

Utjecaj metode usmrćivanja brancina (*Dicentrarchus labrax*) na kvalitetu proizvoda

Vojvodić, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:162:623815>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Sveučilište u Zadru
Universitas Studiorum
Jadertina | 1396 | 2002 |

Repository / Repozitorij:

[University of Zadar Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zadru

Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu
Sveučilišni diplomski studij održivo upravljanje vodenim ekosustavima

Utjecaj metode usmrćivanja brancina (*Dicentrarchus labrax*) na kvalitetu proizvoda

Diplomski rad

Student/ica:

Valentina Vojvodić

Mentor/ica:

Doc. dr. sc. Bruna Petani

Komentor/ica:

Doc. dr. sc. Slavica Čolak

Zadar, 2024.

Sveučilište u Zadru

Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu

Sveučilišni diplomski studij

Održivo upravljanje vodenim ekosustavima

Valentina Vojvodić

**Utjecaj metode usmrćivanja brancina
(*Dicentrarchus labrax*) na kvalitetu proizvoda**

Diplomski rad

Zadar, 2024.

Sveučilište u Zadru
Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu
Sveučilišni diplomski studij
Održivo upravljanje vodenim ekosustavima

Utjecaj metode usmrćivanja brancina (*Dicentrarchus labrax*) na kvalitetu proizvoda

Diplomski rad

Student/ica:
Valentina Vojvodić

Mentor/ica:
Doc. dr. sc. Bruna Petani

Komentor/ica:
Doc. dr. sc. Slavica Čolak

Zadar, 2024.



Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, **Valentina Vojvodić**, ovime izjavljujem da je moj **diplomski** rad pod naslovom **Utjecaj metode usmrćivanja brancina (*Dicentrarchus labrax*) na kvalitetu proizvoda** 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, 2024.

SADRŽAJ

Uvod	1
Pregled literature	3
2.1. Brancin (<i>Dicentrarchus labrax</i> , Linnaeus, 1758.).....	3
2.2. Metode usmrćivanja brancina.....	4
2.2.1. Metoda usmrćivanja Ike Jime	8
2.3. Postmortalne promjene	8
2.3.1. Rigor mortis	10
2.4. TVB-N ukupni hlapljivi bazni dušik.....	12
Ciljevi i svrha rada	14
Materijali i metode	15
4.1. Uzorkovanje ribe	15
4.2. Senzorsko ocjenjivanje uzoraka	17
4.3. Metode analize uzoraka	17
Rezultati	19
5.1. Rezultati senzorskog ocjenjivanja uzoraka.....	19
5.2. Rezultati mikrobiološkog i kemijskog analiziranja	21
Rasprava	23
Zaključak.....	25
Popis literature.....	26

Utjecaj metode usmrćivanja brancina (*Dicentrarchus labrax*) na kvalitetu proizvoda

Sažetak

Povećanjem količine ribe koje dolaze iz akvakulture povećao se i zahtjev kupaca glede dobrobiti riba u uzgoju, te se primjenjuju od početka do kraja uzgojnog procesa, uključujući postupak usmrćivanja. Pri izboru metode usmrćivanja vodi se načelom što manje bolnosti i svjesnosti ribe. Metoda usmrćivanja utječe i na kvalitetu mesa finalnog proizvoda. Kao najčešća metoda usmrćivanja *Dicentrarchus labrax* navodi se asfiksija u ledenoj bljuzgi, dok su metode omamljivanja električnom strujom i izlaganje mješavini plinova poput dušika i/ili CO₂ tek u eksperimentalnoj fazi testiranja na nekim uzgajalištima. U ovom eksperimentu provedla se usporedba kvalitete mesa ribe usmrćene na dva različita načina: metoda „Ike Jime“ (A), te uranjanje u ledenu bljuzgu (B). Uzorci fileta su bili pojedinačno pakirani u plastične vrećice. Analiza mikrobiološke i kemijske ispravnosti provedena je u akreditiranom laboratoriju u vremenski intervalima (danima) od samog izlova. Metode ispitivanja mikrobiologije i kemije uzoraka fileta brancina su uključivale analiziranje prisutnosti *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, sulfitreducirajuće klostridije te koncentraciju ukupnog hlapljivog baznog dušika (TVB-N). Test organoleptike uključivao je deskriptivnu senzorsku analizu i test razlike provedenu od strane educiranih senzorskih analitičara. Rezultati su pokazali da je uzorak fileta brancina usmrćen metodom Ike Jime (A) bio duže mikrobiološki ispavan i to do osamnaestog dana u odnosu na uzorak ribe usmrćenog asfiksijom u ledenoj bljuzgi (B) čija je mikrobiološka ispravnost bila u granicama zakonskih regulativa do jedanaestog dana. Rezultati senzorskog ocjenjivanja su pokazali razlike četvrti dan ispitivanja, a kasnije na 8. i 11. dan ispitivanja nije bilo značajnih razlika u senzorskim parametrima. Slijedom navedenog, rezultati provedenog eksperimenta ukazuju na složenost procjene kvalitete mesa ribe, te iziskuje dodatna istraživanja kako bi se procjena kvalitete mesa u odnosu na različite metode usmrćivanja ribe mogla determinirati.

Ključne riječi: *Dicentrarchus labrax*, usmrćivanje ribe, Ike Jime, asfiksija u ledenoj bljuzgi, TVB-N

Influence of the method of killing sea bass (*Dicentrarchus labrax*) on product quality

Abstract

By increasing the quantity of fish coming from aquaculture, customers' demand for the welfare of farmed fish has also increased, which is applied throughout the entire farming process, including the slaughter procedure. When selecting a slaughter method, the principle of minimizing fish pain and awareness is followed. The slaughter method also affects the quality of the final product meat. Asphyxia in ice slurry is cited as the most common slaughter method for *Dicentrarchus labrax*, while stunning methods using electric current and exposure to gas mixtures such as nitrogen and/or CO₂ are still in the experimental testing phase at some farms. In this experiment, the meat quality of fish slaughtered in two different ways was compared: the "Ike Jime" method (A) and immersion in ice slurry (B). Fillet samples were individually packed in plastic bags. Microbiological and chemical analysis was conducted in an accredited laboratory at specific time intervals (days) from the catch. Microbiological and chemical testing methods for sea bass fillet samples included analyzing the presence of *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, sulfite-reducing clostridia, and the concentration of total volatile basic nitrogen (TVB-N). The organoleptic test involved descriptive sensory analysis and difference testing conducted by trained sensory analysts. The results showed that sea bass fillet samples slaughtered using the Ike Jime method (A) remained microbiologically safe for a longer period, up to the eighteenth day, compared to samples of fish slaughtered by asphyxiation in ice slurry (B), whose microbiological safety was within legal limits up to the eleventh day. Sensory evaluation results showed differences on the fourth day of testing, but later, on the 8th and 11th days of testing, there were no significant differences in sensory parameters. Therefore, the results of the experiment indicate the complexity of assessing fish meat quality and require further research to determine meat quality concerning different fish slaughter methods.

