanja i/ili pohrane ribe prilikom procesa konzervacije skuše i tune.

Na temu histamina provedena su brojna istraživanja, a razlog k tome je utjecaj ovog amina na ljudsko zdravlje. Histaminsko djelovanje na ljudsko zdravlje podijeljeno je u tri

kategorije. Prva kategorija odnosi se na proširivanje krvnih žila (kapilara) čime se povećava poroznost. Sljedeća se odnosi na proširenje arteriola što uzrokuje jako stezanje i opuštanje mišićnih vlakana te se očituje primarno u probavnom sustavu. Zadnja kategorija je intenzivno lučenje sekreta. Prvi simptomi histaminskog trovanja organizma su crveni plikovi na licu i tijelu (Slika 4.), rast temperature, pad tlaka, glavobolja te povećana količina sline i suza. Ovakav tip trovanja očituje se kada u ljudsko tijelo primi količinu histamina veću od 2,5 mg. Isto tako histaminsko trovanje je veoma individualno, što znači da jačina simptoma primarno ovisi o stanju i osjetljivosti organizma (Slika 5.) (Smajlović et al., 2008; Vusilović et al., 2008).



Slika 4. Prikaz histaminskog trovanja (Eyer et al., 2022)



Slika 5. Osjetljivost organizma na histaminsko trovanje (Ferran & Yébenes, 2006)

#### 2.3.4. Oksidacija lipida

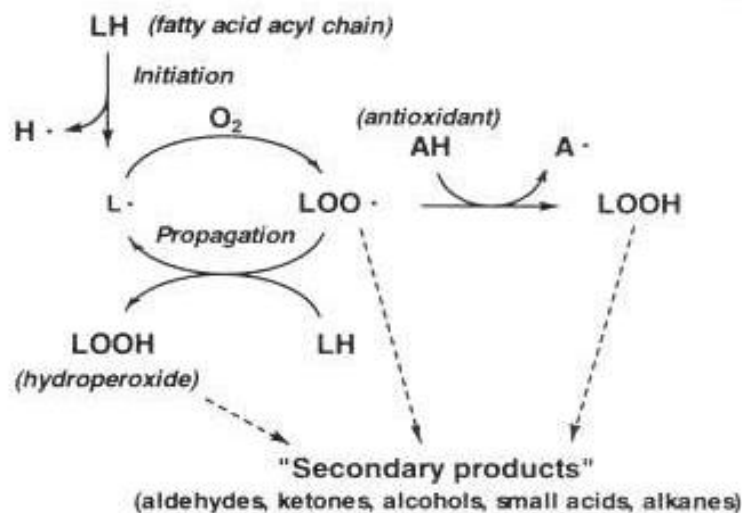
Oksidacija lipida postala je tema velikog broja istraživanja u prošlih nekoliko desetljeća. Smatra se jednom od najvažnijih postmortalnih promjena te uvelike utječe na kvalitetu mesa ribe (gubitak polinezasićenih masnih kiselina (PUFA)), a najviše se očituje kod ribljih vrsta s većim postotkom masti. Nadalje, uz smanjenu kvalitetu mesa ribe smanjuje se i vijek trajanja same namirnice. Također oksidacija utječe na okus i miris. Sam proces se bazira na trošenju kisika ili prisustvu peroksida, malondialdehida (MDA), slobodnih masnih kiselina (FFA) te ostalih spojeva. Prilikom mjerenja stupnja oksidacija važno je uzeti u obzir sve moguće faktore, na taj način dobiva se stvarna slika stanja namirnice. Lipidi u ihtiofauni podosta se razlikuju od lipida sisavaca. Struktura ribljih lipida sastoji se od nezasićenih masnih kiselina koje tvore duge lance (14-22 atoma ugljika) te nekoliko dvostrukih veza po molekuli masne kiseline, dok sisavci rijetko imaju više od dvije dvostruke veze po molekuli masne kiseline. Nadalje, ribe također sadrže druge PUFЕ poput esencijalne masne kiseline EPA i DHA. U ribljim mišićnim vlaknima odvijaju se dva procesa, a to su autooksidacija i autoliza masti (Chávez et al., 2014).

Autooksidacija proizlazi iz reakcije kisika koji se nalazi u zraku te nezasićenih masnih kiselina. Stvaranje hidroperoksida označava početak autooksidacije. Proces autooksidacije okarakteriziran je lančanom reakcijom u kojoj sudjeluju slobodni radikali te se odvija u nekoliko faza. Faktori koji utječu na brzinu same reakciju su: temperatura, osvjetljenje te organske i anorganske čestice. Proces koji je počeo ne može se zaustaviti, no postoji načini da se ubrza odnosno uspori. Tvari koje vode do usporavanja autooksidacija nazivaju se antioksidansi. U odnosu na oksidacijske tvari, kvantiteta antioksidansa u organizmu razmjerno je mala. Antioksidansi djeluju na način da uklone kisik ili višak kisikovih atoma, smanjuju metalne ione, superoksid, vodikov peroksid i slobodne radikale. U akvakulturi antioksidansi se unose putem askorbinske kiseline, dodatkom vitamina e, ali u najvećem dijelu prilikom dimljenja čime se nakupljaju određeni spojevi na epidermalnom sloju te se time zaustavlja užeglost (Secci & Parisi, 2016).

Oksidacija lipida koja nije uvjetovana enzimskom reakcijom odvija se na idući način: molekule kisika koriste negativno nabijene elektrone ostalih molekula te time tvore slobodne radikale. Kako bi otuđili elektrone, molekule kisika moraju razbiti dvostruku vezu masnih kiselina te tvore nove peroksidne veze. Određene molekule poput fosfolipida podložnije su procesu oksidacije, a razlog k tome je kemijski sastav. Količina nezasićenih masnih kiselina (linolna masna kiselina i arahidonska masna kiselina) u fosfolipidima je daleko veća nego u drugih spojeva (Bell et al., 1986; Secci & Parisi, 2016).



Analiziranjem uzoraka može se ustvrditi postotak oksidacije te se sam proces bazira na količinskom mjerenju spojeva poput malondialdehida (MDA), 4-hidroksinonena i drugih molekula koje nastaju u procesu peroksidacije lipida. Proces peroksidacije lipida odvija se zbog postojanja slobodnih radikala, a uglavnom je aktivira hidroksilni radikal. Lipidna peroksidacija odvija se u 3 različite faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Slika 6.). Inicijacijom se iz nesaturiranog ugljikovodika dobiva radikal gubitkom vodika. Cijeli proces se odvija uz prisustvo kisika te nastaje dvostruka veza tj. di-radikal. U ovom procesu iz svake inicijacije nastaju dva radikala. Propagacija je nastavak na prošli proces te od di-radikala tvori nove spojeve poput peroksidnog, hidroperoksidnog i ugljikovodičnog radikala. Zadnji segment procesa, terminacija nastaje zbog međudjelovanja radikala. Nestankom posljednjeg slobodnog radikala ponavlja se proces tj. iznova se odvija proces inicijacije. Peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina nastaju lipidni radikali. Radikali koji posjeduju sposobnost oksidacije nad polinezasićenim masnim kiselinama su alkoksilni anioni i peroksilni anioni (Štefan et al., 2007).



Slika 6. Prikaz peroksidacije polinezasićenih lipida (Huss, 1995)

Prilikom određivanja stupnja oksidacije masti koristi se tiobarbiturna kiselina (TBK). Ova kiselina se koristi za mnoštvo kemijskih reakcija. Odlikuje se reaktivnošću osobito s karboksilnim skupinama, ali i raznim kiselinama, amidima te esterima. Kako bi se dobilo stvarno stanje masti odnosno odredio stupanj lipidne oksidacije primjenjuje se tiobarbiturni test

(TBARS). Tiobarbiturnim testom dobiva se količina malondialdehida (MDA). Malondialdehid nastaje kao rezultat oksidacije lipida kada govorimo o polinezasićenim masnim kiselinama. Okarakteriziran je kao veoma značajan organski spoj, a razlog tome leži u kancerogenom svojstvu i mogućnošću mutacije. Upravo iz ovog razloga malondialdehid je dobar pokazatelj oštećenja tkiva. Za određivanje kontaminacije malondialdehidom najčešće se koristi metoda spektrofotometrije kako bi se analizirao ružičasto fluorescentni kompleks tiobarbiturne kiseline i malondialdehida. Za reakciju se moraju ispuniti određeni uvjeti poput snižene pH vrijednosti i visoke temperature (Štefan et al., 2007; Papastergiadis et al., 2012).

## 2.4. HACCP

HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) je međunarodno priznat sustav čiji je glavni zadatak suzbijanje i kontrola potencijalno opasnih supstanci u prehrani. Konferencija za zaštitu hrane (1972) zaslužna je za popularizaciju i razvitak HACCP sustava. Mayels et al. (1989) navodi "Pillsbury Company" kao prvu tvrtku koja je implementirala ovaj sustav industrijski, a svrha je bila kontrola kakvoće hrane za NASA svemirsku agenciju. Ubrzo nakon NASE, HACCP program dobio je sve veći broj korisnika pa se tako veoma brzo raširio u prerađivačkoj industriji koje koriste konzervaciju kao i američki FDA odnosno "Food and Drug Administration". Međutim, prva integracija HACCP-a nije se odvila do 1985. godine. HACCP dobiva međunarodnu važnost zbog nacionalne znanstvene akademije koja je naglasila beneficije ovog sustava u prerađivačkoj industriji. Na konferenciji donesena je proklamacija kojom se HACCP bolje integrira u prehrambenoj grani. Također, odlučena je i uloga regulacijske agencije kao nadglednika svih planova i budućih projekta u industriji, edukacija inspektora i in situ kontrola standarda (Bremner, 2002).

HACCP se smatra programom koji je u stalnom napretku odnosno prilagođava se i razvija sukladno tehnološkim unaprjeđenjima. U samim počecima ovaj program bio je dobrovoljne prirode, međutim kroz vrijeme postao je standard odnosno u mnogim postrojenjima obaveza. U suštini HACCP je sustav koji se sastoji od dvije cjeline. Prvi segment bazira se na definiranju proizvoda te na daljnjem usavršavanju proizvodnje (mora se detaljno razumjeti svaki korak u proizvodnji). Važnost poznavanja samog proizvoda leži u mogućem određivanju čimbenika koji su potencijalno štetni za organizam. Unutar prvog segmenta proučavaju se različiti parametri poput načina korištenja (sirovo - može se konzumirati, sirovo – spremno za termičku obradu ili već termički obrađen proizvod), zatim koje su metode distribucije i pohranjivanja proizvoda (primjerice rashlađeno u hladnjaku ili u zamrzivaču) te

na posljétku koja je ciljána skupina. Ovom segmentu pridodaje se posebna važnost zbog hrane koja je namijenjena djeci ili starijoj populácii. Hrana namijenjena osobama sa osjetljivijim imunološkim sustavom podvrgava rigoroznijim provjerama i češćem monitoringu. Drugi segment dijeli se na 7 principa (Mortimore & Wallace, 2013).

#### 2.4.1. Principi u HACCP-u

Važno je naglasiti da HACCP program ne daje na posebnoj važnosti određenom principu već su svi podjednako rangirani te se kao takvi svi moraju jednako poštivati.

Prvi princip analizira opasnost, a svrha ovog principa leži u determinaciji mogućih opasnih supstanci koje uzrokuju bolest ili ozljedu. Ovaj princip dijeli moguće opasnosti u tri skupine: biološke opasnosti koje nastaju djelovanjem raznih mikroorganizama, nadalje kemijske opasnosti odnosno toksini koji se luče te fizikalne opasnosti u koje se svrstavaju razni fragmenti krute tvari poput komadića metala ili stakla.

Drugi princip je determinacija kritične kontrolne točke (Critical control point (CCP)). Definira se kao točka u kojoj se može primijeniti kontrola i/ili spriječiti potencijalna opasnost, a uključuje kontrolu formulacije proizvoda, testiranje sastojka, testiranje na moguću kontaminaciju metalima.

Treći princip je uspostava odnosno definiranje kritičnog limita. U ovoj fazi determiniraju se optimalni uvjeti, minimum i maksimum vrijednost za biološke, kemijske i fizikalne parametre, a sve sa ciljem eliminacije ili eventualne redukcije kako bi parametri došli na prihvatljivu razinu za prehrambene standarde (Pierson, 2012).

Četvrti princip uključuje uspostavu monitoringa. Ovaj princip nadovezuje se na drugi kontrolirajući CCP monitoringom i raznim mjerenjima vrijednosti. Monitoring je veoma važan jer se koristi kao alat za svaki dati limit odnosno kontrolira se svaka stavka unutar proizvodnje. Uspostava monitoringa ima tri glavna zadatka: prvi zadatak je praćenje kvalitete hrane i omogućuje upravljanje, drugi dio je identifikacija mogućeg gubitka kontrole i prelaska kritične kontrolne točke te treće pruža pisani trag tj. dokaz o kvaliteti hrane i provedenim testiranjima.

Peti princip bazira se na uspostavi odgovarajućih radnji ukoliko se uspostavi prijelaz kritične kontrolne točke. Primjerice vraćanje hrane u duboko zamrzavanje ukoliko se ne postigne odgovarajuća temperatura.

Šesti princip za cilj ima verifikaciju procedure. Ovaj princip je najzahtjevniji za razumjeti, a uključuje provjeru aktivnosti unutar HACCP plana. Aktivnosti koje se odvijaju

kroz šesti princip su: provjera funkcionalnosti pogona sukladno HACCP planu te determiniracija znanstvene i tehnološke ispravnosti plana.

Posljednji princip uključuje dokumentaciju procedure te se sastoji od dvije cjeline. U prvoj cjelini prave se izvještaji potencijalnih opasnosti te se opisuju kontrolne mjere. Druga cjelina je HACCP plan, a mora sačinjavati: popis tima koji je radio na projektu, opis hrane, distribuciju, ciljanu populaciju i HACCP tablicu sadržaja (Pierson, 2012).

## **2.5. Tehnologije konzervacije sitne plave ribe**

Očuvanje odnosno konzervacija ribljih proizvoda oduvijek je intrigirala ljudski rod. U počecima očuvanje namirnica odnosilo se na poleđivanje, primitivno sušenje, a kasnije soljenje i korištenje dima. Samo konzerviranje doživljava tehnološki procvat krajem 19. stoljeća, a razlog tome je izum hladnjače. Primarni cilj konzervacije proizvoda leži u produljenju vijeka trajanja uz očuvanje kvalitativnih svojstva. Kasnije su se razne metode konzervacije počele primjenjivati zbog konkurentnosti na tržištu tj. kako bi se proširila ponuda proizvođača i omogućila veća ekonomska isplativost. Konzerviranje može biti djelomično ili potpuno te ovisi primarno o jačini i tehnikama konzerviranja. Potpuno ima za zadatak uništiti sve mikroorganizme koji bi mogli uzrokovati kvarenje proizvoda, dok djelomično u globalu usporava sam proces. Konzerviranje se također dijeli i prema metodama koje se koriste na: fizikalne metode (uglavnom se koristi manipulacija temperature), kemijske metode (izmjena i poboljšanje svojstva proizvoda npr. soljenjem) te kombinacijom nekoliko različitih postupaka (Šoša, 1989).

Najčešće korištene metode u konzervaciji ribe su hlađenje i smrzavanje, a razlog tome je niska cijena i široka primjena.

Hlađenjem proizvoda produžava se vijek hrane, no ovo nije potpuno konzerviranje te traje samo nekoliko dana. Za metodu hlađenja najčešće se upotrebljava led (Slika 7.), more i hladan zrak. Ova metoda konzervacije ribe koristi temperaturu koja varira od 0 do 4°C. Hlađenjem ribe se postižu pogubni uvjeti za razvoj i prisutnost mikroorganizama te se usporavaju autolitičke promjene. Glavni nedostatak je izloženost samog proizvoda, naime direktni kontakt može uzrokovati gubitak kvalitativnih svojstva kao i oksidaciju (Sen, 2005).



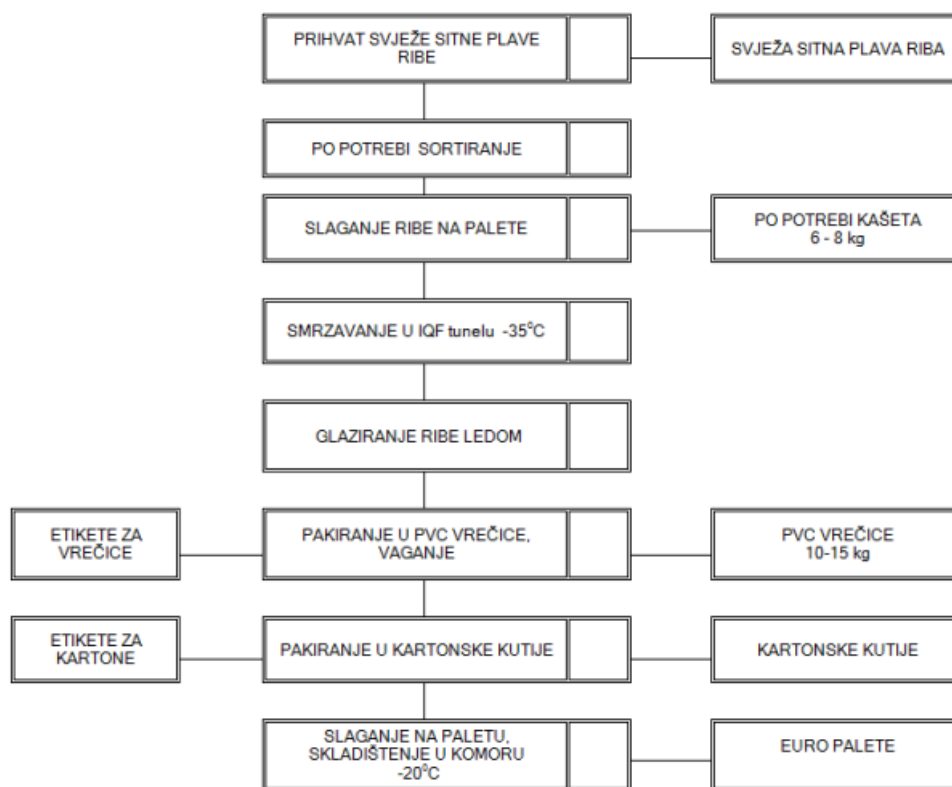
Slika 7. Prikaz hlađenja srdele ledom (Omega 3, 2022)

Druga najčešća metoda prezervacije ribe je smrzavanje prilikom koje se koristi temperatura ispod krioskopne točke. Ovom metodom tkivo ribe se smrzava te se međustanične i stanične tekućine transformiraju u led. Uzimajući u obzir da stanična tekućina nije homogena već je otopina različitih supstancija, početna točka smrzavanja ribe mora biti niža od točke smrzavanja vode. Za morskoujedičnu krioskopska točka odnosno početna točka smrzavanja je od  $-1^{\circ}\text{C}$  do  $-2^{\circ}\text{C}$ . Smrzavanje se dijeli na tri metode ovisno o načinu odnosno mediju pomoću kojeg se smrzava. Prva metoda podrazumijeva korištenje zraka koji je hladan za smrzavanje te se može primjenjivati kontinuirano (IQF) i nekontinuirano (palette). Druga metoda koristi pločaste isparivače za smrzavanje mesa ribe, a zadnja metoda podrazumijeva kontaktno smrzavanje (Hall, 2011).