Keywords: *Dicentrarchus labrax*, fish slaughtering, Ike Jime, ice slurry asphyxiation, TVB-N

Uvod

U aspektu suvremenih izazova održivosti u akvakulturi, sve više pažnje se usmjerava ka unapređenju procesa uzgoja i usmrćivanja ribe radi postizanja optimalne kvalitete mesa. Brancin (*Dicentrachus labrax*) je jedna od ključnih vrsta u akvakulturi te zahtjeva pažljivo postupanje u procesu usmrćivanja zbog očuvanja vrijednosti i kvalitete mesa. Jedna od tradicionalnih metoda usmrćivanja ribe je Ike Jime. Metoda se tradicionalno primjenjuje u Japanu, a sve više postaje popularna i u drugim zemljama zbog svoje visoke učinkovitosti poboljšanja kvalitete mesa (Maruthi i sur., 2021.). Ako je provedena na odgovarajući način, očuva se okus i struktura mesa. Postupak uključuje probijanje lubanje ribe oštrim predmetom kroz glavu, pri čemu se uništava mozak, te zatim rezanja krvnih žila u svrhu iskrvarenja. Riba ugiba odmah, s minimalno stresa (Harada, 1988.). Istovremeno, zbog manjeg kretanja ribe usmrćene Ike Jime metodom nije povišena koncentracija mliječne kiseline u mišićima te se odgađa pojava *rigor mortisa*. Važno je napomenuti da izvođenje ove metode zahtjeva iskustvo, vještinu i poznavanje anatomije ribe kako bi se precizno probio mozak koji je kod ribe malen (Boaru i sur., 2022.). S druge strane, usmrćivanje ribe asfiksijom u ledenoj bljuzgi, za ribu može predstavljati stres jer je riba svjesna, te se postepeno riba guši i smrt nastaje sporo. Prema informacijama EFSA-e (2009.) primjena takve metode usmrćivanja ribe doprinosi produljenju razdoblja svijesti ribe tijekom nekoliko minuta. To rezultira dugotrajnom svjesnosti za vrijeme koje je riba u stresu i boli, što se očituje kroz promjene koje se odražavaju u fiziološkim parametrima i promjenama u ponašanju. Kao alternativa, preporučuje se korištenje električnog omamljivanja, bez obzira nalazi li se riba na zraku ili u ledenoj bljuzgi.

Potrošači su postali bolje upoznati s dobrobiti uzgojene ribe, posebno u pogledu proizvodnje i prerade vrsta. Postupci usmrćivanja i odnos prema ribi prije usmrćivanja, među najkritičnijim su točkama u upravljanju uzgojem ribe (Wall, 2001.). Do sada je obavljeno jako malo istraživanja o pokazateljima dobrobiti pri usmrćivanju, pogotovo za uzgajane vrste u Sredozemnom moru. U težnji ka visokim standardima dobrobiti potrebno je izbjeći postupke prije usmrćivanja kako bi se izbjegao strah, bol, uzbuđenje i stres kod ribe (Bagni i sur., 2007.). Značajni znanstveni napredak je ostvaren u području dobrobiti riba tijekom svih faza – uzgoj, transport, razne manipulacije prije usmrćivanja te postupci omamljivanja i usmrćivanja. Rastući interes prvenstveno proizlazi iz ozbiljne potrebe za razvojem i primjenom specifičnih standarda dobrobiti ribe, vođenih etičkim (dobrobit) i komercijalnim (kvaliteta mesa) motivima. S obzirom na utvrđenu sposobnost riba da dožive bol i patnju, reakcija izazvana stresom mogla

bi biti ključni uzrok promijenjenog post mortem metabolizma i narušene kvalitete mesa (Daskalova, 2019.).

Metode usmrćivanja i omamljivanja ribe uključuju: asfiksija na zraku, u ledenoj vodi, usmrćivanje iskrvarenjem, narkoza ugljikovim (IV) oksidom u kombinaciji s iskrvarenjem, usmrćivanje klinom, slana kupka, omamljivanje perkusijom, omamljivanje dušikom te električno omamljivanje (Filipović i sur, 2007.).

Rok trajnosti ili rok upotrebe predstavlja najmanji preporučeni period za konzumaciju hrane, minimalni rok trajanja hrane označava datum do kojeg hrana održava svoja karakteristična svojstva pod uvjetom pravilnog čuvanja (NN 114/2004). Rok trajnosti i ispravnosti hrane reguliran je zakonima i propisima Republike Hrvatske, a nadležna tijela za provedbu su Ministarstvo poljoprivrede, Ministarstvo zdravstva te Državni inspektorat (NN 83/2022). HACCP (engl. Hazard Analysis Critical Control Point) je sustav analize opasnosti i kontrolnih točaka kojih obuhvaća prepoznavanje, ocjenjivanje i postavljanje kontrole nad potencijalnim opasnostima u hrani, bilo da se radi o kemijskim, fizikalnim ili biološkim prijetnjama. Ovaj sustav ključan je za osiguranje sigurnosti hrane tijekom svih koraka proizvodnje, prerade i distribucije hrane (NN 83/2022).

Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. utvrđuje mikrobiološke kriterije za određene mikroorganizme te provedbena pravila kojih se subjekti u poslovanju s hranom moraju pridržavati pri provođenju općih i posebnih higijenskih mjera. Cilj je osigurati da hrana koja se konzumira bude sigurna. U Uredbi se propisuju smjernice i ograničenja za bakterije, viruse i druge mikroorganizme koji mogu biti u hrani te bi mogli predstavljati rizik za zdravlje. Proizvođači hrane moraju se pridržavati tih pravila kako bi osigurali sigurnost hrane koju stavljaju na tržište. Uz to, propisuje se redovito testiranje hrane kako bi se brzo otkrili mogući problemi i spriječile potencijalne opasnosti za potrošače.

Metoda usmrćivanja ima izravan utjecaj na rok trajnosti proizvoda te je izbor metode dio planiranja proizvodnog procesa. Slijedom navedenog u ovom radu smo usporedili Ike Jime metodu usmrćivanja sa metodom asfiksije u ledenoj bljuzgi kako bi se utvrdilo da li postoji razlika između roka trajnosti finalnog proizvoda te kvalitete mesa.

Pregled literature

2.1. Brancin (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758.)

Brancin (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758.) (Slika 1.) ima izduženo, bočno stisnuto tijelo vretenastog oblika koje je pogodno za brzo plivanje. Veličina mu varira ali u divljini se pronalaze jedinke oko 50 cm duljine, a maksimalna zabilježena dužina iznosi 103 cm (IGFA, 2001.) uz primjerke uhvaćene mase od 12 kilograma (Fiedler, 1991.). Srebrno-sive je boje, a na gornjem dijelu tijela ima plavkasto-sivu boju što mu pomaže pri stapanju s okolinom dok im je trbuh svjetliji. U usporedbi s tijelom, brancin ima malu glavu. Zubi su mu oštri. Ima dvije leđne peraje, prva prednja leđna peraja se nalazi bliže glavi, sadrži oštre bodlje koje se mogu uspraviti za obranu dok je druga, stražnja leđna peraja, sastavljena od mekanih bodlji. Analna peraja mu je dugačka sa nizom mekanih bodlji, a nalazi se na trbušnoj strani iza analnog otvora. Prsne peraje su smještene iza škržnog poklopca sa svake strane. Uloga prsne peraje je održavanje ravnoteže i manevriranje. Na donjem dijelu tijela, iza prsnih peraja smještene su zdjelične peraje. Repna peraja je šiljastog oblika i pomaže pri brzini plivanja i propulziji. Tijelo brancina prekrivaju male, glatke ljuske, oči su mu velike i dobro razvijene za pronalaženje plijena i snalaženje u uvjetima slabog osvjetljenja (Jardas, 1996.). Mrijesti se krajem jeseni, početkom zime (Dufour i sur., 2009.). Obitava uz europsku obalu te je jedna od najčešće ulovljenih i najbrojnijih vrsta. Njegova proizvodnja u akvakulturi raste iz godine u godinu što za posljedicu ima da je brancin jedna od najproučavanijih vrsta ribe (Pérez-Ruzafa i Marcos, 2014.). Ipak, o divljim jedinkama ima vrlo malo informacija. Većinu svog života provodi u obalnim lagunama i estuarijima, te ga se povremeno može naći i u rijekama. Zbog svojih eurihalnih i euritermnihih sposobnosti ima širok geografski raspon distribucije i širok raspon dubine te ga se može naći u plitkom moru dubine 2 m pa sve do dubine više od 100 m. Odličan je predator koji lovi plijen kojeg ima u izobilju, a mlade jedinke u divljini se hrane uglavnom bentoskim skupinama (kopepode, amfipode, jednakonošci i dr.). Kod odraslih jedinki, glavni izvor hrane predstavljaju rakovi i račići, mekušci i druge, manje ribe kao što su gavuni (*Atherina hepsetus*), papaline (*Sprattus sprattus*) i incuni (*Engraulis encrasicolus*) (Costa, 1988.; Ahmed, 2011.).



Slika 1. Brancin *D. labrax* (izvor: Fishbase).

2.2. Metode usmrćivanja brancina

Nakon uzgojnog ciklusa riba se izlovljava te se priprema za tržište. Izlov uključuje tri faze: priprema ribe, izlov te hlađenje ribe i čuvanje u termo izoliranim posudama do procesa sortiranja i pakiranja (Bavčević, 2014.).

Izlov ribe podrazumijeva njeno usmrćivanje koje se može provoditi na različite načine. Brancin se najčešće usmrćuje gušenjem na zraku (asfiksija) ili pothlađivanjem u ledenoj bljuzgi (Zampacavallo i sur., 2014.). Prema EFSA (2009.) ovakve metode ubijanja omogućuju produljeno razdoblje svijesti u trajanju od nekoliko minuta kod ribe. Rezultat toga je strah, bolnost i stres ribe koji se očituju fiziološkim promjenama i promjenama u ponašanju. Kao alternativa se predlaže električno omamljivanje ribe, u morskoj vodi ili na zraku. Također je preporuka za bolju kvalitetu mesa električno omamljivanje, a potom ubijanje pothlađivanjem u vodi sa ledom (ledena bljuzga) (Boyland i Brooke, 2017.). U studiji Lambooiya i sur. (2008.) korištenjem elektroencefalografskih (EEG) snimki ustanovljeno je da primjena električne struje u vremenskom trajanju od 1 sekunde izaziva opći epileptiformni inzult – riba ostaje bez osjeta i bez svijesti, a kombinacija električnog omamljivanja sa pothlađivanjem rezultira smrću. Iz analize mesa ribe utvrđeno je da je ovakav način prihvatljiv po pitanju dobrobiti ribe.

Najstarija metoda usmrćivanja je asfiksija na zraku. Prema Poli i sur. (2005.) kod brancina pri ovoj metodi uginuće nastupa za 60 minuta. Asfiksija na zraku nije prihvatljiva metoda usmrćivanja ribe jer uzrokuje stres i negativne promjene u kvaliteti mesa zbog nepostojanja hladnog lanca (Poli i sur., 2005.). U zemljama Sredozemlja se češće koristi metoda usmrćivanja asfiksijom u ledenoj bljuzgi gdje riba biva pothlađena – temperatura tijela i metabolizam se smanjuju i riba ugiba od anoksije. Za slatkovodne ribe, poput šarana i pastrve, ova metoda nije učinkovita jer je potreban veliki vremenski period da bi došlo do omamljenosti. Eksperimentalno je dokazano da kod brancina ova metoda ne uzrokuje stres (Poli i sur., 2005.). Metoda ne smanjuje u potpunosti svjesnost i bolnost jer se i nakon omamljenosti evidentira moždana funkcija. Bez obzira na to, metoda se i dalje koristi jer osigurava održavanje kvalitete mesa (Robb i Kestin, 2002.). Usmrćivanje iskrvarenjem se uglavnom prakticira kod lososa iako je ustanovljeno da ne dolazi odmah do gubitka svijesti jer su uočene kretnje ribe. Narkoza CO₂ uz iskrvarenje se široko primjenjuje kod lososa i pastrva. Metoda se sastoji u tome da se ribe uranjaju u vodu zasićenu s CO₂ pri čemu dolazi do snižavanja pH krvi te toksičnog djelovanja CO₂ na mozak nakon čega slijedi iskrvarenje prerezivanjem krvnih žila. Zbog silovitih reakcija, abnormalnih aktivnosti i pokušaja bijega ova metoda se smatra neprihvatljivom (Poli i sur.,

2005.). Perkusijsko omamljivanje je metoda u kojoj se ribu omamljuje jakim i preciznim udarcem u glavu. Uglavnom se koristi kod većih riba (Poli i sur., 2005.). Usmrćivanje klinom je metoda pri kojoj dolazi do fizikalne destrukcije mozga uz pomoć oštrog klina (Poli i sur., 2005.). Najhumanijom metodom usmrćivanja se smatra električno omamljivanje gdje odmah dolazi do imobilizacije i gubitka svijesti čime se sprječava stres. Mana ove metode je da ukoliko električki parametri nisu optimizirani dolazi do trzajnih reakcija kod ribe, točkastog krvarenja i frakture kralježnice (Filipović i sur., 2007.).

Metoda usmrćivanja bi trebala rezultirati brzim i nepovratnim gubitkom svijesti. Na taj način se kod ribe smanjuje bol, strah i stres. Boyd i sur. (1984.) su zabilježili da probadanje u mozak ribe rezultira niskom mišićnom aktivnošću, kao i kod udarca u glavu (Kestin i sur., 1995.) te destrukcijom leđne moždine se postiže isto (Mochizuki i Sato, 1994.).