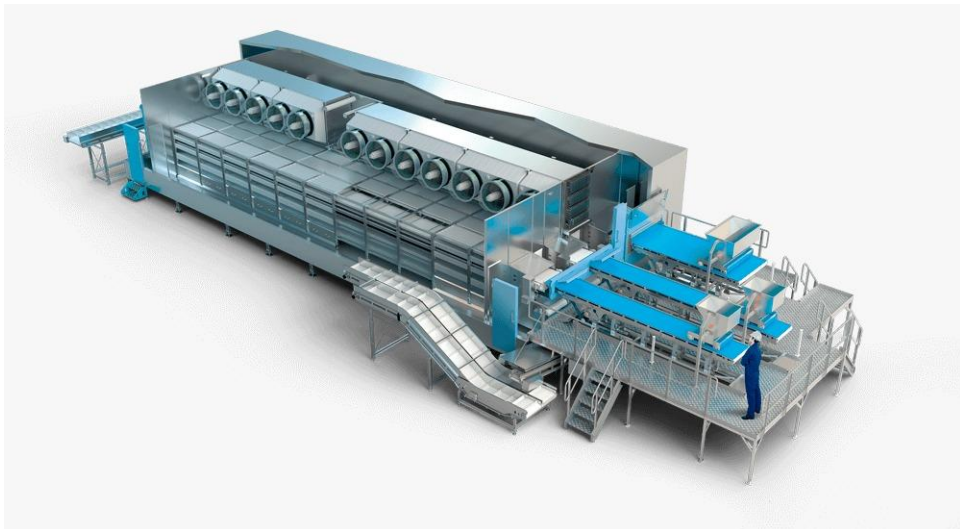
#### 2.5.1. IQF tehnologija smrzavanja

IQF (Individual Quick Freezing) je metoda smrzavanja koja u današnje vrijeme ima široku primjenu. U konzervaciji akvatičkih organizama IQF se primarno koristi ne bi li se očuvala svojstva fileta ribe, škampa, ali i sitnoj plavoj ribi. Metoda koristi ohlađeni zrak koji cirkulira pomoću ventilatora kako bi se zamrznuo željeni proizvod (Slika 8.). Brzina cirkulacije

varira te ne bi smjela biti manja od 4 metra po sekundi niti veća od 6 metara po sekundi. Prilikom uporabe IQF tehnologije proizvod se nalazi na pokretnoj traci koja kontinuirano radi te se pomoću snažnog nanosa zračne mase smrzava (Slika 9.). Svaki segment fileta biva okružen česticama zraka čija je temperatura ekstremno niska te se zbog velike temperaturne razlike čestice fileta pojedinačno i rapidno smrzavaju. Ova tehnologija se koristi samo kod proizvoda manjih dimenzija kako bi se svaka čestica mesa zamrznula. Smrzavanje proizvoda može se odvijati pojedinačno ili u blokovima te na raznim podlogama te je to jedan od razloga široke upotrebe ove tehnologije. IQF tehnologija upotrebljava se na dva različita načina, a to su pomoću mehaničkog i kriogenog zamrzivača. Prva metoda dispencira zrak ispod proizvoda koji se nalazi na pokretnoj traci te je zrak ohlađen na  $-35^{\circ}\text{C}$ , dok druga metoda za zamrzavanje proizvoda koristi tekući dušik uz konstantnu rotaciju proizvoda (George, 1993).



Slika 8. Shematski prikaz proizvodnog procesa smrzavanja cijele srdele pomoću IQF tehnologije (Ribarska zadruga OMEGA 3, 2016)



Slika 9. Prikaz uređaja za IQF smrzavanje s više traka (Skaginn 3x, 2021)

Prednost IQF tehnologije leži u vremenskom periodu smrzavanja, naime ovisno o samom proizvodu period potpunog smrzavanja može biti gotov za nekoliko minuta. Kratki vremenski period održava kvalitetu mesa te zaustavlja nastajanje intercelularnih kristalića leda koji uzrokuju devastaciju membrana. Druga odlika IQF tehnologije je mogućnost separacije fileta što pospješuje sam proces zaleđivanja uz zadržavanje kvalitativnih svojstva (Songsaeng et al., 2010; Gokoglu & Pinar, 2015).

Naravno, ova tehnologija dolazi i sa nekim nedostacima. Prvi i glavni nedostatak je gubitak humiditeta proizvoda ukoliko se nalazi izvan pakiranja, budući da je primarni način smrzavanja pomoću ohlađenog zraka. Direktni kontakt zračne mase pod velikom brzinom uzrokuje isušivanje proizvoda te se može negativno manifestirati na dva načina. Prva manifestacija je fizičke prirode i očituje se u promjeni fileta, ne samo vizualno već i kvalitativno te primarno ovisi o postotku izgubljene vlage. Druga negativna promjena je nakupljanje kristalića leda. U većoj mjeri ove dvije nuspojave uzrokuju promjenu “freez-burn” koja uvelike smanjuje kvalitetu proizvoda. Druga promjena koja se može javiti je oksidacija lipida zbog proboja atoma kisika kroz oslabljena mišićna vlakna te se često javlja nakon “freeze-burn” promjene (Gokoglu & Pinar, 2015).

Kako bi se zaštitila kvaliteta sirovine neki proizvođači koriste i proces glaziranja nanošenjem tankog sloja leda na proizvod. Sloj leda sprječava direktan prodor kisika te se time reducira oksidacija i dehidracija (Jacobsen & Fossan, 2001).

### **3. CILJEVI I SVRHA RADA**

Primarni cilj ovog diplomskog rada jest utvrditi postoji li značajna razlika u promjeni kvalitete između dva tipa obrade srdele. Primarna analiza se provodila na svježoj ribi kroz vremenski period, a sekundarna analiza za usporedbu je koristila ribu zaleđenu IQF tehnologijom smrzavanja. Nadalje, pomoću kemijskih i mikrobioloških metoda napravljena je komparacija čime su se pratili određeni kvalitativni parametri u svrhu ocjenjivanja srdele kao prehrambenog proizvoda.

Svrha rada je utvrditi beneficije IQF tehnologije smrzavanja nad tradicionalnim načinom smrzavanja, kao i ispitati kvalitetu novodobivenog proizvoda. Analizom kemijskih, mikrobioloških i organoleptičkih svojstva u određenom vremenskom periodu indicira se trajnost kvalitete ove tehnologije smrzavanja.



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Uzorkovanje ribe

Sveučilište u Zadru u suradnji s Organizacijom proizvođača „Ribarska zadruga Omega 3“ proveli su istraživanje u sklopu projekta pod nazivom „Vrednovanje visokokvalitetne smrznute srdela za ljudsku ishranu“. U ovom radu je analiziran dio istraživanja koji se provodio u zimskom razdoblju, kada se srdela intenzivno mrijesti.

Početak istraživanja svodio se na pripremu uzorka te transport u najkraćem mogućem periodu do pogona za preradu „Omega 3“. Priprema uzorka obuhvaća sortiranje ribe koje se odvija tijekom izlova te pothlađivanje pomoću emulzije koja se sastoji od leda i morske vode ili se koristi već prije pothlađena voda (kvantiteta ribe iznosila je cca 100 kg ribe). Drugi korak u pripremi srdela je pohranjivanje same ribe u ribarske sanduke koji moraju biti termonepropusni (Slika 10.). Riba mora biti skladištena na stabilnoj temperaturi koja ne smije prelaziti interval 0 - 3 °C te se tako čuva kvaliteta od izlova do iskrcaja ribe. Također, prikupio se uzorak od 100 jedinki na kojima se provodila biometrija (Slika 11.).



Slika 10. Prikaz prihвата srdela u termo-nepropusne sanduke (Omega 3, 2022)



Slika 11. Prikaz svježe srdele korištene za biometriju (Omega 3, 2022)

Ulovljena riba skladištila se sukladno kriteriju o skladištenju svježe ribe što znači da temperatura okoline varira između 0 - 3 °C te je tako stajala četiri dana. Primarno se pratila degradacija u kvaliteti smrznute srdele u period od 120 dana, a valja naglasiti da su prilikom skladištenja uzeta triplikantna uzorka svakog dana. Za istraživanje je korišteno pet triplikantna uzorka te su se pratili u raznim vremenskim periodima odnosno prvog dana, desetog dana, tridesetog dana, četrdesetpetog dana, šezdesetog dana i sto dvadesetog dana. Procjena se radila organoleptički, a bazirala se na kvaliteti ribe, kvaliteti IQF tehnologije smrzavanja (Slika 12.) te se procjenjivala riba koja je imala različitu starost skladištenja.



Slika 12. Prikaz srdele smrznute IQF tehnologijom (Omega 3, 2022)

Najadekvatniji način za praćenje degradacije kvalitete ribe jest pomoću kemijske analize ili vršenjem mikrobiološke analize. Kemijska analiza obuhvaća razne vrijednosti poput vode, pepela, bjelančevine, mast i ugljikohidrata te ovaj segment predstavlja jestivi dio srdele odnosno filet ribe. Također, proučava se i kvaliteta ribljeg mesa i mogući nedostatak svježine pomoću peroksidnog broja i tiobarbiturnog broja. Nadalje, veoma bitna stavka koja se prati je histamin odnosno njegovo odstupanje od referentne vrijednosti. Mikrobiološka analiza predstavlja prisustvo i broj određenih organizama poput bakterija, a prate se vrijednosti sulfitoreducirajućih bakterija kao i broj *Enterobacteriaceae* te kao i za većinu prehrambenih proizvoda prisustvo *Salmonella spp.*.

## 4.2. Metodologija prilikom analize uzorka

Zavod za javno zdravstvo grada Zadra, odnosno služba za zdravstvenu ekologiju i zaštitu prirode obavila je kemijsku i mikrobiološku analizu uzoraka. Prikupljeni uzorci analizirali su se u laboratoriju za obavljanje analize hrane i hrane za životinje te je svrha bila službena kontrola prema rješenju Ministarstva poljoprivrede KLASA: UP/I-322-01/17-01/94; URBROJ: 525-10/0729-18-3 od 24. rujna 2018. Filetima srdele utvrđene su vrijednosti makrokonstituenata, a analiza se obavljala u laboratoriju za kemiju namirnica. Kako bi se utvrdile kemijske vrijednosti fileta laboratorij za kemiju namirnica koristio je vlastite metode analize. Količina masti određena je pomoću vlastite metode PO-7.2/50 01/2 02.09.2019, odnosno napravljena je ekstrakcija i gravimetrija masti. Količina bjelančevine konstatirana je vlastitom metodom PO-7.2/73 01/2, 02.09.2019 te se koristila akreditirana modificirana metoda digestije i titracije. Količina vode određena je vlastitom metodom PO-7.2/56 01/3, 02.09.2019, a pepeo vlastitom metodom PO7.2/74 01/1, 02.09.2019.

Laboratorij za mikrobiologiju namirnica odradio je mikrobiološku analizu ribe. Primarni cilj mikrobiološke analize jest pronaći povišenu količinu 4 tipa mikroorganizama, a to su: *Enterobacteriaceae*, sulfitreducirajuće bakterije, *Salmonella spp.* i aerobne mezofilne bakterije. Sulfitreducirajuće bakterije analizirane su vlastitom metodom, a za *Enterobacteriaceae* korištena je metoda HRN EN ISO 21528-2:2017. Analiza *Salmonella spp.* odrađena je metodom HRN EN ISO 6579-1:2017, a aerobne mezofilne bakterije metodom HRN EN ISO 4833-1:2013. Mjerna jedinica kojom se izražava mikrobiološka količina *Enterobacteriaceae*, sulfitreducirajućih bakterija i aerobnih mezofilnih bakterije je Cfu/g te predstavlja broj bakterijskih kolonija na petrijevoj zdjelici. Postupak određivanja broja živih bakterija obuhvaća pripremu hranjive podloge u strogo kontroliranim uvjetima te prebrojavanja broja bakterija na petrijevoj zdjelici. Ovaj postupak za razliku od mikroskopske metode broji samo žive stanice. Valja naglasiti da vizualna metoda ne može determinirati je li kolonija stvorena od jedne stanice ili od skupine stanica. Upravo zbog toga rezultati se prikazuju kroz jedinice koje formiraju koloniju/e te se pomoću toga smanjuje nesigurnost.

Treći segment koji obuhvaća tiobarbiturni test, peroksidni broj i analizu histamina napravljen je na veterinarskom zavodu u Splitu (laboratorij za analitičku kemiju i rezidue). Tiobarbiturni test odrađen je metodom S-3-SOP-86 Rev.00 te se peroksidni broj analizirao metodom S-3-SOP-51 Rev.01. Prisutnost histamina identificirala se pomoću HPLC metode HRN EN 19343:2017 (EN 19343:2017 modificirana metoda, 26.04.2019) te je granica kvantifikacije iznosila 2,1 mg/kg. Odjel za veterinarsko javno zdravstvo (laboratorij za

analitičku kemiju) analizirao je količinu ukupnih masti metodom HRN ISO 1443:1999 Z-I-4-N 02 Rev.08 te je isto tako analizirao i udio zasićenih masnih kiselina metodom kiseline HRN EN ISO 12966-2:2017; HRN EN ISO 12966-4:2015 Z-I-4 N 22 Rev.05.

### **4.3. Priprema i postupanje s uzorcima**

Uzorci visokokvalitetne srdele prikupljeni su u zimskom periodu 2021. godine. Sama pecatura iznosila je 52 jedinke po kilogramu ribe, što znači da se u kilogramu ribe nalazi 52 komada/jedinke ribe. Po protokolu istraživanja biometrijski segment koji se kasnije analizirao iznosio je 2 kilograma ribe. Prije same biometrije pregledana je riba te je utvrđeno da je riba bez parazita. Biometrija obuhvaća razna mjerenja i analize, a za potrebe ovog istraživanja rađena su mjerenja dužine što uključuje standardnu (dužina ribe koja isključuje mjerenje repne peraje (SL)) i totalnu (uključuje mjerenje cijele ribe (TL)), zatim je izvagana težina, te na posljertku težina gonada.

Također je određena i priprema uzoraka zbog kemijske i mikrobiološke analize. U prvom danu pohranjen je triplikatni uzorak odnosno 2 replike uzorka od 2 kg te je smrznut i kao takav otpremljen na daljnju analizu (to su uzorci R1, R2 i R3). Ulovljena srdela pothlađena je na varijabilnoj temperaturi od 0 do 3 °C te je skladištena upravo na način na kojoj bi se prezentirala kao svježa riba. Od 1. do 4. dana koristila se IQF tehnologija smrzavanja na triplikatu uzorka koji se kasnije transportirao u predviđene laboratorije za analizu ribe. Numerirani su uzorci na način da Fa predstavlja prvi dan tj. Fa1 predstavlja prvi uzorak, Fa2 repliku i Fa3 drugu repliku istog dana, uzorak Fb smrznut je i isporučen drugi dan, a imenovanje je istog tipa (Fb1, Fb2, Fb3). Također, kako bi se pratile i analizirale promjene u sastavu ribe podvrgnute IQF tehnologiji smrzavanja i prikazala potencijalna promjena parametra, na dan ulova izdvojeno je dodatnih 5 triplikatnih uzoraka ribe. Triplikantni uzorci su analizirani na mikrobiološke promjene i na kemijske promjene te se ovaj proces odvijao u vremenskom periodu od 120 dana.

Zbog komparacije odvojeni su i drugi uzorci obrađeni pomoću IQF tehnologije smrzavanja. Prvi triplikantni uzorci imenovani su Z11, Z12, Z13. Drugi triplikantni uzorak odvojen je 30 dana nakon ulova i imenovan Z21, Z22, Z23. Treći triplikantni uzorak odvojen je 45 dana nakon što je riba ulovljena i nosi oznaku Z31, Z32 i Z33. Postupak je ponovljen te je 60 dana nakon ulova ponovno uzet uzorak i imenovan Z41, Z42 i Z43. Posljednji izdvojeni uzorak izdvojen je 120 dana nakon uzorka i imenovan Z51, Z52 i Z53.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Biometrija

Za potrebe biometrijske analize odvojeno je 100 jedinki srdele. Ove jedinke dostavljene su Sveučilištu u Zadru te su analizirane u laboratoriju. Analizom su determinirani parametri poput: totalne dužine srdele koja je iznosila od 12 do 16,5 centimetara, standardne duljine koja je iznosila od 10 do 14 centimetara, mase koja se kretala od 11,69 do 33,37 grama te mase gonada čiji je minimum iznosio 0,03, a maksimum 1,78 grama. Nadalje, utvrđena je i pecatura ribe koja je u ovom slučaju iznosila 52 komada po kilogramu te je ustanovljeno da se u ovom ulovu ne nalaze paraziti. Tablica 3. prikazuje srednje vrijednosti ovih faktora, kao i standardnu devijaciju, maksimum, minimum, ukupan broj i interval pouzdanosti. Svi izračuni napravljeni su pomoću Data Analysis paketa koji je sastavi dio Microsoft Excel programa.