Acerete i sur. (2009.) su obavili istraživanje na različite načine omamljivanja i usmrćivanja brancina, koji se često koriste u akvakulturi. Korištene su dvije metode omamljivanja, odnosno usmrćivanja: asfiksija u ledenoj bljuzgi uranjanjem ribe u ohlađenu vodu i narkoza ugljičnim dioksidom, uranjanjem ribe u CO₂ prezasićenu morsku vodu, dobivenu protokom CO₂ kroz difuzor. Za usporedbu, skupina riba ostavljena je u termo posudi do uginuća (asfiksije) te se smatrala kontrolnom skupinom. Cilj istraživanja je bio procijeniti kako određena metoda utječe na dobrobit ribe i kvalitetu mesa. Tijekom istraživanja, uzeli su se uzorci u različitim vremenskim intervalima, nakon što su ribe usmrćene. Analizirani su razni parametri, poput čvrstoće mišića, pH vrijednosti mišića, indeks loma oka i senzorske karakteristike. Također su mjereni pokazatelji stresa, kao što su osmolalitet, glukoza, laktat i kortizol. Ribe koje su izložene ozbiljnom stresu pokreću kompleksan stresni odgovor koji obuhvaća hormonalne, biokemijske, imunološke, osmoregulacijske i energetske promjene. U odgovoru na stres su uključene brojne fiziološke promjene, uključujući hematološke promjene, osmolalnost, otpuštanje hormona i energetske promjene. Rezultati istraživanja pokazali su da su pH vrijednosti mišića bile niže u grupi brancina koja je usmrćena s ugljičnim dioksidom u usporedbi s grupom usmrćenom u ledenoj bljuzgi od prvih 9 sati do kraja istraživanja. Usporedba između metoda utvrdila je da su pH vrijednosti mišića bile statistički više u grupi usmrćenju ugljičnim dioksidom i u ledenoj bljuzgi tijekom cijelog istraživanja. Subjektivna procjena pokazala je smanjenje pH vrijednosti mišića u sve tri analizirane skupine tijekom vremena, sa statistički značajnim razlikama samo pri nultom i devetom satu u usporedbi s kontrolnom skupinom. Kad su u pitanju pokazatelji stresa, obje metode usmrćivanja rezultirale su višim razinama stresa u usporedbi s ribama koje nisu podvrgnute nikakvom posebnom

postupku, ali su imale niže razine stresa u usporedbi s ribama usmrćenima ledenom bljuzgom. Na primjer, razina glukoze je bila pet puta viša nakon ledene bljuzge, dok su druge metode prouzrokovale samo 1,5-1,7 puta povećanje. Kortizol je bio osam puta viši nakon ledene bljuzge u usporedbi s povećanjem od pet puta kod drugih metoda usmrćivanja. Zaključak istraživanja bio je da su obje metode prikladne za preradu riba, ali je tretman ugljičnim dioksidom pokazao manje stresa u smislu određenih pokazatelja u usporedbi s ledenom bljuzgom. Što se tiče kvalitete mesa, razlike između metoda bile su male.

Osim gore navedenih metoda usmrćivanja i omamljivanja, u akvakulturi za omamljivanje riba se također primjenjuju i anestetici. Ulje klinčića se nedavno koristi kao inovativni proizvod u sektoru uzgoja riba, pružajući potencijalnu alternativu za eutanaziju riba. Glavni sastojak ulja klinčića je eugenol (4-alil-2-metoksifenol), kojeg se ekstrahira iz stabljike, cvjetova i lišća biljke. Iako je tek nedavno postao popularan kao anestetik s pozitivnim rezultatima, fiziološki efekti ulja nisu dovoljno istraženi. Kod mnogih vrsta riba je uspješno korišten, a neke od njih su: kalifornijska pastrva, atlantski losos te srebrni grgeč (Anderson i sur., 1997; Keene i sur., 1998; Iversen i sur., 2003; Kildea i sur., 2003.). Osim ulja klinčića, kao anestetik se u akvakulturi primjenjuje hipotermija. Hipotermija kod ribe utječe na aktivnost, brzinu metabolizma i potrošnju kisika, te kasnije na imobilizaciju tijela. Hipotermija može imati varijabilnu efikasnost u omamljivanju riba, a to ovisi o razlici u temperaturi između kupelji za hlađenje i vode u kojoj se ribe uzgajaju. Postupak hlađenja je lakši kada ribe obitavaju u relativno toplom okolišu, što je čest slučaj s ribljim vrstama koje žive u Sredozemnom moru. Ova metoda se često opisuje u kontekstu transporta ribe (Ribas i sur., 2007.).

Prema brzini usmrćivanja ribe metode možemo podijeliti na spore i na brze (tablica 1.). Spore metode usmrćivanja se najčešće primjenjuju na ribama u velikim skupinama. Ovakve metode ne uzrokuju odmah gubitak svijesti za razliku od brzih metoda usmrćivanja gdje dolazi odmah do gubitka svijesti (Mikuš i sur., 2020.). Pod spore metode usmrćivanja ubrajaju se gušenje, gušenje na ledu ili u ledenoj vodi (bljuzgi), iskrvarenje, omamljivanje s CO₂, evisceracija, dekapitacija, anestetici, slane kupke, potapanje u vodi bez kisika, elektroimobilizacija i elektrostimulacija te izlov strujnim pulsom. U brze metode usmrćivanja spadaju perkusijskom omamljivanje, hidraulični šok, usmrćivanje klinom i Ike Jime, pucanje iz vatrenog oružja i električno omamljivanje (Mikuš i sur., 2020.).

Tablica 1. Pregled metoda usmrćivanja sa njihovim prednostima i manama (izvor: Mikuš i sur., 2020.).

Omamljivanje ili omamljivanje/usmrćivanje	Vrsta ribe	Prednosti	Nedostaci
Omamljivanje električnom strujom	Atlantski losos Kalifornijska pastrva Šaran	<ul style="list-style-type: none"> Može se postići trenutačno omamljivanje Omogućuje filetiranje prije nastupanja mrtvačke ukočenosti 	<ul style="list-style-type: none"> Potrebna je učinkovita metoda usmrćivanja Može doći do oštećenja trupla Može utjecati na kvalitetu proizvoda, može doći do neučinkovitog omamljivanja zbog različitog otpora među ribama
Omamljivanje ugljičnim dioksidom (CO ₂)	Kalifornijska pastrva		<ul style="list-style-type: none"> Vrlo stresno
Perkusija	Atlantski losos	<ul style="list-style-type: none"> Može se postići trenutačno omamljivanje Ako se pravilno provede, nema oporavka Omogućuje filetiranje prije nastupanja mrtvačke ukočenosti 	<ul style="list-style-type: none"> Neučinkovita omamljivanja zbog različite veličine Može doći do oštećenja glave
	Šaran	<ul style="list-style-type: none"> Ako se pravilno provede, nema oporavka 	<ul style="list-style-type: none"> Ručna primjena može dovesti do neučinkovitog omamljivanja Može doći do oštećenja glave
	Kalifornijska pastrva	<ul style="list-style-type: none"> Ako se pravilno provede, nema oporavka 	<ul style="list-style-type: none"> Ručna primjena može dovesti do neučinkovitog omamljivanja
Smrzavanje riba na živo s pomoću CO ₂	Atlantski losos	<ul style="list-style-type: none"> Mrtvačka ukočenost nastupa sporo pa je moguće filetirati ribu prije toga 	<ul style="list-style-type: none"> Ribe nisu omamljene Metoda je stresna
Gušenje u ledu ili ledenoj vodi	Brancin Orada Kalifornijska pastrva	<ul style="list-style-type: none"> Jednostavna metoda Kvaliteta i sigurnost hrane 	<ul style="list-style-type: none"> Riba osjeća stres zbog naglog pada temperature

2.2.1. Metoda usmrćivanja Ike Jime

Ike Jime je japanski izraz koji oznaćava „ubiti dok je živo“ ili „ubijanje živih“. Vrlo popularni oblici japanske kuhinje se smatraju sushi i sashimi, a okus i kvaliteta hrane proizvedene od ribe je često povezana sa metodom usmrćivanja Ike Jime (Maruthi i sur., 2021.). Sushi je metoda konzerviranja ribe. Riba je usoljena i zamotana u fermentiranu rižu, dodaje se povrće i zamotava u alge. Sashimi se sastoji od sirove ribe ili školjki koje se režu na tanke kriške i poslužuju uz umake kao što je, na primjer, soja umak (Muscolino i sur., 2014.). Metoda Ike Jime se smatra jednom od metoda koja bolje održava kvalitetu mesa te produljuje rok trajanja (Maruthi i sur., 2021.). Metoda uključuje paraliziranje ribe i ispuštanje krvi čime se postiže okus i tekstura mesa ribe koja je cijenjena. Smatra se da je tehnika nastala prije 350 godina te je od tad koriste kuhari diljem Japana (Maruthi i sur., 2021.).

Metoda Ike Jime zahtjeva da se ribu pomoću šiljka usmrti (moždana smrt), a kasnije se kroz ostvarenu rupu u lubanji provlaći sprava nalik tankoj žici duž leđne moždine. Ovom metodom moždana smrt u ribe nastupa vrlo brzo te je smanjena mogućnost pojave postmortalnih promjena u mesu ribe za razliku od drugih metoda usmrćivanja gdje postoji veća mogućnost da dođe do niza negativnih biokemijskih posljedica (Maruthi i sur., 2021.). Smanjuje se kretanje ribe što posljedićno smanjuje koncentraciju mlijećne kiseline u mišićima čime se smanjuje i mogućnost pojave *rigor mortisa*. Za postizanje uspješnosti potrebno je iskustvo, vještina i poznavanje anatomije ribe (Boaru i sur., 2022.). Pojam Ike Jime danas obuhvaća i naprednije tehnike rukovanja koje osim korišćenja šiljka u svrhu moždane smrti uključuju iskrvarenje, uništenje leđne moždine i primjenu protokola hladnog lanca prilikom skladišćenja (Maruthi i sur., 2021.).

2.3. Postmortalne promjene

Postmortalne promjene su procesi koji se događaju u mesu ribe nakon uginuća, a poznavanje tih procesa je važan čimbenik kod ocjene svojstava kvalitete ribe (Min i sur., 2019.). U postmortalne promjene spadaju *rigor mortis* (kao najvažnija promjena), pojaćano stvaranje sluzi, autoliza (fermentativna razgradnja), bakterijska razgradnja tkiva te kvarenje koje se oćituje različitim fizikalnim i biokemijskim parametrima (Ćosić, 2020.). Riblje meso se kvari brže, ako se uspoređuje s mesom kopnenih životinja, zbog strukture i kemijskog sastava tkiva. Dolazi do veće vjerojatnosti za razvoj bakterija u mesu zbog manje kolićine vezivnog tkiva,

viška vode u mišićima te povećanog pH nakon uginuća organizma. Nakon što riba uginu, dolazi do niza transformacija na površini tijela i unutar tkiva, što rezultira procesom propadanja (Ćosić, 2020.).

Bagni i sur. (2007.) su istraživali kako gustoća ribe i rukovanje njome prije usmrćivanja utječe na njenu dobrobit i kvalitetu mesa. Istraživanje su provodili na brancinu i na oradi. Usporedili su dva postupka prije usmrćivanja – nisku i visoku gustoću ribe u termo posudama, te dvije metode usmrćivanja – asfiksiju na zraku i asfiksiju u ledenoj bljuzgi. Pokazatelji dobrobiti pri usmrćivanju su bili mišićni pH te indeks *rigor mortisa* na temelju ukočenosti ribe. Također su utvrdili i vrijeme preživljavanja ribe, odnosno koliko brzo dolazi do stanja omamljenosti. S obzirom da se brancin i orada stavljaju na tržište kao svježi proizvodi bez zaštite od oksidativnog oštećenja, ispitivali su porast metabolita reaktivnog kisika (ROM) i antioksidativnu snagu (endogeni obrazac detoksikacije - AOP). Rezultati su pokazali viši stupanj stresa kod ribe koja se držala u termo posudama sa većom gustoćom ali je brancin imao manji stupanj stresa od orade. Također, ustanovili su da ribe usmrćene na zraku proživljavaju duže mučenje od onih ugušenih u hladnoj bljuzgi, neovisno o gustoći nasada u termo posudi. Mrtvačku ukočenost su pratili nakon uginuća te u različitim intervalima unutar 48 sati od uginuća, a određivali su je procjenom i statusom ukočenosti te indeksom ukočenosti. Procjenu su vršili na temelju krutosti ribe – dodirom i vizualnim promatranjem. Dva reza su napravljena u mišiću svake ribe da bi ustanovili početak *rigor mortisa* – jedan kod glave, a drugi na 2/3 duljine tijela ribe. Kod brancina, *rigor mortis* je započeo 36 sati post mortem bez obzira na gustoću nasada, a pH vrijednost se smanjila odmah nakon smrti. Smanjenje pH vrijednosti je rezultat stvaranja H⁺ iona koji su povezani s proizvodnjom mliječne kiseline kao i potrošnjom ATP rezervi. Smanjenje pH uključuje oštećenje teksture mesa i pad kvalitete fileta. Vrijednosti ROM i AOP bile su među najnižima ikad dobivenima. U stresnim uvjetima proizvodnja ROM-a se suzbija aktivacijom AOP mehanizma. Brancin koji se držao u termo posudama sa većom gustoćom ribe je pokazao višu vrijednost ROM-a, a vrijednost AOP je bila veća kod skupine koja je bila u termo posudama sa manjom gustoćom nasada. Asfiksija na zraku je dovela do produljene pre-mortem (prije smrti) aktivnosti te je ozbiljno utjecala na kvalitetu ribe. Zaključno, pH mjerenja, stanje *rigor mortisa*, oksidacijska ravnoteža i vrijeme preživljavanja riba jasno su izdvojili pre-mortem status istraživane vrste. Ribe u termo posudama s većom gustoćom nasada pokazale su raniji početak i povlačenje *rigor mortisa*, veći intenzitet *rigor mortisa* kao i negativnu korelaciju ROM/AOP. Stoga se pokazalo da veća gustoća nasada prije

usmrćivanja izaziva različite razine stresa, što negativno utječe na dobrobit ribe i kvalitetu dobivenog proizvoda.

Bakterije poput *Salmonella spp.* i *Staphylococcus spp.* su povezane najčešće s lošim higijenskim uvjetima tijekom rukovanja ribom (Ganguly i Bordoloi, 2014.) i neprikladnim uvjetima njezinog čuvanja (Tahsin i sur., 2017.). Oko 60 % bakterija su inaktivirane tijekom zamrzavanja na temperaturama nižim od -10 °C, ali neke bakterije i dalje ostaju aktivne u ribi tijekom niskih temperatura (Rahman i Velez-Ruiz, 1999.). Međutim, smrzavanje na -20 °C može smanjiti aktivnost preostalih bakterija poput *Salmonelle* ili *Listerije* (Miladi i sur., 2008.). Važno je izbjegavati promjene temperature prilikom zamrzavanja ribe kako bi se očuvala kvaliteta mesa i spriječio razvoj bakterija (Žoldoš i sur., 2011.).