Tablica 3. Prikaz vrijednosti biometrijske analize

<b>Biometrija srdela</b>						
	<b>Srednja vrijednost</b>	<b>Standardna Deviacija</b>	<b>Maksimum</b>	<b>Minimum</b>	<b>Ukupan broj</b>	<b>Interval pouzdanosti</b>
<b>Totalna duljina</b>	<b>13,5</b>	<b>1,02</b>	<b>16,5</b>	<b>12</b>	<b>100</b>	<b>0,2</b>
<b>Standardna duljina</b>	<b>11,5</b>	<b>0,945</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>0,187</b>
<b>Masa</b>	<b>17,37</b>	<b>4,8</b>	<b>33,37</b>	<b>11,69</b>	<b>100</b>	<b>0,95</b>
<b>Masa_gonada</b>	<b>0,5</b>	<b>0,42</b>	<b>1,78</b>	<b>0,03</b>	<b>100</b>	<b>0,08</b>

### 5.2. Mikrobiološka analiza svježih uzoraka

U tablicama 4. i 5. nalaze se rezultati mikrobiološkog istraživanja. Tablica 4. prikazuje mikrobiološke parametre svježe ribe, dok tablica 5. prikazuje rezultate za smrznuti uzorak. U svježem uzorku količina sulfitreducirajućih klostridija nije prelazila 100 cfu/g, dok je količina

Enterobacteriaceae postizala maksimalnu vrijednost u uzorku R-3 koja je iznosila 40 cfu/g, a količina aerobnih mezofilnih bakterija se kretala između 3500 i 19000 cfu/g. Količina sulfitreducirajućih kolisterija i Enterobacteriaceae za smrznute uzorke srdele kretala se u jednakim intervalima kao i svježe, dok su aerobne mezofilne bakterije varirale od 500 do 16600 cfu/g. Analiza se izrazila pomoću cfu/g (colony forming unit) odnosno broja kolonija bakterija u određenom uzorku.

Tablica 4. Prikaz mikrobiološke analize svježe ribe

<b>Mikrobiološka analiza Svježe</b>				
<b>Datum:</b>	<b>Naziv pokazatelja</b>	<b>Sulfitreducirajuće klostridije</b>	<b>Enterobacteriaceae</b>	<b>aerobne mezofilne bakterije</b>
	<b>Mjerna jedinica</b>	<b>cfu/g</b>	<b>cfu/g</b>	<b>cfu/g</b>
<b>09.03.2021.</b>	<b>R-1</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>14900</b>
<b>09.03.2021.</b>	<b>R-2</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>11900</b>
<b>09.03.2021.</b>	<b>R-3</b>	<b>&lt;100</b>	<b>40</b>	<b>8800</b>
<b>10.03.2021.</b>	<b>Fa1</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>15000</b>
<b>10.03.2021.</b>	<b>Fa2</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>19000</b>
<b>10.03.2021.</b>	<b>Fa3</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>3100</b>
<b>11.03.2021.</b>	<b>Fb1</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>3600</b>
<b>11.03.2021.</b>	<b>Fb2</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>5400</b>
<b>11.03.2021.</b>	<b>Fb3</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>3500</b>
<b>12.03.2021.</b>	<b>Fc1</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>40000</b>
<b>12.03.2021.</b>	<b>Fc2</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>13800</b>
<b>12.03.2021.</b>	<b>Fc3</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>11900</b>
<b>15.03.2021.</b>	<b>Fd1</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>11500</b>
<b>15.03.2021.</b>	<b>Fd2</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>5000</b>
<b>15.03.2021.</b>	<b>Fd3</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>16200</b>

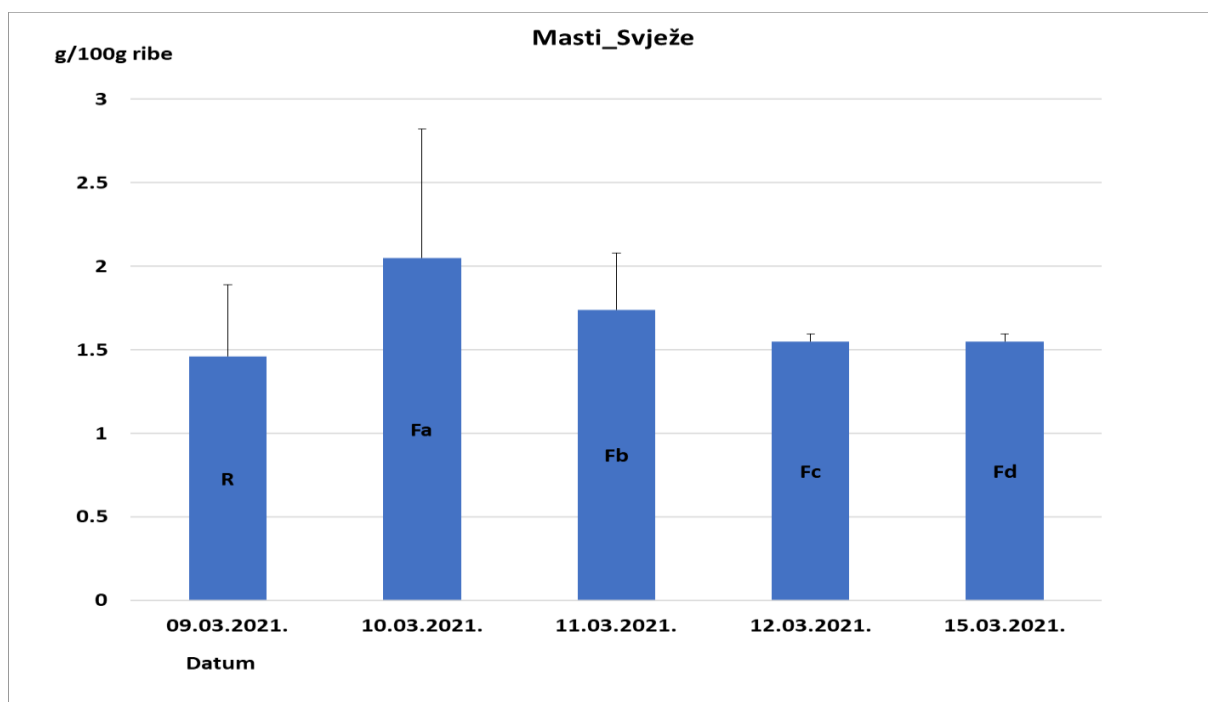
Tablica 5. Prikaz mikrobiološke analize IQF smrznute ribe

<b>Mikrobiološka analiza IQF</b>				
<b>Datum:</b>	<b>Naziv pokazatelja</b>	<b>Sulfitreducirajuće klostridije</b>	<b>Enterobacteriaceae</b>	<b>aerobne mezofilne bakterije</b>
	<b>Mjerna jedinica</b>	<b>cfu/g</b>	<b>cfu/g</b>	<b>cfu/g</b>
<b>09.03.2021.</b>	<b>R-1</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>14900</b>
<b>09.03.2021.</b>	<b>R-2</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>11900</b>
<b>09.03.2021.</b>	<b>R-3</b>	<b>&lt;100</b>	<b>40</b>	<b>8800</b>
<b>19.03.2021.</b>	<b>Z-11</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>12300</b>
<b>19.03.2021.</b>	<b>Z-12</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>9600</b>
<b>19.03.2021.</b>	<b>Z-13</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>3900</b>
<b>09.04.2021.</b>	<b>Z-21</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>1000</b>
<b>09.04.2021.</b>	<b>Z-22</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>500</b>
<b>09.04.2021.</b>	<b>Z-23</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>2600</b>
<b>23.04.2021.</b>	<b>Z-31</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>1800</b>
<b>23.04.2021.</b>	<b>Z-32</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>910</b>
<b>23.04.2021.</b>	<b>Z-33</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>500</b>
<b>07.05.2021.</b>	<b>Z-41</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>3500</b>
<b>07.05.2021.</b>	<b>Z-42</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>2600</b>
<b>07.05.2021.</b>	<b>Z-43</b>	<b>&lt;100</b>	<b>30</b>	<b>16600</b>
<b>07.07.2021.</b>	<b>Z-51</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>4100</b>
<b>07.07.2021.</b>	<b>Z-52</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>6500</b>
<b>07.07.2021.</b>	<b>Z-53</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;10</b>	<b>13000</b>

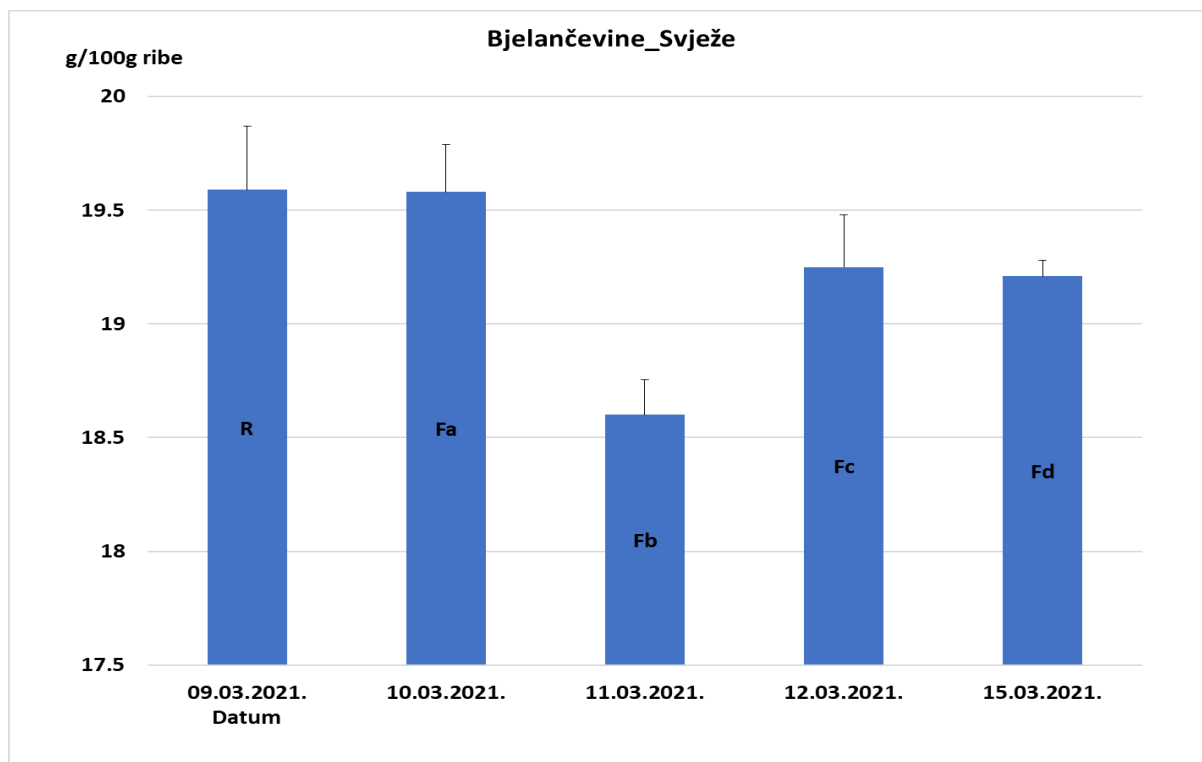


### 5.3. Kemijska analiza svježe i smrznute ribe

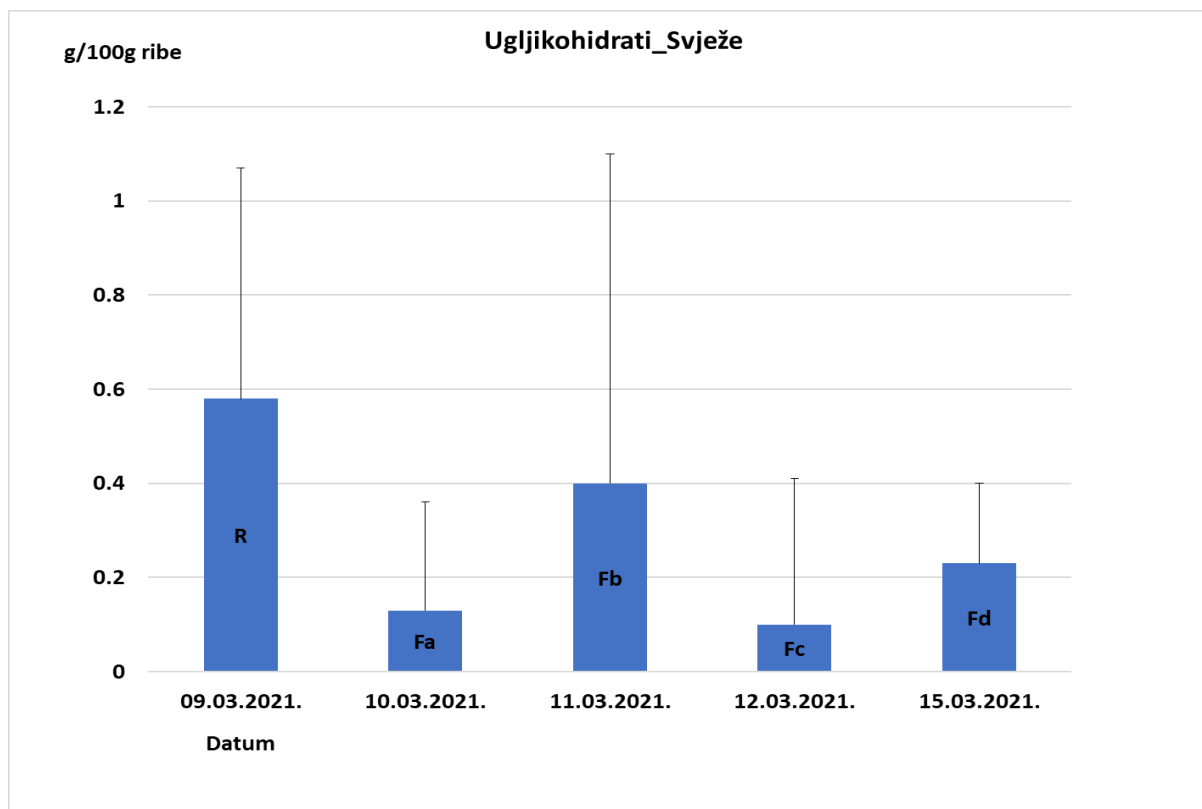
Kemijska analiza provedena je na svježim i smrznutim uzorcima ribe. Na slikama 13.-24., prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija, a analizirane su vrijednosti za masti, bjelančevine, ugljikohidrate, vodu, pepeo i energetska vrijednost. Količina masti za svježu srdelu (Slika 13.) iznosila je od 1,17 do 2,93 grama po 100 grama ribe, dok je kod smrznute srdela (Slika 19.) ova brojka varirala od 1,17 do 2,49 g/100 g ribe. Bjelančevine u svježoj srdeli (Slika 14.) varirale su od 18,53 do 19,91 grama po 100 grama ribe, a za smrznutu srdelu (Slika 20.) od 18,37 do 21,16 g/100g ribe. Varijacija ugljikohidrata jednaka je za svježu srdelu (Slika 15.) i za smrznutu srdelu (Slika 21.), a iznosi od 0 do 1,14 g/100g ribe. Slikom 16. prikazan je količinski sastav vode za svježu srdelu koji iznosi od 74,83 do 78,49 g/100g ribe, dok za smrznutu srdelu (Slika 22.) iznosi od 74,14 do 77,53 g/100g ribe. U svježoj srdeli količina pepela (Slika 17.) iznosila je od 1,82 do 2,39 g/100g ribe, a smrznuta srdela (Slika 23.) ga sadrži od 1,99 do 2,55 g/100g ribe. Posljednji izmjereni kemijski parametar odnosio se na energetska vrijednost koja je za svježu srdelu (Slika 18.) iznosila od 375 do 421 kJ/100g ribe, a za smrznutu srdelu (Slika 24.) od 374 do 449 kJ/100g ribe.



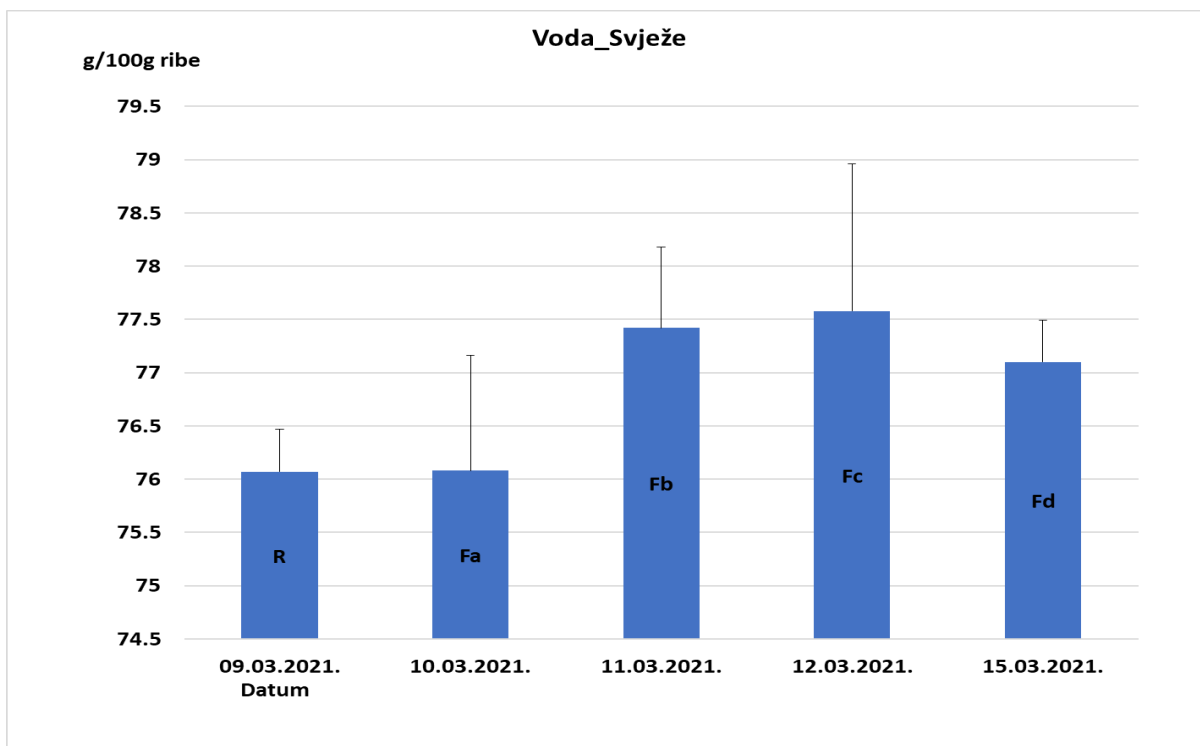
Slika 13. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za količinu masti u svježoj srdeli, ožujak, 2021.



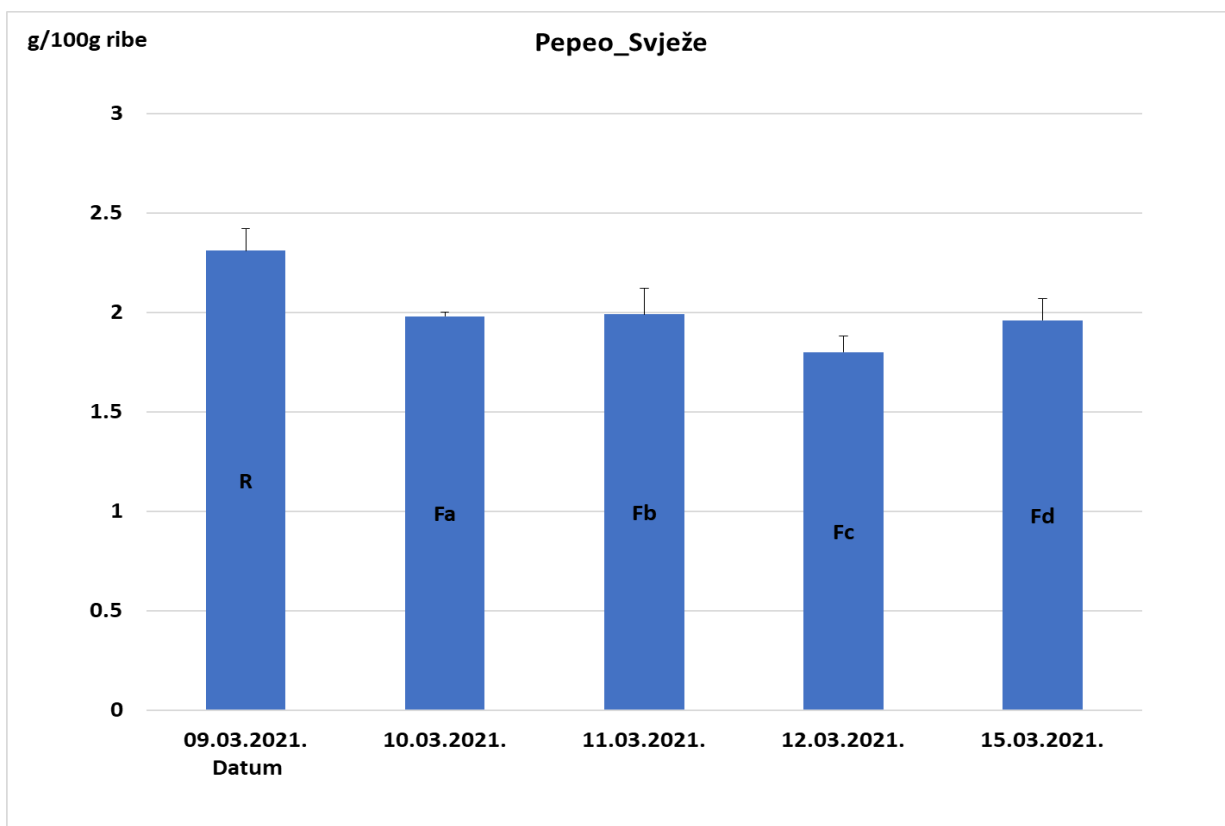
Slika 14. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za količinu bjelančevina u svježoj srdeli, ožujak, 2021.



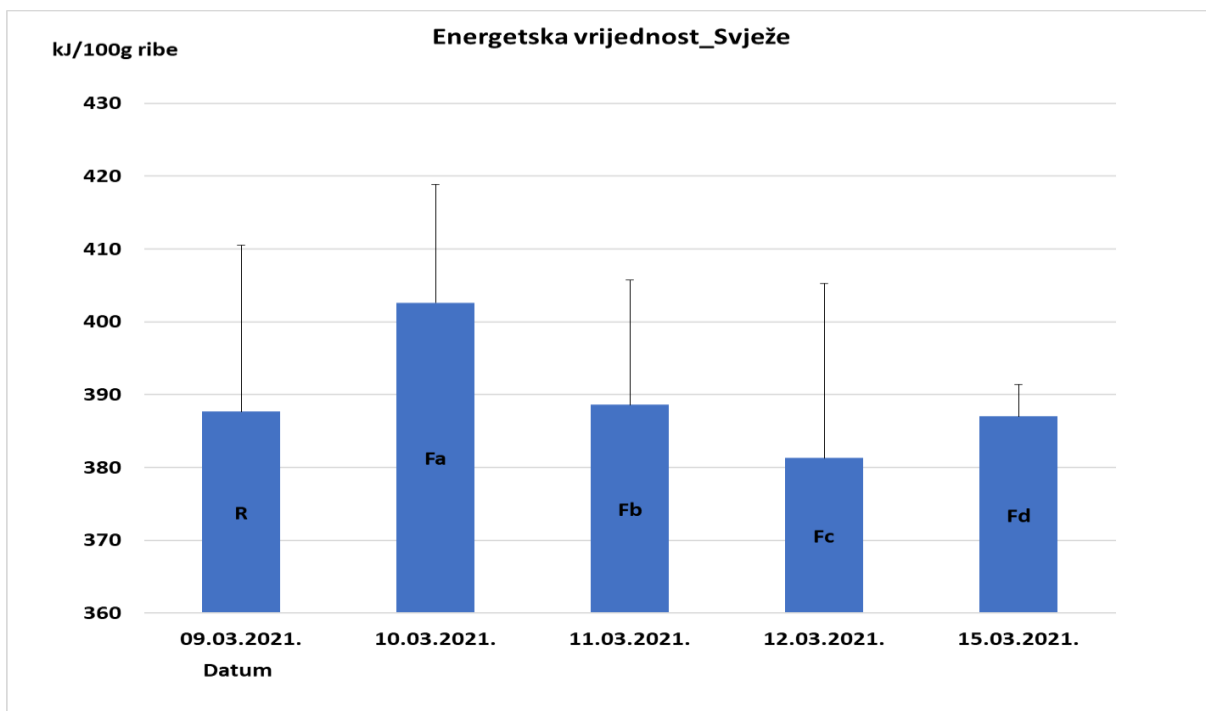
Slika 15. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za količinu ugljikohidrata u svježoj srdeli, ožujak, 2021.



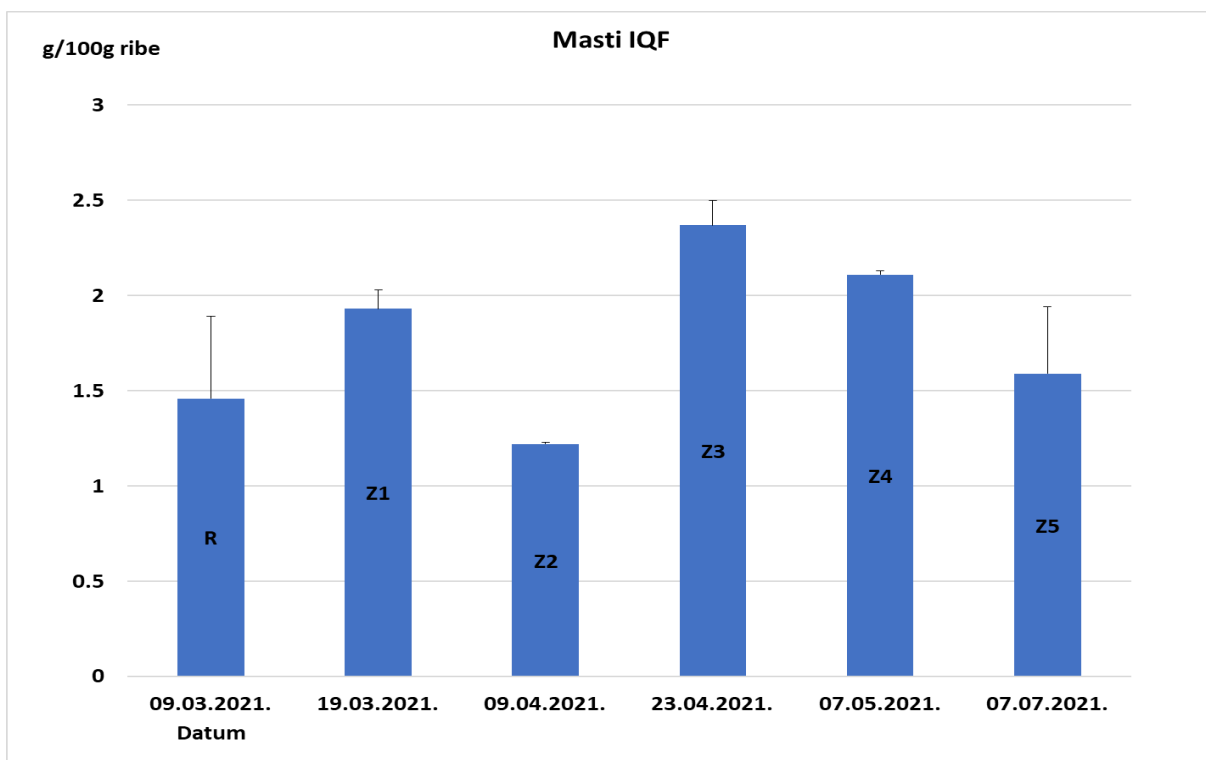
Slika 16. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za količinu vode u svježoj srdeli, ožujak, 2021.



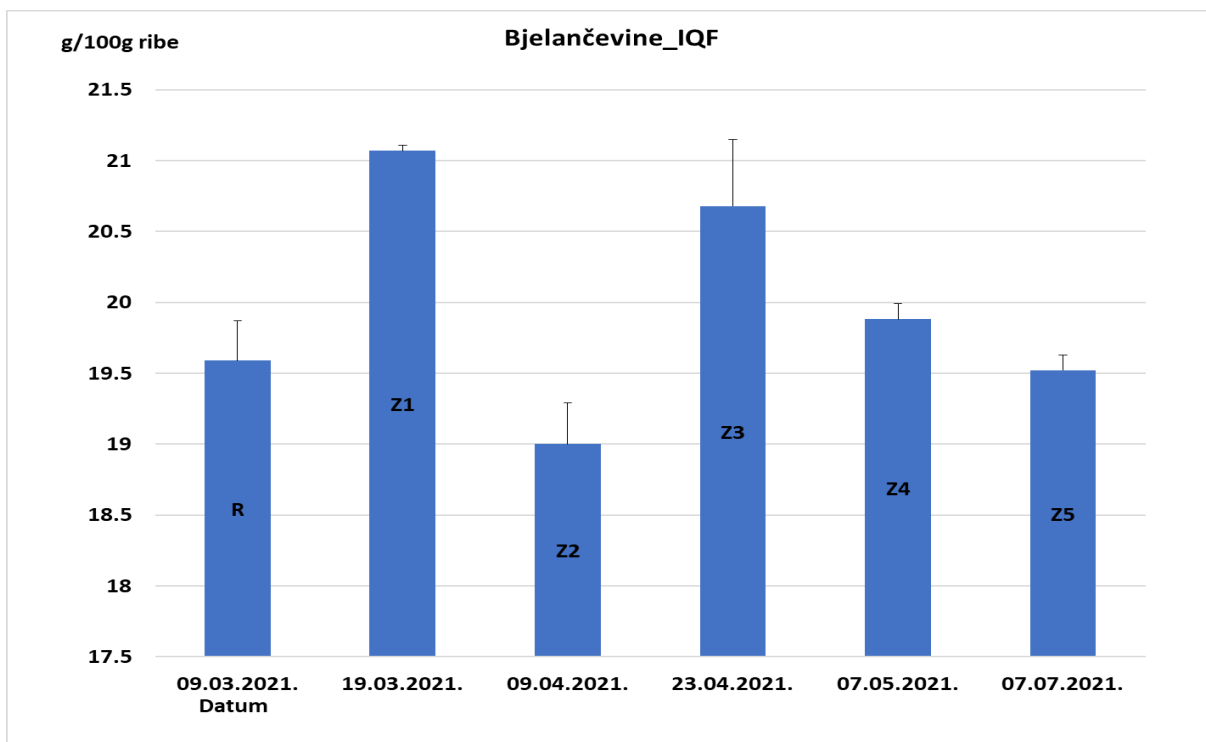
Slika 17. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za količinu pepela u svježoj srdeli, ožujak, 2021.



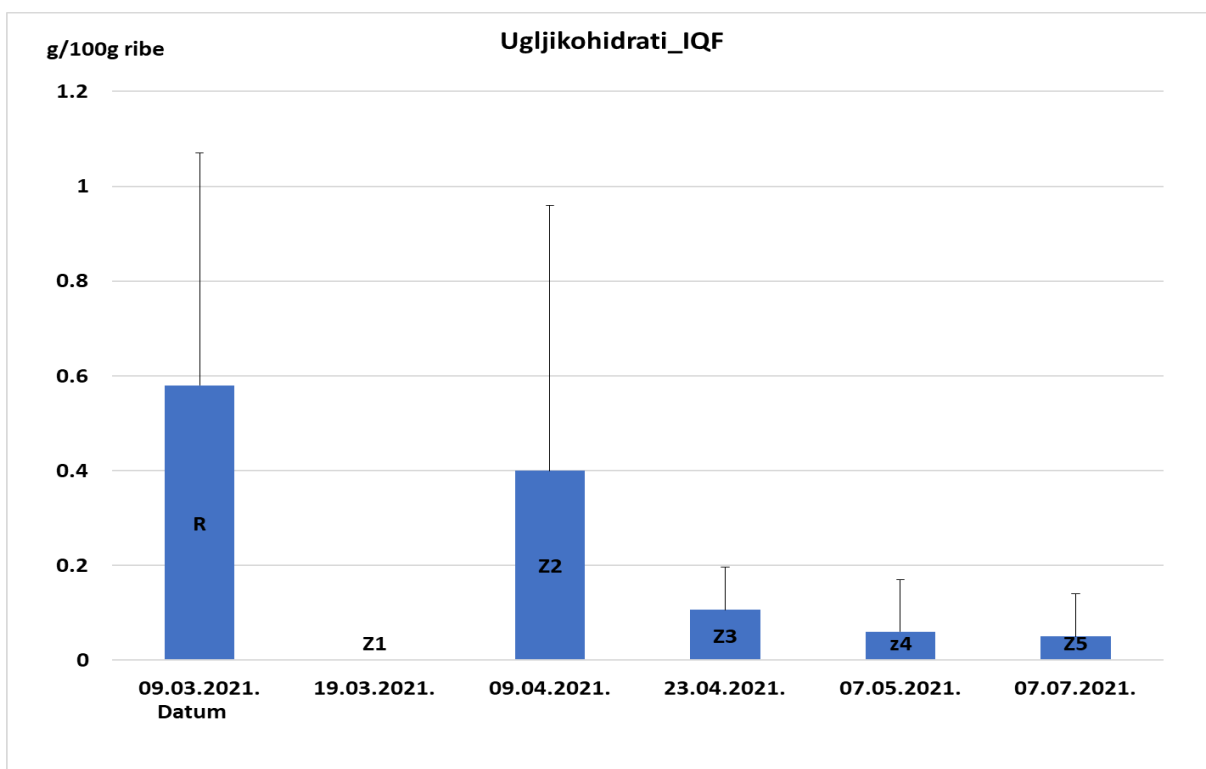
Slika 18. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za količinu energetske vrijednosti u svježoj srdeli, ožujak, 2021.