2.3.1. Rigor mortis

Fenomen kada riba nakon uginuća postane ukočena se naziva *rigor mortis* ili mrtvačka ukočenost. On nastaje radi kontrakcije mišića zbog nedostatka adenzin trifosfata (ATP). *Rigor mortis* je na svom vrhuncu kada se gotovo sva mišićna vlakna kontrahiraju, a nakon toga mišić postaje nježniji te se ta faza naziva omekšavanje mesa. Čimbenici koji utječu na nastanak *rigor mortisa* su rukovanje prije usmrćivanja, stres tijekom usmrćivanja, te temperatura držanja ribe prije samog usmrćivanja. Čak i ukoliko se ribe usmrćuju pod istim uvjetima postoji i razlika u vremenu nastupanja mrtvačke ukočenosti koje su specifične za pojedinu vrstu ribe (Sorensen i sur., 1997.). Pri *rigor mortisu* kontrahiraju uglavnom poprečni skeletni mišići, ali se kontrakcija također događa u tetivama što na kraju utječe na vezivno tkivo. Proces koji su odgovorni za ovaj fenomen su biokemijske i fiziološke prirode. Mnoge teorije postoje o njegovom karakteru. Prema Riesser-u (1925.) rigor predstavlja oštećenje koloidne prirode mišićnih proteina na koje utječe prekid normalnog metabolizma tkiva te se prvenstveno odražava u acidifikaciji. Osim posmrtnog nakupljanja mliječne kiseline, dodatni metabolički poremećaji u umirućem mišiću dovode do dezorganizacije stanica, a samim time i do *rigor mortisa*. Za ukočenost su odgovorna dva proteina – aktin i miozin, koji se spajaju u aktomiozin. Flückiger (1937.) smatra odgovornim prekid oksidacijskih procesa u stanicama gdje dolazi do stvaranja prekomjerne količine mliječne kiseline što uzrokuje oticanje mišićnih fibrila koje dovodi do otvrdnuća. Osim mliječne kiseline, Embden (1925.) je dokazao da fosforna kiselina koja također nastaje iz laktacidogena, koji je prijelazni produkt razgradnje glikogena, izaziva brzu kontrakciju mišića, dok mliječna kiselina kontrolira trajanje kontrakcija. Prema novijim studijama (Dubuisson,

1954.), aktomiozin možda nije spoj odgovoran za ukočenost u *rigor mortisu*. Nakon prestanka rada srca i kontrole tijela od strane mozga, tkiva ne dobivaju kisik. Dolazi do glikolize u mišićnim tkivima te pH vrijednost pada. Kreatin-fosfat koji je izvor energije vezane za fosfat, nestaje u mišićima te dolazi do razgradnje ATP-a. Ova razgradnja je u početku reverzibilna jer nastankom adenozin monofosfata (AMP) dolazi do reakcije s fosfornom kiselinom koja nastaje iz hidrolize kreatin-fosfata i ponovno se stvara ATP. Nakon završetka ovog procesa, adenilna kiselina se razgrađuje do inozinske kiseline. Istraživanja provedena na drugim vrstama mesa (osim ribe) ukazuju da enzim miokinaza djeluje kao sredstvo za usporavanje i potiskuje razgradnju ATP-a. Pravi uzrok nastanka *rigor mortisa* je nestanak ATP-a (Amlacher, 1961.). *Rigor mortis* kod riba slijedi obrazac po „silaznom“ redoslijedu. Ukočenost počinje u čeljusti i oko škržnog poklopca i dalje se širi od glave prema glavnim mišićima tijela sve do kaudalnog područja, a zahvaća i mišiće peraja (Amlacher, 1961.).

Rigor mortis proizlazi iz metabolizma mišićnih stanica nakon smrti. Energija potrebna za taj metabolizam generira se hidrolizom ATP-a. ATP se obnavlja pomoću kreatin fosfata (kreatin fosfat + ADP + kreatin kinaza → ATP). Međutim, u uvjetima s nedostatkom kisika, veći dio energije nakon smrti osigurava se razgradnjom glikogena putem glikolize, uz istovremenu akumulaciju mliječne kiseline i smanjenje pH-vrijednosti mišića (Diouf i Rioux, 1999.).

Tijekom *rigor mortisa* dolazi do žilavosti mesa koja se primjenom određenih metoda može izmjeriti. Većina metoda za mjerenje žilavosti se primjenjuje na uzorke fileta, ali kako najveći dio svježje ribe na tržištu dolazi kao cijela riba, metoda mjerenja mora biti primjenjiva na cijelu ribu, a ne samo na filete. Aparat koji omogućuje procjenu žilavosti sastoji se od klipa s tupim krajevima koji se vertikalno gura u tijelo (mišić) primjenjujući konstantni tlak, koji se prenosi preko kompresijske opruge te se mjeri dubina otiska kroz otvor koji je prekriven staklom (Amlacher, 1961.).

Nakon nekoliko sati od početka *rigor mortisa*, dolazi do autolize tj. razgradnje tkiva djelovanjem vlastitih enzima bez utjecaja mikroorganizama, što rezultira osjetljivošću mišića zbog prisutnih tkivnih enzima. Na brže omekšavanje mišića utječe i mikroba kontaminacija, što na kraju može dovesti i do kvarenja ribe (Min i sur., 2019.).

2.4. Ukupni hlapljivi bazni dušik (TVB-N)

Ukupni hlapljivi bazni dušik (TVB-N), rezultat degradacije proteinskih i neproteinskih dušikovih spojeva koje se koristi kao indikator svježine ribe. Razgradnja proteina i drugih dušikom bogatih spojeva, kao rezultat procesa propadanja, dovodi do stvaranja organskih amina – TVB-N. Ti spojevi su štetni i uzrokuju značajne promjene u boji i okusu mesa, što utječe na ukusnost mesnih proizvoda (Bekhit i sur., 2021.). Konkretno, trimetilamin oksid (TMAO), sastojak ribljeg okusa, smanjuje se u trimetilamin (TMA), stvarajući dimetilamin (DMA) i formaldehid pomoću endogenog enzima (kreatin kinaza) prisutnog u mišićima. Količina TVB-N povećava se tijekom skladištenja mesa, uz druge pokazatelje kvarenja mesa, poput broja mikroorganizama i promjena u percepciji okusa. Ovaj proces rezultira neugodnim mirisima ribe i ukazuje na postupni proces kvarenja ribljeg mesa (Min i sur., 2019.). Povećanje TMA u ribljim proizvodima rezultira povećanjem TVB-N (Bekhit i sur., 2021.).

Granične vrijednosti TVB-N se određuju posebno za svaku vrstu ribe (tablica 2.) (NN 154/08; 78/12; Bogdanović, 2012.). U ribi i ribljim proizvodima najveća dopuštena vrijednost za TVB-N iznosi 35 mg/100 g, dok za školjkaše, kao što je kamenica, preporučena vrijednost iznosi 3 mg/100 g (Castro i sur., 2012.). Primjerice, iverak (*Paralichthys olivaceus*) s TVB-N manjim od 10 mg/100 g smatra se izrazito svježim, od 10-20 mg/100 g svježim, dok se prag početnog kvarenja ribljeg mesa postiže kada je razina TVB-N između 25-30 mg/100 g. Kad sadržaj TVB-N pređe više od 30 mg/100 g, kvarenje mesa značajno napreduje, uz varijacije ovisno o vrsti ribe. Općenito, meso koje se koristi za sashimi obično ima sadržaj TVB-N od 20 mg/100 g ili manje (Min i sur., 2019.).