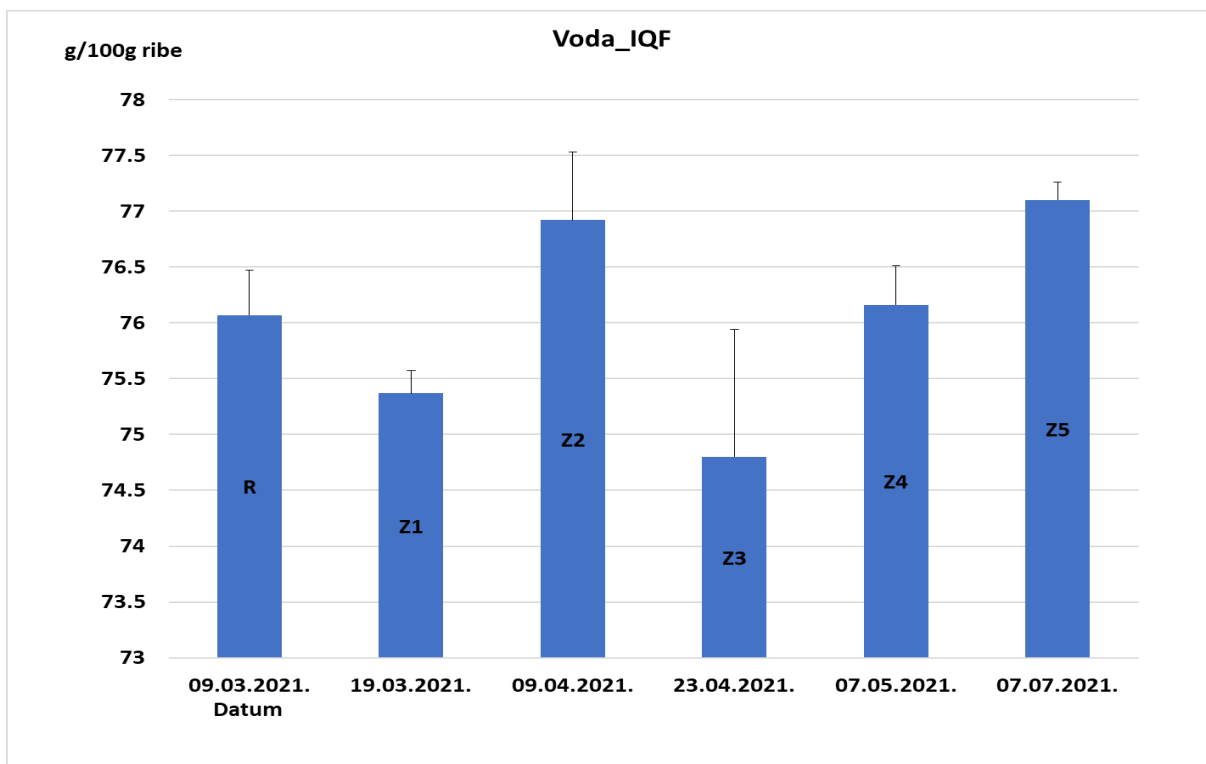
Slika 19. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za količinu masti u smrznutoj srdeli



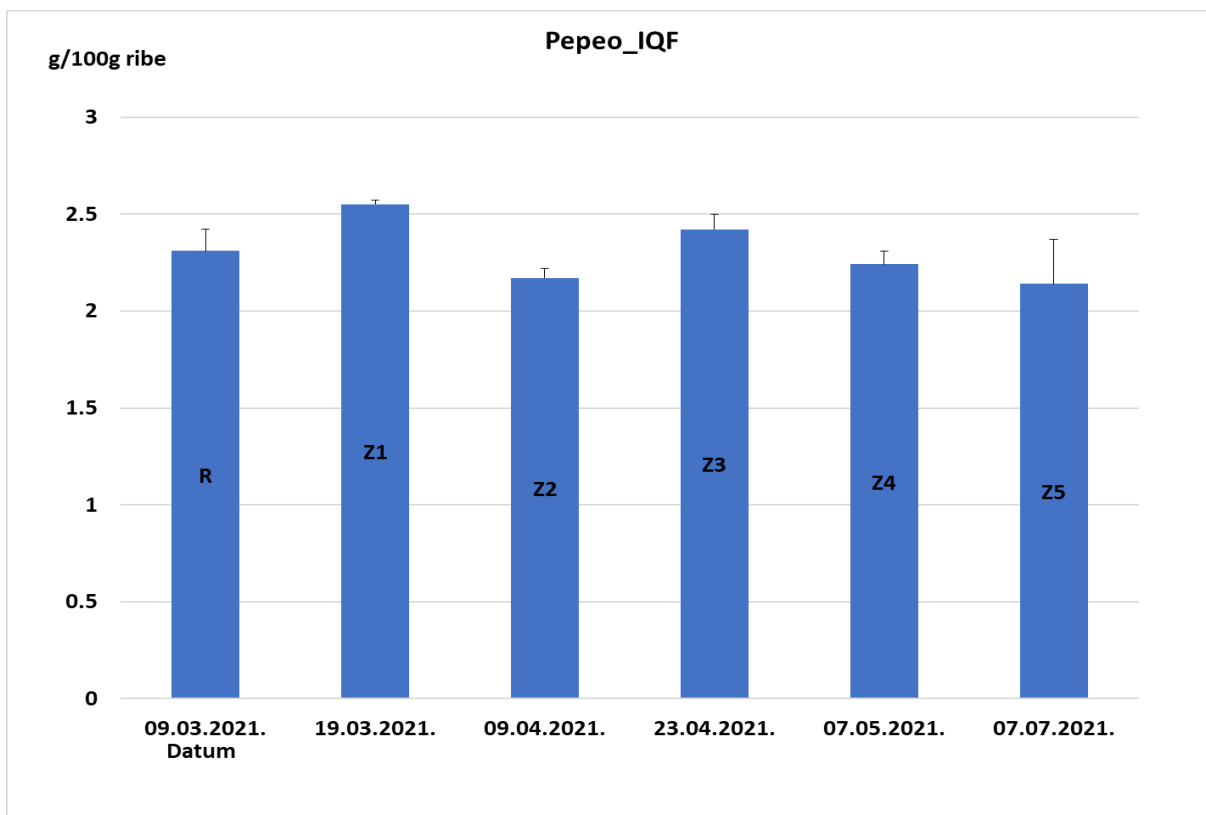
Slika 20. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za količinu bjelančevina u smrznutoj srdeli



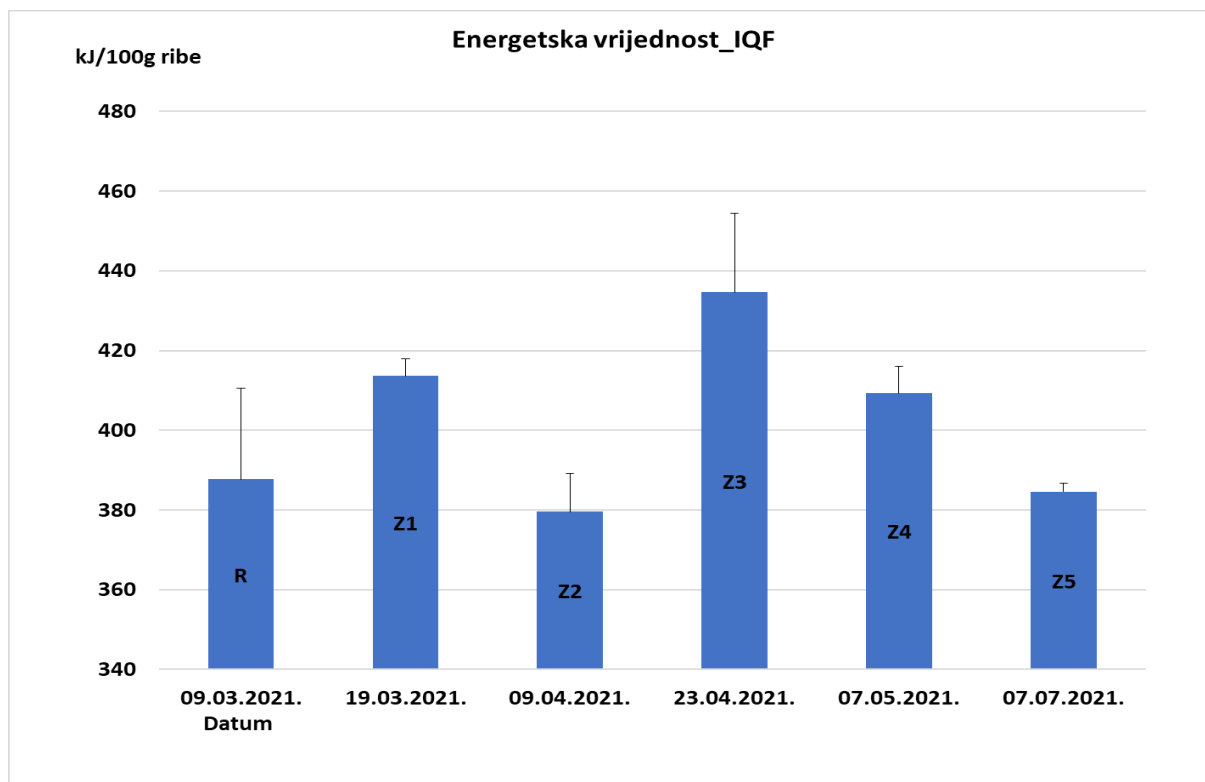
Slika 21. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za količinu ugljikohidrata u smrznutoj srdeli



Slika 22. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za količinu vode u smrznutoj srdeli



Slika 23. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za količinu pepela u smrznutoj srdeli

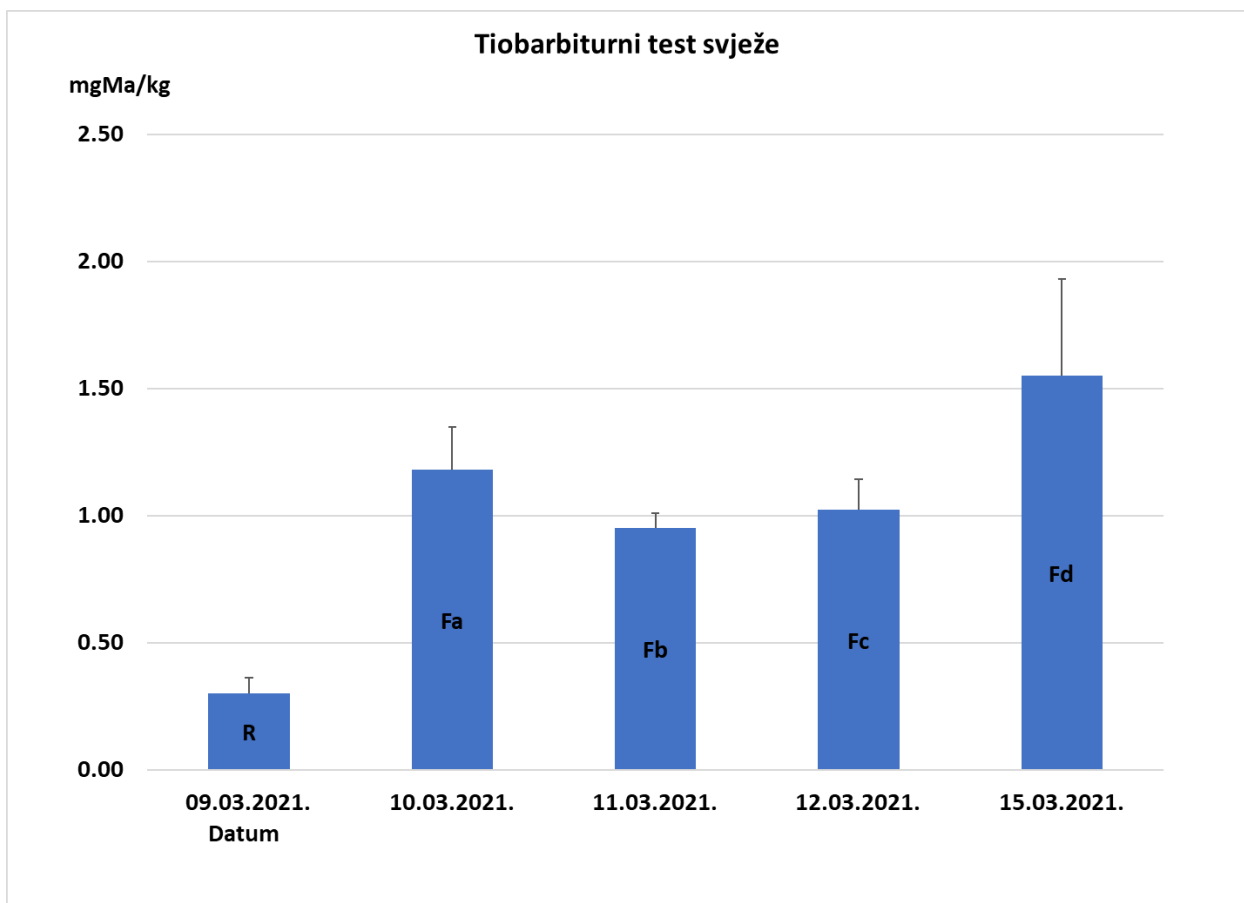


Slika 24. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za količinu energetske vrijednosti u smrznutoj srdeli

U obradi kemijskih parametra za svježu i smrznutu ribu testirani su idući parametri: masti, bjelančevine i voda. Analiza je napravljena kako bi se dokazala homogenost varijance, a test koji se koristio za analizu je Levenov test. Levenov test pokazao je nehomogenost varijance za sva tri parametra te je zbog toga odrađen neparametrijski Kruskal-Wallis test pomoću kojeg se utvrdilo da razlika nije signifikantna na razini od  $p=0,05$ . Na posljetku je korištena Anova median test kako bi se potencijalno utvrdila razlika između srednjih vrijednosti za masti, bjelančevine i vodu unutar grupa svježe i smrznuto te razlika nije utvrđena. Statistička analiza napravljena je pomoću programa Statistica 13.

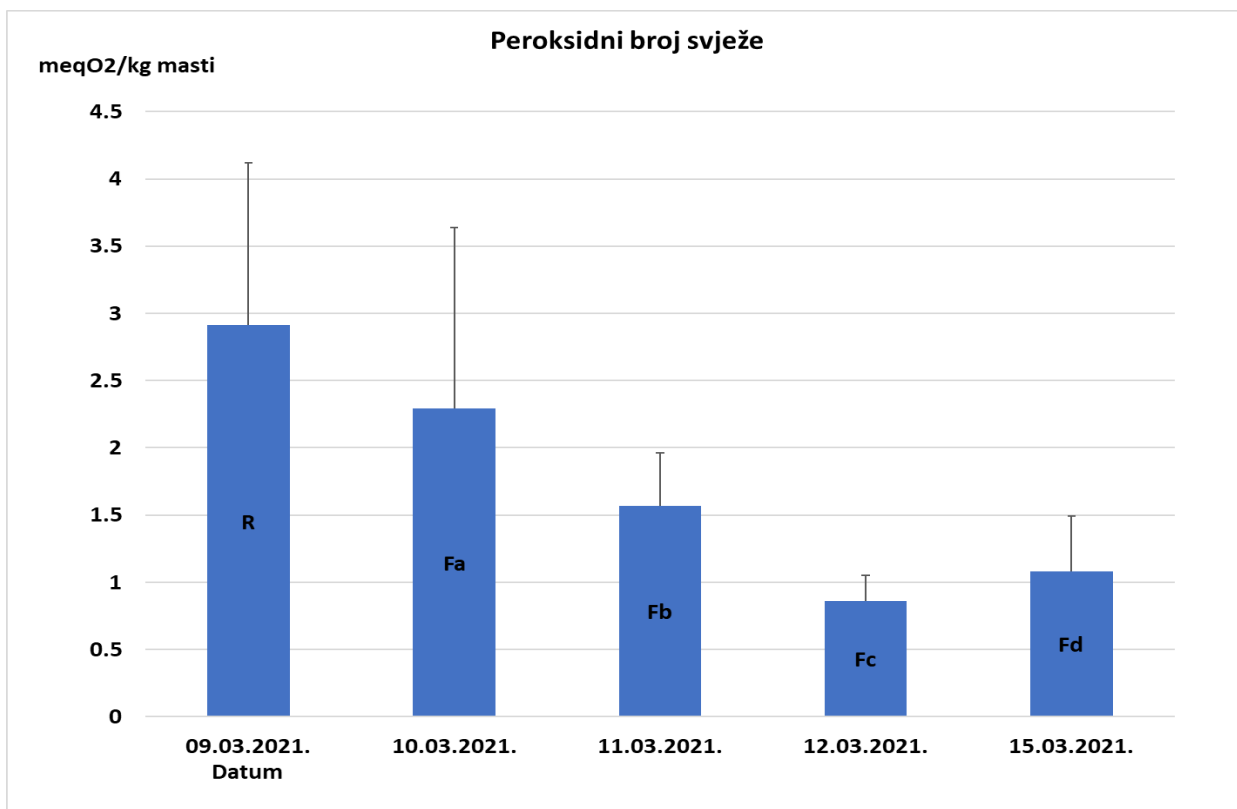
## 5.4. Oksidativni procesi

Rezultati mjerenja oksidativnih procesa prikazani su na slikama 25.-28. Slike su izrađene pomoću Microsoft Excel programa te je u njima uvrštena srednja vrijednost uzoraka i standardna devijacija. Za mjerenje oksidativnih procesa korišten je tiobarbiturni test izražen u mgMa/kg te peroksidni broj izražen u meqO<sub>2</sub>/kg masti. Količina malondialdehida dobivena je tiobarbiturnim testom te je za svježiu srdelu (Slika 25.) varirala od 0,899 do 1,97 mgMa/kg, dok je za smrznutu srdelu (Slika 27.) ova brojka varirala od 0,35 do 1,51 mgMa/kg. Peroksidni broj za svježiu srdelu (Slika 26.) iznosio je od 0,61 do 3,91 meqO<sub>2</sub>/kg, dok je za smrznutu srdelu (Slika 28.) iznosio od 0,44 do 3,91 meqO<sub>2</sub>/kg. Također, provedeno je mjerenje razine histamina koje je prikazano slikom 29. Na slici 29. uvrštena je srednja vrijednost te standardna devijacija za histamin te je njegova vrijednost izražena u mg/kg. Determinacija histamina kod nekih smrznutih uzoraka srdele bila je ispod granice kvantifikacije, dok je maksimalna količina iznosila 8,6 mg/kg ribe.

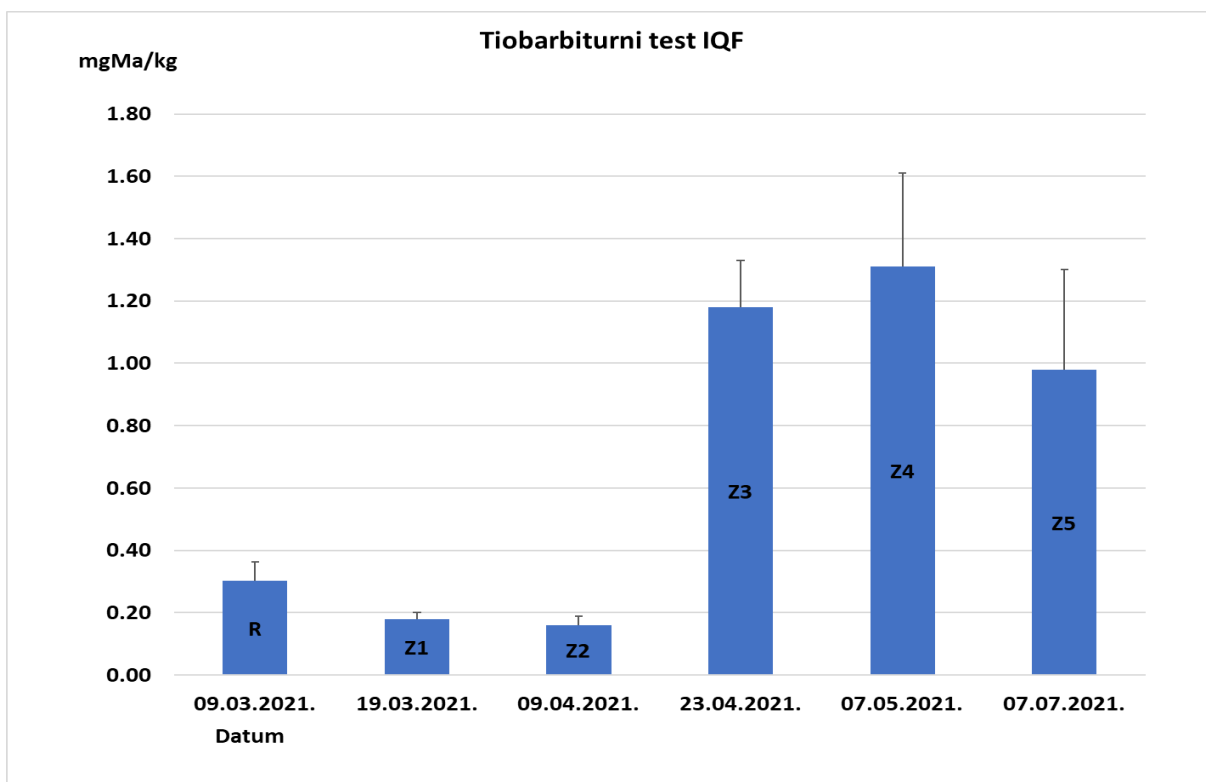


Slika 25. Srednje vrijednosti i standardne devijacije tiobarbitura za svježiu ribu, ožujak, 2021.

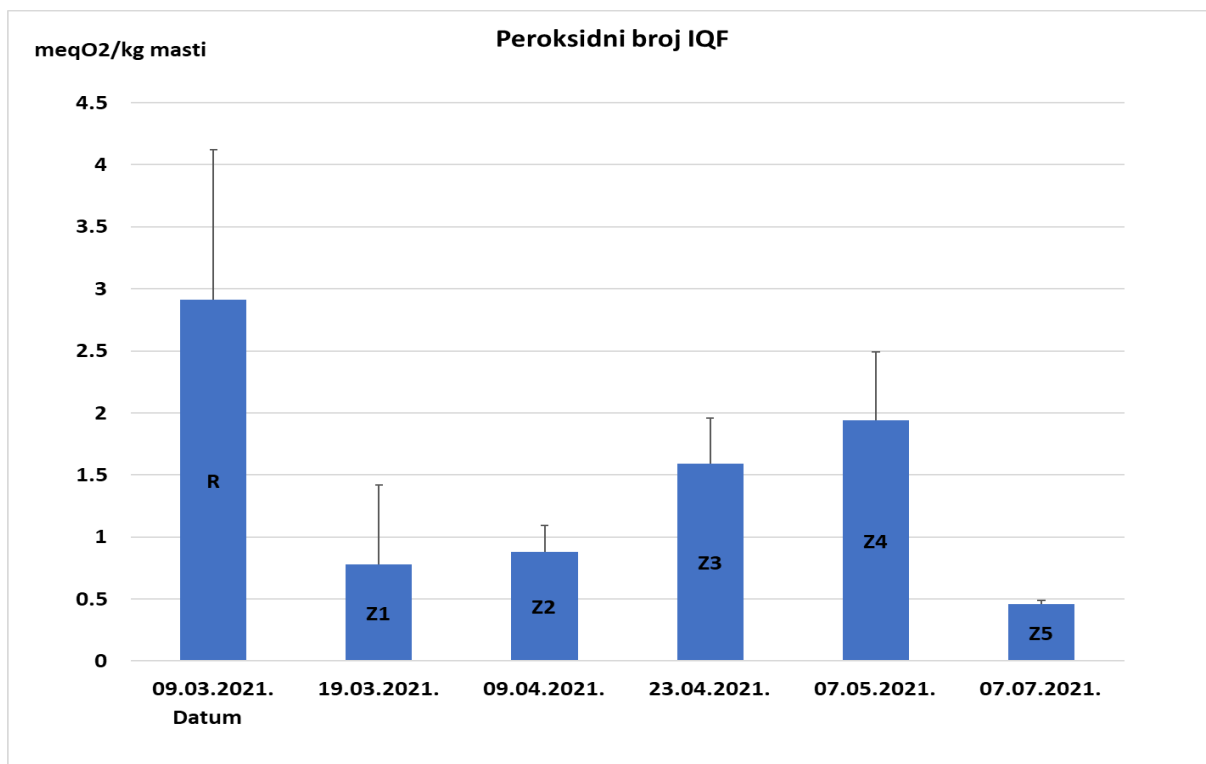




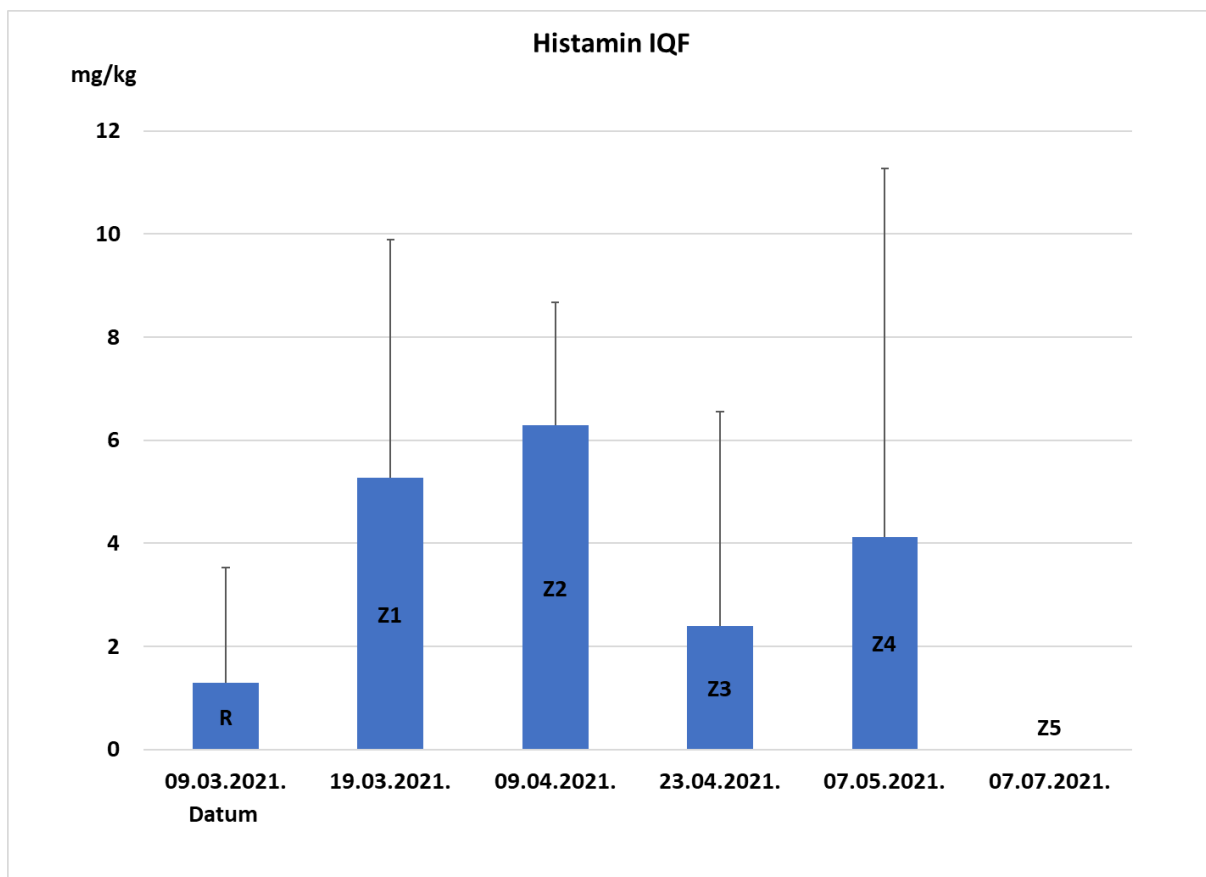
Slika 26. Srednje vrijednosti i standardne devijacije peroksidnog broja za svježu ribu, ožujak, 2021.



Slika 27. Srednje vrijednosti i standardne devijacije tiobarbitura za smrznutu ribu



Slika 28. Srednje vrijednosti i standardne devijacije peroksidnog broja za smrznutu ribu



Slika 29. Srednje vrijednosti i standardne devijacije histamina za smrznutu ribu

Zbog relevantnosti podataka napravljene su daljnje statističke analize tiobarbiturnog testa i peroksidnog broja. Prvotna statistička obrada pokazala je nehomogenost smrznutog segmenta uzorka testiranog Levenovim testom te su zbog nehomogenosti rezultati testirani Kruskal-Wallis testom koji je pokazao da razlika nije signifikantna. Statistička obrada rezultata tiobarbiturnog testa svježeg uzorka pokazala je homogenost uzorka te je zbog toga testirana i značajnost razlike uzorka pomoću višesmjernje analize varijance (ANOVA), prikazane u tablici 6. Test je pokazao signifikantne razlike označene crvenom bojom na razni od  $p < 0,05$  te je napravljena i Post hoc analiza, a za analizu se koristio Tukey HSD test. Razlika po grupama prikazana je u tablici 7. te je također naznačena crvenom bojom. Analiza peroksidnog broja svježe ribe također je pokazala nehomogenost uzorka te je višesmjerna analiza varijance pokazala da razlika nije signifikantna.

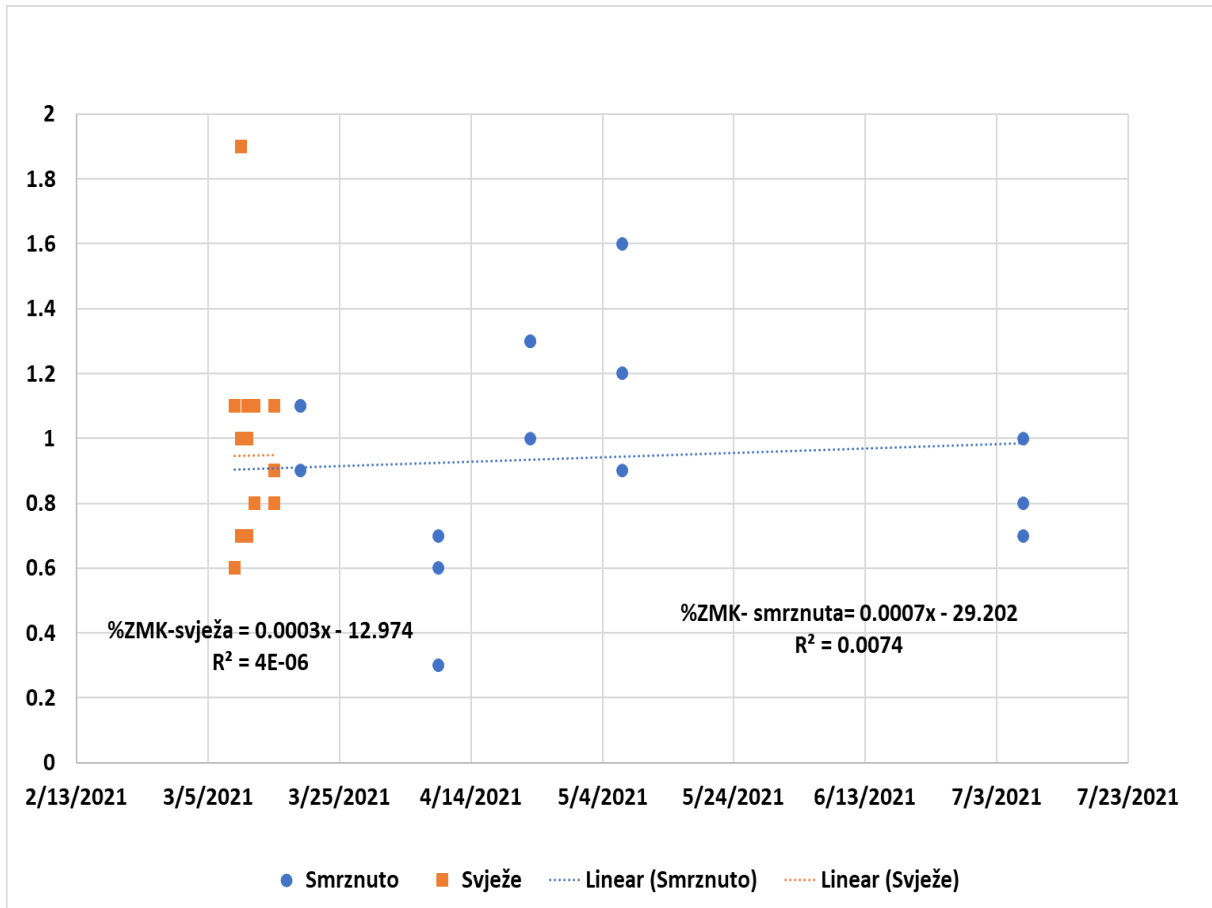
Tablica 6. Prikaz višesmjernje analize varijance tiobarbiturnog testa za svježe uzorke

	Univariate Tests of Significance for TIO svj Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of	MS	F	p
Presjek	15.09615	1	15.09615	371.5190	0.000000
dat	2.48298	4	0.62074	15.2766	0.000291
Error	0.40634	10	0.04063		

Tablica 7. Prikaz razlike po grupama za tiobarbiturni test svježeg uzorka pomoću Tukey HSD testa

Broj	Tukey HSD test					
	dat	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
1	09.03.2021.		0.002487	0.017398	0.009495	0.000276
2	10.03.2021.	0.002487		0.666651	0.870171	0.231695
3	11.03.2021.	0.017398	0.666651		0.993593	0.029966
4	12.03.2021.	0.009495	0.870171	0.993593		0.055909
5	15.03.2021.	0.000276	0.231695	0.029966	0.055909	

Nadalje, napravljena je i regresijska analiza za zasićene masne kiseline. Regresijska analiza obuhvaća zasićene masne kiseline za svježe i smrznute uzorke te je prikazana slikom 30. Analiza je napravljena pomoću Microsoft Excel programa.



Slika 30. Regresijska analiza zasićenih masnih kiselina svježeg i smrznutog uzorka srdele

Zbog velike varijabilnosti u analitičkim rezultatima, regresijskom analizom nije utvrđena promjena zasićenih masnih kiselina po grupi svježe i smrznuto. Količina ukupnih masti je mala pa je ekstrakcija masti uzorka također bila mala.

## 6. RASPRAVA

Srdela se svrstava u porodicu Clupeidae. Ova sitna plava riba često migrira te obitava u zoni pelagijala. Srdela se ubraja u najvažnije vrste riba, a razlog tome je ekonomske i ekološke prirode. Ekonomski gledano, najbrojnija je vrsta u lovinama RH, a ekološki je neizostavan dio hranidbene piramide (Mustać & Sinovčić, 2010).

Uzorkovanje za ovo istraživanje se provodilo u zimskom periodu, kada je temperatura mora niska te je količina dostupnih nutrijenata ograničena. Limitirajući faktori poput temperature mora, dostupnosti nutrijenata, ali i perioda mrijesta srdele dovode do promjena u makrokonstituentima same ribe. Biometrijskom obradom dobivene su prosječne vrijednosti osnovnih parametara te je ustanovljeno da uzorci ne sadržavaju parazite.

Prvo se analizirala totalna duljina čija je maksimalna vrijednost na 100 jedinki iznosila 16 centimetara, a minimalna vrijednost 12 centimetara. Srednja vrijednost totalne duljine iznosi 13,5 centimetara uz standardnu devijaciju od 1,02 te interval pouzdanosti od 0,2. Analizirane vrijednosti slične su i u drugim istraživanjima. Mustać i Sinovčić (2010) su morfometrijskom analizom srdela u Zadarskom području došli do totalne duljine koja varira od 13 do 19 centimetara. Istraživanje koje je provela Silva (2003) također pokazuje sličnu duljinu srdele čija je srednja vrijednost iznosila 15 centimetara.

Masa jedinki u ovom istraživanju postigla je maksimalnu vrijednost od 33,37 grama te minimalnu od 11,69. Srednja vrijednost mase iznosi 17,37 grama uz devijaciju od 4,8 i interval pouzdanosti od 0,95. Mustać et al. (2020) su u istraživanju parametra za rast srdela koje obitavaju na istočnoj obali Jadranskog mora (n=2453) analizirali masu te je ona varirala od 6,14 grama do 45,73 grama. U njihovom istraživanju visoka stopa varijabilnosti mase uzorka može se objasniti brojnošću uzoraka.