Min i sur. (2019.) su proveli istraživanje na maslinastom iverku gdje su istraživali postmortalne promjene na filetima iverka skladištenih na niskim temperaturama, pripremajući filete s oštećenjima kralježnice ili bez oštećenja nakon usmrćivanja kranijalnim ubodom (probadanje lubanje). Rezultati provedenog istraživanja pokazali su povećanje vrijednosti TVB-N-a kod uzoraka fileta neoštećenog mesa (10,4 mg/100 g), dok su vrijednosti TVB-N-a bile niže kod uzoraka fileta s oštećenjem leđne moždine (8,4 mg/100 g). S obzirom na rezultate, uzorci fileta s oštećenjem moždine se smatraju izrazito svježima, dok uzorci fileta bez oštećenja se smatraju svježima. Ostala analiza istraživanja je uključivala mjerenje postmortalnog pH, sadržaj ATP-a, indeks *rigor mortisa* te čvrstoću mesa ribe. Dobiveni rezultati ukazuju na to da se svježina mesa s oštećenjem leđne moždine produžuje za približno 4 sata u usporedbi s mesom bez takvog oštećenja.

Tablica 2. primjer graničnih vrijednosti TVB-N za određene vrste (izvor: Bogdanović, 2012., NN 154/08; 78/12).

RIBLJE VRSTE	NDK (NN 154/08; 78/12)
<i>Sebastes spp.</i> (bodečnjaci), <i>Helicolenus dactylopterus</i> (bodečnjak veliki), <i>Sebastichthys capensis</i>	25 mg N/100 g
<i>Pleuronectidae</i> (plosnatice) (osim <i>Hyppoglossus spp.</i>)	30 mg N/100 g
<i>Salmo salar</i> (losos), vrste koje pripadaju porodici <i>Merlucciidae</i> (oslići), vrste koje pripadaju porodici <i>Gadidae</i> (tovarke)	35 mg N/100 g
Cijeli proizvod ribarstva koji se koristi za pripremu ribljeg ulja za ljudsku prehranu	60 mg N/100 g

Tijekom skladištenja mesa koncentracija TVB-N raste i usklađena je s drugim biomarkerima propadanja (npr. vrijeme koliko je meso „staro“, temperatura na kojoj je bilo spremljeno i način pakiranja). Postoje različite preporuke za granice TVB-N vrijednosti u svježem mesu, uglavnom vezane uz ribu i morske proizvode, stoga nisu primjerene za ostale vrste mesa. Preporuke su specifične za vrste mesa, ponekad se čine proizvoljnima ili sadrže element nejasnoće, kao što je klasifikacija između "svježeg" i "pokvarenog" mesa. Određivanje graničnih vrijednosti granice za TVB-N može dovesti pogrešne ocijene svježine mesa, jer je to stvar subjektivnog mišljenja (Bekhit i sur., 2021.).

Ciljevi i svrha rada

Cilj ovog diplomskog rada bio je analizirati utjecaj metode usmrćivanja brancina (*D. labrax*) na kvalitetu finalnog proizvoda. Istraživanja su uključivala procjenu senzorskih svojstava te mikrobiološka ispitivanja i kemijske pokazatelje s naglaskom na TVB-N.

Svrha ovog diplomskog rada je bila utvrditi vremenski interval roka trajnosti finalnog proizvoda uzimajući u obzir metodu usmrćivanja brancina.

Materijali i metode

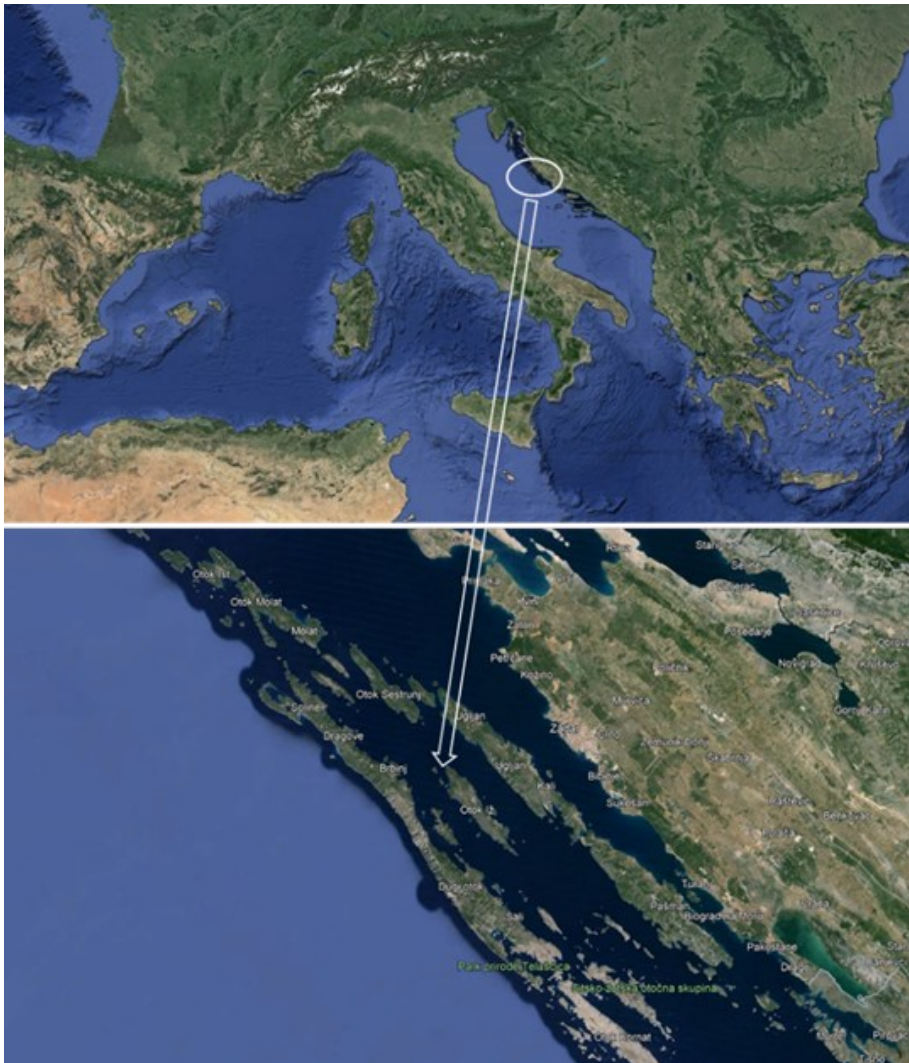
4.1. Uzorkovanje ribe

Uzgajalište brancina se nalazi kod otoka Iža, sa njegove zapadne strane (slika 3), gdje je u lipnju 2023. godine provedeno uzorkovanje ribe s ciljem usporedbe kvalitete mesa ribe usmrćene na dva načina te različitim vremenskim intervalima:

Uzorak A – metoda usmrćivanja Ike Jime

Uzorak B – metoda usmrćivanja asfiksijom u ledenoj bljuzgi

Vrijeme uzorkovanja (dani od izlova): T0, T4, T8, T11, T14, T18, T23.



Slika 3. Lokacija uzgajališta brancina (izvor: Google Earth).