Nadalje, u provedenom istraživanju također se mjerila i masa gonada. Gonade su bile u visokom stadiju zrelosti što je i bilo očekivano obzirom da se period uzorkovanja ribe podudara sa periodom mrijesta srdele. Nezrele gonade srdele imaju u periodu od lipnja do kolovoza, a najveća zrelost je utvrđena u veljači (Pešić et al., 2010; Zorica et al., 2019). Maksimalna masa gonada u ovom istraživanju iznosila je 1,78 grama, a minimalna 0,03. Srednja vrijednost mase gonada je 0,5 grama sa standardnom devijacijom od 0,42 i intervalom pouzdanosti od 0,08.

Istraživanje kvalitativnih parametra ne bi bilo potpuno bez mikrobiološke analize. Ovo istraživanje fokusiralo se na tri mikrobiološka faktora, a to su sulfitreducirajuće kolisterije,

*Enterobacteriaceae* i aerobne mezofilne bakterije. Količina mikroorganizama izražena je pomoću cfu/g (colony forming unit) odnosno broj kolonija bakterija u određenom uzorku. Sam uzorak nije pokazao zabrinjavajuće brojke te su svi rezultati bili unutar prihvatljivih granica zadanih Hrvatskom regulativom (NN 74/08, 2008). Iako je u ovom istraživanju pronađena manja količina mikroorganizama, Gillespie et al. (2001) prepoznali su mikrobiologiju namirnica kao ozbiljan problem pogotovo u preradi hrane te je dokazano da 10 do 25% hrane koja uzrokuje trovanja šire populacije proizlazi od marinskih organizama. Porast broja mikroorganizama na i unutar ribe generalno se prepisuje nestručnom rukovanju, povišenoj temperaturi i lošem skladištenju samog proizvoda (Bryan, 1988). Miladi et al. (2008) su dokazali da pravilnim skladištenjem (temperatura od  $-20^{\circ}\text{C}$ ) bakteriološka aktivnost gotovo prestaje.

Kemijskom analizom svježe ribe utvrđeno je stanje za iduće parametre: masti, bjelančevine, ugljikohidrati, voda, pepeo i energetska vrijednost. Zbog statističkog prikaza i analize rezultata uzorci su podijeljeni u grupaciju od tri (triplikanti) po datumima (09.03.2021, 10.03.2021, 11.03.2021, 12.03.2021, 15.03.2021) te su imenovani (R, Fa, Fb, Fc, Fd) zbog lakšeg praćenja. Prvom analizom utvrđene su količine masti u svježoj ribi (poleđena na brodu) te su u rezultatima prikazane srednje vrijednosti i standardna devijacija (Graf 1.). Količina masti u jedinki prikazana je u gramima na 100 grama ribe. Maksimalna količina masti pronađena je u uzorku Fa gdje je srednja vrijednost triplikanta uzorka iznosila  $2,05 \pm 0,77$ , dok je minimalna vrijednost masti pronađena u uzorku R iznosila  $1,46 \pm 0,43$ . Istraživanje Kolege (2021) pokazalo je velike razlike u količini masti srdela u odnosu na ovo istraživanje, masti su varirale od 8 do 10,5 grama po 100 grama ribe. Analiza masti koje je proveo Kolega (2021) bazirala se na uzorak prikupljen u ljetnom periodu kad su ambijentalni uvjeti drugačiji, a srdela se nalazi u spolnom mirovanju. Bandararra et al. (1997) zaključili su da period istraživanja ima veliki utjecaj na kemijski sastav srdele, naime niska količina lipida uzrokovana je mobilizacijom masti za vrijeme mrijesta te se veći dio lipidnih zaliha troši zbog procesa gametogenoze. Leonardis et al. (2004) u rezultatima istraživanja navode da je prosječna vrijednost masti srdela ulovljenih između siječnja i ožujka iznosila  $2,7 \pm 1,2$ , što se poklapa s rezultatima provedenog istraživanja. Novije istraživanje provedeno od Šimat et al. (2020) također je potvrdilo sezonske varijacije lipida gdje je najmanja vrijednost zabilježena u zimskom razdoblju i iznosila je manje od 2%.

Srednje vrijednosti bjelančevina svježe ribe nisu puno varirale, s maksimalnom vrijednošću od  $19,59 \pm 0,28$  (uzorak R) grama na 100 ribe te minimalnom  $18,6 \pm 0,155$  (uzorak Fb) grama na 100 grama ribe (Slika 14.). Numes et al. (1992) u svom istraživanju kemijskog sastava srdele dobili su slične rezultate (15-18 g/100g ribe), a primijećena odstupanja ovisno o

godišnjem periodu i uvjetima iznosila su 2-5%. Kolega (2021) je također u svojim rezultatima naveo relativno konstantan broj od 15 do 20 grama na 100 grama ribe.

Najmanje zastupljeni makrokonstituenti u srdeli su ugljikohidrati, naime ukupni postotak iznosi od 0,5 do 0,8 te se primarno nalazi u ribi kao glikogen (Cvrtila & Kozačinski, 2006). Prilikom mjerenja količina ugljikohidrata u svježe ribe, uzorak R ponovno je imao najveću srednju vrijednost od  $0,58 \pm 0,49$  te je uzorak Fc imao najmanju količinu od  $0,1 \pm 0,31$  grama na 100 grama ribe (Slika 15.). Istraživanje Erkana & Ozdena (2008) pokazalo je malo veću količinu ugljikohidrata usporedno s rezultatima ovog istraživanja od  $1 \pm 0,34$  %. Manje razlike u količini ugljikohidrata mogu se prepisati faktorima kao što su nutritivni stres (zbog vremenskog perioda istraživanja limitirani su nutrijenti u vodenom stupcu) i umor (Nadia et al., 2011).

Meso srdela sadrži relativno puno vode, a ta brojka iznosi između 60-80% (Cvrtila & Kozačinski, 2006). Maksimalna količina vode pronađena je u uzorku Fc te je iznosila  $77,58 \pm 1,38$  g na 100 grama ribe (Slika 16.). Količina vode sukladna je i sa istraživanjem provedenim od Levak et al. (2014) gdje stoji da su varijacije od 66,8 do 78,1%.

Posljednje dvije stavke kemijske analize za svježe uzorke su količina pepela i energetska vrijednost srdela. Maksimalna količina pepela nalazila se u uzorku R (Slika 17.) te je iznosila  $2,31 \pm 0,11$  g na 100 grama ribe dok se je maksimalna energetska vrijednost nalazila u uzorku Fa i iznosila  $402,6 \pm 16,25$  kJ (Slika 18.). Kemijski sastav pepela unutar je granica te je u literaturi naveden normativ koji iznosi između 1 i 2 %. Energetska vrijednost također odgovara normama te manja varijacija ovisi o vremenskom periodu u kojem su jedinice uzorkovane (Campanini et al., 2021)

Kako bi se utvrdile promjene kvalitativnih parametara napravljena je analiza svih spomenutih parametara i za smrznutu ribu. Mikrobiološke vrijednosti ostale su iste odnosno razlika nije statistički značajna stoga se proizvod smatra ispravnim (Tablica 5.). Zaleđena riba se zbog statističkog prikaza i analize rezultata podijelila u grupaciju od tri (triplikanti) po datumima (09.03.2021, 19.03.2021, 09.04.2021, 23.04.2021, 07.05.2021, 07.07.2021) te su imenovani (R, Z1, Z2, Z3, Z4, Z5) zbog lakšeg praćenja. Nadalje, provedeno je i testiranje razlike između srednjih vrijednosti za kemijske parametre: masti, voda i za proteine unutar grupe smrznuto i svježe. Testiranje razlika po grupama važno je kako bi se determinirale moguće kvalitativne promjene i/ili degradacije kroz period od 120 dana. Ovom analizom nije utvrđena statistički signifikantna razlika između grupa svježe i smrznuto. Istraživanjem koje je proveo Kolega (2021) utvrđene su signifikantne razlike po grupacijama svježe i smrznuto, primarno u količini vode i masti. Moguće obrazloženje razlika u rezultatima između ovog

istraživanja i istraživanja kojeg je proveo Kolega leži u ambijentalnim uvjetima. Kolegino istraživanje baziralo se na rezultatima srdela uzorkovanih u ljetnom periodu, dok se ovo istraživanje baziralo na rezultatima srdela uzorkovanih u zimskom periodu. Kemijski gledano morska ihtiofauna generalno sadrži 16-21% proteina, 0,2-25% lipida, 66-81% vode (Huss, 1995). Nadalje, velika varijabilnost u brojevima ovisi o promatranoj vrsti, spolu, okolišnim uvjetima i vremenskom periodu promatranja. Kroz ljetni period vodeni stupac sadrži veće količine nutrijenata koje ribe pohranjuju. Višak nutrijenata se konverzijom prijenosi te kratkotrajno raste količina proteina (malen rast u postocima). Prekomjernim hranjenjem raste i postotak masti. U zimskom razdoblju odvija se period gladovanja, a kod srdela i period mrijesta što može utjecati na razliku u rezultatima (Boran & Karaçam, 2011; Mkađem & Kaanane, 2020).

Također, napravljena je i linearna regresijska analiza za zasićene masne kiseline. Regresijska analiza obuhvaća zasićene masne kiseline za svježe i smrznute uzorke te je prikazana slikom 30. Zbog velike varijabilnosti u analitičkim rezultatima u ovom istraživanju nije utvrđena promjena u zasićenim masnim kiselinama. Količina ukupnih masti je mala pa je samim time i ekstrakcija masti mala. Garrido et al. (1989) u svom istraživanju navode da su membranski lipidi manje podložni procesima oksidacije. Kolega (2021) je u svom istraživanju naveo distinktivnu razliku masti između svježih i smrznutih uzoraka, moguće objašnjenje leži u periodu uzorkovanja tj. količini masti u jedinkama kao i načinu pohrane lipida.

Kako bi se moguća promjena u kvalitativnim parametrima u potpunosti definirala napravljeno je i mjerenje oksidativnih procesa. Provjera stupnja oksidacije veoma je važna kod kvalitativnog istraživanja srdela. Srdela pripada skupini masnih riba tj. postotak masti nadilazi 8% (Cvrtila & Kozačinski, 2006). Činjenica da se radi o masnijoj ribi govori koliko je važno ustvrditi stupanj oksidacije. Kako bi se provjerio stupanj oksidacije u ovom istraživanju provedeni su tiobarbiturni test (Slika 25.) i peroksidni broj za svježe i smrznute uzorke (Slika 26.). Zbog statističke analize i lakšeg prikaza uzorci su poredani po datumima (09.03.2021, 10.03.2021, 11.03.2021, 12.03.2021, 15.03.2021) te su sukladno imenovani (R, Fa, Fb, Fc, Fd). Isti postupak napravljen je i za uzorke zaleđene IQF tehnologijom (09.03.2021, 19.03.2021, 09.04.2021, 23.04.2021, 07.05.2021, 07.07.2021) te su imenovani (R, Z1, Z2, Z3, Z4, Z5). Stupanj oksidacije za tiobarbiturni test izražen je pomoću mgMA/kg što označava milimolondialdehide po kilogramu masti, a za peroksidni broj pomoću meqO<sub>2</sub>/kg što označava miliekvivalent od aktivnog kisika po kilogramu masti.

Tiobarbiturni test za svježnu ribu postigao je najveću srednju vrijednost za uzorak Fd te je iznosio  $1,55 \pm 0,38$  mgMA/kg. Statističkom analizom utvrđena je signifikantna promjena po



grupama tj. vidljiv je porast u stupnju oksidacije kroz period skladištenja ribe (Tablica 6. i 7.). Iako je uzorak Fd imao blago povišenu količinu tiobarbitura u odnosu na ostale uzorke, riba se svejedno smatra ispravnom tj. svježom. Riblje meso u kojem je količina tiobarbitura ispod 5 mgMA/kg smatra se ispravnim za korištenje te se takva riba prezentira kao svježja namirnica (Ukekpe et al., 2014). Moguće objašnjenje povećanog stupnja oksidacije leži u lošem rukovanju prilikom uzorkovanja, smanjene količine leda ili lošeg skladištenja ribe. Stupanj oksidacije primarno raste porastom temperature (Bremner et al., 2002).

Ukekpe et al. (2014) su u svojem istraživanju analizirali stupanj oksidacije 5 ekonomski najviše eksploatiranih vrsta u Nigeriji: *Schilbe mystus*, *Bagrus bayad*, *Oreochromis niloticus*, *Clarias anguillaris* i *Petrocephalus bane bane*. Količina tiobarbiturata za ovih 5 vrsta varirala je od 0,42 do 0,92 mgMA/kg za ribu koja je stara 1 sat, no već nakon 6 sati pri povišenim temperaturama ova brojka došla je do 7,4 mgMA/kg. U konkluziji povišene temperature uzrokuju drastičan pad kvalitete ribe zbog rasta stope oksidacije lipida.

Maksimalna količina peroksida u ovom istraživanju zabilježena je na uzorku R te je iznosila  $2,91 \pm \text{meqO}_2/\text{kg}$ . Statističkom obradom peroksidnog broja nije utvrđena signifikantna razlika iako je zabilježen pad. Rezultati istraživanja peroksida su u granici normale. Dhakal et al. (2022) su u svom istraživanju objavili da se količina od 10 do 20 meqO<sub>2</sub>/kg još uvijek smatra prihvatljivom. Iako se razine peroksida smatraju prihvatljive za konzumacije nisu u skladu s očekivanjima, naime porastom oksidacije očekuje se i porast peroksidnog broja osobito kroz period stajanja ribe (Aubourg et al., 1998).

Uzorci zamrznuti IQF tehnologijom nisu pokazali nikakva odstupanja odnosno statistička obrada nije pokazala značajnu razliku u rezultatima za tiobarbiturni test i peroksidni broj. Količina tiobarbitura se kretala od  $0,16 \pm 0,03$  do  $1,31 \pm 0,3$  mgMA/kg, dok je peroksid varirao od  $0,46 \pm 0,03$  do  $2,91 \pm 1,21$  meqO<sub>2</sub>/kg. Moguće je da je stupanj oksidacije zaleđene ribe niži i ne povećava se kroz vrijeme zbog boljeg rukovanja i kvalitete smrzavanja koja bolje čuva svojstva (Romotowska et al., 2016).

Posljednje kvalitativno istraživanje srdele odnosi se na količinu histamina. Histamin je biogeni amin te nastaje zbog mikrobiološke aktivnosti (Visciano et al., 2014). Istraživanje koje su proveli Shakila et al. (2003) pokazalo je kako svježja riba ima relativno malu količinu histamina dok ovaj broj uvelike raste s kvarenjem ribe. Količina histamina u ovom istraživanju izražena je pomoću mg/kg tj. miligram supstance po kilogramu ribe te je granica kvantifikacije iznosila 2,1 mg/kg. U svježim uzorcima povećana količina histamina nije zabilježena odnosno bila je ispod razine kvantifikacije. U uzorcima zamrznutim IQF tehnologijom primijećeno je blago povišena koncentracija histamina (Slika 29.), od uzorka R1 do Z2 raste nakon čega

stagnira i/ili pada što nije za očekivati s obzirom da histamin raste sa stupnjem propadanja mesa. Maksimum histamina zabilježen je u uzorku Z2 te je iznosio  $6,29 \text{ mg/kg} \pm 2,38$ . Potencijalno objašnjenje stagnacije i/ili pada leži u brojnosti uzoraka istraživanja, naime kako bi se dobili reprezentativni podaci za histaminsko mjerenje potrebno je proširiti uzorkovanje. Druga mogućnost stagnacije je temperaturne prirode. FDA (Food and Drug Administration (2011)) objavila je istraživanje u kojem se navodi da temperatura od  $-18^{\circ}\text{C}$  ili niže u potpunosti zaustavlja bakterije i time stagnira rast količine histamina u ribi.

Količina histamina analiziranog u ovom istraživanju ne premašuje zakonske regulative, naime IQF tehnologija smrzavanja sitne plave ribe limitirana je na  $20 \text{ mg/100g}$  proizvoda (Food Standards Australia New Zealand, 2016).

## 7. ZAKLJUČAK

Srdela (*Sardina philcardus*) se svrstava u jednu od ekonomski najznačajnijih vrsta Jadranskog mora. Osim ekonomske važnosti valja naglasiti i njenu nezamjenjivost u hranidbenoj piramidi, gdje se nalazi iznad planktonskih organizama te time povezuje niže trofičke razine sa višim. Hranjive vrijednosti srdele od izričite su važnosti osobito u pogledu masnih kiselina koje pružaju brojne beneficije ljudskom tijelu. Osim kemijskih promjena u sastavu lipida valja naglasiti i beneficije koje pružaju bjelančevine. Proteinski sastav ihtiofaune postao je osobito popularan u zadnjih nekoliko godina zbog lake probavljivosti. Nadalje, konzumacijom srdele dobiva se odličan omjer unešenih makrokonstituenata primarno proteini i masti uz relativno niski postotak unešene hranjive vrijednosti.

Očuvanje kvalitativnih svojstva jedna je od glavnih zadataka metoda konzervacije. Uz prezervaciju makrokonstituenata, prerada ribe bazira se i na spriječavanju kontaminacije mikroorganizmima. Konzervacijom se pokušavaju zaštititi kemijska svojstva srdele na temelju koje ona dobiva važnost i cijenu na tržištu. Napredak tehnologije utjecao je i na tehnološke procese konzervacije te su se počeli javljati novi postupci poput IQF tehnologije brzog smrzavanja. IQF tehnologija pruža pojedinačno smrzavanje svake jedinice te se time kvalitativna svojstva ne mijenjaju puno odnosno riba duže ostaje svježja.

Cilj ovog istraživanja bio je ukazati na moguću promjenu i/ili degradaciju kvalitativnih parametara srdele prilikom korištenja IQF tehnologije u odnosu na tradicionalnije poleđivanje ribe. Rezultatima istraživanja nisu utvrđena nikakva značajna odstupanja u kvalitativnim parametrima, ali je pokazana signifikantna vrijednost u tiobarbiturnom testu odnosno stupnju oksidacije ribe odrađenom na svježim jedinkama. Pojava oksidacijskih promjena u svježoj ribi ukazuje na potencijalne nepravilnosti prilikom rukovanja samom ribom, također moguće objašnjenje leži i u temperaturi koja je glavni faktor stupnja oksidacije lipida. Analiza rezultata IQF tehnologije smrzavanja nije prikazala signifikantnu promjenu kemijskih parametara kao ni značajnu promjenu stupnja oksidacije. Nedostatak tih kvalitativnih promjena ne mora nužno značiti da je IQF tehnologija smrzavanja bolja metoda konzerviranja od klasičnog hlađenja ledom. Kako bi se rezultati upotpunili trebala bi se provesti i daljnja istraživanja s većim brojem uzoraka. Analiza većeg broja uzorka pridodala bi kreditaciji ovog tehnološkog postupka smrzavanja. Isto tako prilikom uzorkovanja odrađena je i biometrija srdele koja može pridonijeti kao referentna vrijednost za sva buduća istraživanja ove vrste.

## 8. POPIS LITERATURE

1. Ababouch, L. H., Souibri, L., Rhaliby, K., Ouahdi, O., Battal, M., Busta, F. F. (1996). Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. *Food microbiology*, 13(2), 123-132.
2. Abe, H. and E. Okuma (1991). Rigor mortis progress of carp acclimated to different water temperatures, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 2095-2100.
3. Ackman, R. G., McLeod, C. (1988). Total lipids and nutritionally important fatty acids of some Nova Scotia fish and shellfish food products. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 21(4), 390-398.
4. Alur, M. D., Venugopal, V., Nerkar, D. P. (1989). Spoilage potential of some contaminant bacteria isolated from Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*). *Journal of Food Science*, 54(5), 1111-1115.
5. Amenzoui, K., Ferhan-Tachinante, F., Yahyaoui, A., Kifani, S., Mesfioui, A. H. (2006). Analysis of the cycle of reproduction of *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) off the Moroccan Atlantic coast. *Comptes Rendus Biologies*, 329(11), 892-901.
6. Aubourg, S. P., Sotelo, C. G., Pérez-Martín, R. (1998). Assessment of quality changes in frozen sardine (*Sardina pilchardus*) by fluorescence detection. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(5), 575-580.
7. Azam, K., Mackie, I. M., Smith, J. (1990). Effect of stunning method on the time of onset, duration and resolution of rigor in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as measured by visual observation and analysis for lactic acid, nucleotide-degradation products and glycogen. *Science et Technique du Froid (France)*.
8. BelHadj, S., Hentati, O., Baccouch, N., Ben Salah, H., Boudaouara, T., Ben Hadj, A., ... El Feki, A. F. (2016). Effect of *Sardina pilchardus* oil on alloxan-induced diabetic rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 122(1), 27-35.
9. Bell, M. V., Henderson, R. J., Sargent, J. R. (1986). The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 83(4), 711-719.
10. Bogut, I., Opačak, A., Stević, I., Bogut, S. (1996). Nutritivna i protektivna vrijednost riba s osvrtnom na omega-3 masne kiseline. *Croatian Journal of Fisheries: Ribarstvo*, 54(1), 21-37.

11. Bogut, I., Bavčević, L., Stević, I., Adámek, Z., Franičević, V., Galović, D., Gjurčević, E., Klanjšček, T., Luzzana, U., Mareš, J., Mišlov-Jelavić, K., Pavličević, J., Pliestić, S., Šterbić, I., Tibaldi, E., Župan, B. (2016): Hranidba riba. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 47-57.
12. Boran, G., Karaçam, H. (2011). Seasonal changes in proximate composition of some fish species from the Black Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11(1).
13. Bremner, H. A. (2002). Understanding the concepts of quality and freshness. In *Safety and quality issues in fish processing* (pp. 163-172). Woodhead Publishing.
14. Bryan, F. L. (1988). Risks associated with vehicles of foodborne pathogens and toxins. *Journal of Food Protection*, 51(6), 498-508.
15. Chávez-Mendoza, C., García-Macías, J. A., Alarcón-Rojo, A. D., Ortega-Gutiérrez, J. Á., Holguín-Licón, C., Corral-Flores, G. (2014). Comparison of fatty acid content of fresh and frozen fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Walbaum. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 103-109.
16. Chiba, A., Hamaguchi, M., Kosaka, M., Tokuno, T., Asai, T., Chichibu, S. (1991). Quality evaluation of fish meat by 31 phosphorus-nuclear magnetic resonance. *Journal of food science*, 56(3), 660-664.
17. Cvrtila, Ž., Kozračinski, L. (2006). Kemijski sastav mesa riba. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu*, 8(6), 365-370.
18. Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International journal of food microbiology*, 26(3), 319-333.
19. Dalgaard, P., Huss, H. H. (2020). Mathematical modeling used for evaluation and prediction of microbial fish spoilage. In *Seafood safety, processing, and biotechnology* (pp. 73-89). CRC Press.
20. Dhakal, J., Holt, D., Aldrich, C. G., Knueven, C. (2022). Effects of antimicrobial addition on lipid oxidation of rendered chicken fat. *Translational Animal Science*, 6(1), txac011.
21. Eyer-Silva, W. A., Hoyos, V. P. A., & Nascimento, L. (2022). Scombroid Fish Poisoning. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(5), 1300.
22. FAO, (2014). *The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges*, Organization of the United nations.
23. Ferran, M., Yébenes, M. (2006). Flushing associated with scombroid fish poisoning. *Dermatology online journal*, 12(6).

24. Food and Drug Administration. (2011). Fish and fishery products hazards and controls guidance. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition.
25. Food Standards Australia New Zealand. (2016). Imported food risk statement fish and fish products from the families specified and histamine.
26. Fraser, O. P., Sumar, S. (1998). Compositional changes and spoilage in fish (part II)-microbiological induced deterioration. *Nutrition & Food Science*.
27. Galarini, R., Haouet, M. N., Manuali, E. (1996). Heavy metals and histamine content of fish products. 3. Histamine content during the 1988-1995 period. *Industrie Alimentari*, 35(353), 1194-1198.
28. Garrido, A., Garrido, F., Guerra, R., Valenzuela, A. (1989). Ingestion of high doses of fish oil increases the susceptibility of cellular membranes to the induction of oxidative stress. *Lipids*, 24(9), 833-835.
29. George, R.M. (1993.) Freezing processes used in food industry. *Trends in Food Science & Technology* Vol. 4.
30. Ghaly, A. E., Dave, D., Budge, S., Brooks, M. S. (2010). Fish spoilage mechanisms and preservation techniques. *American journal of applied sciences*, 7(7), 859.
31. Gillespie, I. A., Adak, G. K., O'Brien, S. J., Brett, M. M., Bolton, F. J. (2001). General outbreaks of infectious intestinal disease associated with fish and shellfish, England and Wales, 1992-1999. *Communicable disease and public health*, 4(2), 117-123.
32. Gogus, U., Bozoglu, F., Yurdugul, S. (2006). Comparative effects of lactic acid, nisin, coating combined and alone applications on some postmortem quality criteria of refrigerated *Sardina pilchardus*. *Journal of food quality*, 29(6), 658-671.
33. Gokoglu, N., Yerlikaya, P. (2015). Chemical composition of fish. *Seafood chilling, refrigeration and freezing: science and technology*, 5-37.
34. Gómez-Pinilla, F. (2008). Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nature reviews neuroscience*, 9(7), 568-578.
35. Gram, L., Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria—problems and solutions. *Current opinion in biotechnology*, 13(3), 262-266.
36. Gram, L. (2009). Microbiological spoilage of fish and seafood products. In *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages* (pp. 87-119). Springer, New York, NY
37. Hall, G. M. (2011). *Fish Processing—Sustainability and New Opportunities*.

38. Harvey, J. M. (1978). Reduction of losses in fresh market fruits and vegetables. Annual review of phytopathology, 16(1), 321-341.
39. Herbert, R. A., Hendrie, M. S., Gibson, D. M., Shewan, J. M. (1971). Bacteria active in the spoilage of certain sea foods. Journal of applied bacteriology, 34(1), 41-50.
40. Huss, H. H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) fisheries technical paper – 348, ISBN 92-5-103507-5, Rome, 1995.
41. Jacobsen, S., Fossan, K. M. (2001). Temporal variations in the glaze uptake on individually quick frozen prawns as monitored by the CODEX standard and the enthalpy method. Journal of Food Engineering, 48(3), 227-233.
42. Jardas I., (1996), Jadranska ihtiofauna. Zagreb, Školska knjiga.
43. Johnsen, P. B. (1991). Aquaculture product quality issues: market position opportunities under mandatory seafood inspection regulations. Journal of animal science, 69(10), 4209-4215.
44. Jovanović, J., Galić, J., Mackelworth, P. (2010). Odraz gašenja otočnih pogona za preradu ribe na depopulaciju hrvatskih otoka. Naše more: znanstveni časopis za more i pomorstvo, 57(3-4), 153-163.
45. Kader, A. A. (2004). Increasing food availability by reducing postharvest losses of fresh produce. In V International Postharvest Symposium 682 (pp. 2169-2176).
46. Khalili Tilami, S., Sampels, S. (2018). Nutritional value of fish: lipids, proteins, vitamins, and minerals. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 26(2), 243-253.
47. Kolega M. (2021). Kvalitativne promjene IQF smrznute jadranske srdele ulovljene u ljetnom periodu, Sveučilište u Zadru, Diplomski rad.
48. Louro, B., De Moro, G., Garcia, C., Cox, C. J., Veríssimo, A., Sabatino, S. J., ... Canário, A. V. (2019). A haplotype-resolved draft genome of the European sardine (*Sardina pilchardus*). GigaScience, 8(5), giz059.
49. Marin, M., Polak, T., Gašperlin, L., Žlender, B. (2010). Variations in the fatty acid composition and nutritional value of Adriatic sardine (*Sardina pilchardus* Walb.) through the fishing season. Acta Agriculturae Slovenica, 96(2), 95-101.
50. Marošević, Đ. (1982). Slatkovodno ribarstvo. Riba kao živežna namirnica, 553.
51. Mortimore, S., Wallace, C. (2013). HACCP: A practical approach. Springer Science & Business Media.

52. Mayes, T., Kilsby, D. C. (1989). The use of HAZOP hazard analysis to identify critical control points for the microbiological safety of food. *Food Quality and Preference*, 1(2), 53-57.
53. Miladi, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., Elmnasser, N., Ammar, E. (2008). Freezing effects on survival of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cold fresh-salmon. *Annals of microbiology*, 58(3), 471-476.
54. Mkađem, H., Kaanane, A. (2020). Seasonal changes in chemical composition and fatty acids of sardines (*Sardina pilchardus*) from the Dakhla coast (Morocco). *Moroccan Journal of Agricultural Sciences*, 1(3).
55. Mukundan, M. K., Antony, P. D., Nair, M. R. (1986). A review on autolysis in fish. *Fisheries research*, 4(3-4), 259-269.
56. Mustać, B., Sinovčić, G. (2010). Reproduction, length-weight relationship and condition of sardine, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792), in the eastern Middle Adriatic Sea (Croatia). *Periodicum biologorum*, 112(2), 133-138.
57. Mustać, B., Sinovčić, G. (2010). Morfometrijska i meristička obilježja srdele (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792.) iz zadarskog ribolovnog područja. *Croatian Journal of Fisheries: Ribarstvo*, 68(1), 27-43.
58. Mustać, B., Zoja Cukar, G., Vidović, A. (2020). Comparison of growth parametres between sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) and anchovy *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) from the eastern Adriatic Sea. *Pomorski zbornik*, (3), 325-333.
59. Niu, J., Lee, J. Y. (2000). A new approach for the determination of fish freshness by electrochemical impedance spectroscopy. *Journal of food science*, 65(5), 780-785.
60. NN (2008) Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu. *Narodne novine* 74/08.
61. Özođul, Y., Özođul, F. (2019). Significance of Histamin to human health. *Cappadocia, Turkey*, 265.
62. Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H., De Meulenaer, B. (2012). Malondialdehyde measurement in oxidized foods: evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test in various foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(38), 9589-9594.
63. Par, V., Kovačić, D., Lovrinov, M., Bavčević, L., Vodopija, T. (2006). Studija izvodivosti izgradnje i adaptacije dijela ribarske infrastrukture sukladno pravnoj stečevini EU. Zagreb, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.



64. Petricorena, Z. C. (2015). Chemical composition of fish and fishery products. Handbook of food chemistry, 403-435.
65. Pešić, A., Đurović, M., Joksimović, A., Regner, S., Simonović, P., Glamuzina, B. (2010). Some reproductive patterns of the sardine, *Sardina pilchardus* (Walb, 1792), in Boka kotorska Bay (Montenegro, southern Adriatic Sea). *Acta Adriatica*, 51(2), 159-168.
66. Pierson, M. D. (2012). HACCP: principles and applications. Springer Science & Business Media.
67. Ribarska zadruga Omega 3, (2016). Elaborat zaštite okoliša uz zahtjev za ocjenu o potrebi procjene utjecaja na okoliš za zahvat – dogradnja pogona za preradu proizvoda ribarstva i povećanja kapaciteta za pojedinačno smrzavanje ribe u postojećem pogonu za preradu proizvoda ribarstva.
68. Romotowska, P. E., Karlsdóttir, M. G., Gudjónsdóttir, M., Kristinsson, H. G., Arason, S. (2016). Influence of feeding state and frozen storage temperature on the lipid stability of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *International Journal of Food Science & Technology*, 51(7), 1711-1720.
69. Ruskol, D., Bendsen, P. (1992). Invasion of *S. putrefaciens* during spoilage of fish (Doctoral dissertation, M. Sc. Thesis, Technological Laboratory and the Technical University, Denmark).
70. Secci, G., Parisi, G. (2016). From farm to fork: Lipid oxidation in fish products. A review. *Italian Journal of Animal Science*, 15(1), 124-136.
71. Sen, D. P. (2005). *Advances in fish processing technology* (Vol. 1). Allied Publishers.
72. Silva, A. (2003). Morphometric variation among sardine (*Sardina pilchardus*) populations from the northeastern Atlantic and the western Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science*, 60(6), 1352-1360.
73. Smajlović, A., Baković, A., Mujezinović, I., Muminović, M., Smajlović, M., Kapetanović, O., Hadžijusufović, S. (2008). Utvrđivanje prisustva histamina u uzorcima ribe. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu*, 10(3), 212-216.
74. Songsaeng, S., Sophanodora, P., Kaewsritthong, J., Ohshima, T. (2010.). Quality changes in oyster (*Crassostrea belcheri*) during frozen storage as affected by freezing and antioxidant. *Food chemistry*, 123(2), 286-290.
75. Summers, G., Wibisono, R. D., Hedderley, D. I., Fletcher, G. C. (2017). Trimethylamine oxide content and spoilage potential of New Zealand commercial fish species. *New Zealand journal of marine and freshwater research*, 51(3), 393-405. L.H.

76. Shakila, R. J., Vijayalakshmi, K., Jeyasekaran, G. (2003). Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. *Food Chemistry*, 82(3), 347-32.
77. Shi, L., Yin, T., Wang, L., Xiong, G., Gao, R., Ding, A., ... & Jiao, C. (2020). Effect of pre-chilling time on the physicochemical properties of channel catfish during frozen storage. *International Journal of Refrigeration*, 115, 56-62.
78. Šimat, V., Hamed, I., Petričević, S., Bogdanović, T. (2020). Seasonal changes in free amino acid and fatty acid compositions of sardines, *Sardina Pilchardus* (Walbaum, 1792): Implications for nutrition. *Foods*, 9(7), 867.
79. Šoša, B., Bogdan, B. (1989). Higijena i tehnologija prerade morske ribe. Školska knjiga.
80. Štefan, L., Tepšić, T., Zavidčić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007). Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis*, 43(2.), 84-93.
81. Tilami, S. K., Sampels, S., Zajíc, T., Krejsa, J., Másílko, J., Mráz, J. (2018). Nutritional value of several commercially important river fish species from the Czech Republic. *PeerJ*, 6, e5729.
82. Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., Suzzi, G. (2014). Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Frontiers in microbiology*, 5, 500.
83. Vusilović, R., Cvrtila Fleck, Ž., Zdolec, N., Filipović, I., Kozačinski, L., Njari, B., Hadžiosmanović, M. (2008). Higijensko značenje histamina u ribi. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu*, 10(1), 40-45.
84. Vrgoč, N. (2012). Hrvatsko morsko ribarstvo: Stanje i perspektive na pragu EU. UNDP projekt, Split Vrgoč N, Arneri E, Jukić-Peladić S, Krstulović Šifner S, Mannini P, Marčeta B, Osmani K, Piccinetti C, Ungaro, (2004).
85. Zorica, B., Anđelić, I., Keč, V. Č. (2019). Sardine (*Sardina pilchardus*) spawning in the light of fat content analysis. *Scientia Marina*, 83(3), 207-213.

Web stranice:

Kanski D., (2019). Što je ribarstvo – globalna i lokalna važnost ribolova i akvakulture -

Preuzeto s: <https://www.ribahrvatske.hr/sto-je-ribarstvo-globalna-i-lokalna-vaznost-ribolova-i-akvakulture/> (Pristupljeno: 25.10.2021)

Riba Hrvatske (2021). Preuzeto s: <https://www.ribahrvatske.hr/riba-koju-se-ne-moze-prestati-hvaliti-srdela/> (Pristupljeno 25.10.2021.)

Fishbase (2022). Preuzeto s <https://www.fishbase.se/Summary/SpeciesSummary.php?ID=1350&AT=sardine> (Pristupljeno 05.04.2022.)

Omega 3 (2022). Preuzeto s <https://www.rz-omega3.hr/en/multimedia> (Pristupljeno 05.04.2022.)

Skaginn 3x (2021). Preuzeto s <https://www.skaginn3x.com/iqf-tunnel-freezer> (Pristupljeno 05.04.2022.)