Nakon izlova, riba se stavila u termo posude (Rotogal B1700) koje su prethodno napunjene morem, bez leda. Iz termo posude se pojedinačno žive ribe prebacuje na pult, gdje je pripremljen alat za Ike Jime-u koji se sastoji od šiljka, noža i žice. Živu ribu potrebno je čvrsto držati s gumenim rukavicama zbog oštih bodlji.

Uzorci A su usmrćeni metodom Ike Jime na način da se lubanja probija šiljkom, što rezultira moždanom smrću ribe. Zatim je slijedilo rezanje krvnih žila nožem, te se takva riba prebacuje u drugu termo posudu, također napunjenu morem, radi iskrvarenja. Nakon iskrvarenja, pojedinačno se svaka riba stavljala na pult gdje joj se provlačila žica kroz prethodno probodenu rupu u lubanji sve do repne peraje, što rezultira uništavanjem leđne moždine. Tijekom provlačenja žice, riba se "trzne" dva do tri puta. Nakon toga, riba se ponovno stavljala u termo posudu napunjenu morem kako bi nastavila s iskrvarenjem. Svaka riba iz termo posude u kojoj je predviđeno iskrvarenje pažljivo se ispirala pod mlazom mora i premještala se u termo posudu s ledenom bljuzgom (more + led).

Uzorci B su usmrćeni metodom asfiksije u ledenoj bljuzgi. Riba se nakon iskrvarenja pažljivo ispirala pod mlazom mora te se prebacivala u termo posude sa ledenom bljuzgom.

Uzorci ribe su se nakon usmrćivanja filetirali u pogonu za preradu, vagali, pakirali u plastične vrećice (slika 4.), označavali po težini (npr. 500 g, 300 g), metodi usmrćivanja (uzorak A i B), te su se finalno pokrivali ledom i skladištili u hladnjači.



Slika 4. Pakiranje fileta brancina u plastičnoj vrećici sa pripadajućim oznakama (uzorak za mikrobiološku i kemijsku analizu, T11, Ike Jime metoda usmrćivanja).

4.2. Senzorsko ocjenjivanje uzoraka

Za uzorak A i B senzorsko ocjenjivanje se provodilo za T4, T8 i T11. Uzorci su dodatno označeni slovom O (AO i BO), a masa pojedinog uzorka je iznosila cca 300 g. Senzorsko ocjenjivanje proveli su članovi educiranog panela tvrtke „Cromaris“.

Uzorci za senzorsko ocjenjivanje su pripremljeni kuhanjem fileta u slanoj vodi gdje je koncentracija soli iznosila 0,2 % u vremenskom trajanju od 5 minuta. Ispitivani fileti imali su masu između 300-400 g.

Za T4 napravljena su dva testa kuhanih fileta. Prvi test je bila usporedna deskriptivna analiza brancina metodom usmrćivanja asfiksije u ledenoj bljuzgi i Ike Jime metodom. Drugi test je bio triangle test raspoznavanja, koji je napravljen na način da su uzorci šifrirani kako bi se članovima panela onemogućile prepoznavanje vrste uzoraka.

Za T8 napravljena je deskriptivna analiza rangiranjem ocjena od 3-10 gdje su senzoričari znali koji je uzorak A, a koji B. Na ovaj način se pokušalo utvrditi kako se senzorska svojstva mijenjaju u vremenskom periodu i jesu li opisane razlike u prvom deskriptivnom testu i dalje prisutne. Za T11 ponovljena je deskriptivna analiza rangiranjem ocjenama od 3-10 fileta brancina, no ovog puta senzoričari nisu znali koji je uzorak fileta A, a koji B.

4.3. Metode analize uzoraka

Za dokazivanje prisutnosti mikroorganizama, korištene su sljedeće metode:

- Za *Enterobacteriaceae* primijenjena je horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2:2017) primjenom ljubičasto-crvenog žučnog glukoznog agara.
- *Salmonella spp.* identificirana je horizontalnom metodom za dokazivanje prisutnosti, određivanje broja i serotipizaciju *Salmonella spp.* (ISO 6579-1:2017/A1:2020) primjenom polučvrstog agara MSR/V (Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis agar).
- *Staphylococcus aureus* određivan je metodom brojanja koagulaza-pozitivnih stafilocoka primjenom Baird-Parker agara (ISO 6888-1:2004).

- *Listeria monocytogenes* identificirana je horizontalnom metodom za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *L. monocytogenes* i drugih *Listeria* spp (ISO 11290-1:2017) primjenom Harlekin-LMO agar (Harlequin *Listeria* Chromogenic Agar) te Polymyxin Acriflavine Lithium Chloride Ceftazidime Esculin Mannitol Agar (PALCAM Agar).
- Sulfitreducirajuće klostridije brojene su horizontalnom metodom za brojenje sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima (ISO 15213:2004).

Procedura za verifikaciju graničnih vrijednosti TVB-N podrazumijeva destilaciju ekstrakta deproteiniziranog perklornom kiselinom. Iparivi dušični spojevi se dobivaju iz uzorka korištenjem otopine perklorne kiseline s koncentracijom od 0,6 mol. Nakon što se ekstrakt alkalizira, provodi se destilacija vodenom parom, a komponente isparivih baza apsorbiraju se u kiselinskom recipijentu (prijemniku). Koncentracija TVB-N određuje se titracijom sa standardnom otopinom klorovodične kiseline apsorbiranih baza (EZ 2074/2005).

Titracijom otopine iz prihvatne posude se izračunava koncentracija upotrebom jednadžbe:

$$\text{TVB — N (izraženo u mg/100 g uzorka)} = \frac{(V-V_0) \times 0,14 \times 2 \times 100}{M}$$

V1= koncentracija HCl-a 0,01 mol/dm³ za uzorak

V0= koncentracija HCl-a 0,01 mol/dm³ za slijepi pokus

M= masa uzorka u g

Rezultati

5.1. Rezultati senzorskog ocjenjivanja uzoraka

Rezultati deskriptivne analize za T4 pokazale su da postoje vidljive razlike u mirisu, okusu, teksturi i boji između ova dva uzorka (tablica 3.). Uzorak brancina usmrćen Ike Jime metodom ima slab i neobičan miris, bljutavog i metalnog okusa te je teksturom ljepljiv i viskozan, a riblje meso je dosta svjetlije. Brancin koji je usmrćen asfiksijom u ledenoj bljuzgi ima karakterističan okus, miris, boju i teksturu.

Tablica 3. Rezultati deskriptivne analize kuhanih fileta brancina 4. dan od izlova (T4).

DESKRIPTIVNA ANALIZA FILETA BRANCINA		
T4	METODA USMRĆIVANJA ASFIKSIJOM U LEDENOJ BLJUŽGI (uzorci B)	METODA USMRĆIVANJA IKE JIME (uzorci A)
MIRIS	Podsjeća na rakovo meso, slatkast miris	Slab, ne specifičan miris, slatkast, slatkasto-loš
OKUS	Podsjeća na raka, slankasto, slatkasto, klasični riblji okus	Bljutav, malo metalan okus, loš i nedefiniran
TEKSTURA	Kompaktno, kratka vlakna, čvrst	Žilavo i ljepljivo, suho
IZGLED I BOJA	Sivkasto, tamniji od uzoraka A	Bijelo

Rezultati triangle testa raspoznavanja su pokazali da svi senzoričari raspoznaju uzorak A zbog karakterističnog okusa i teksture mesa (tablica 4.).

Tablica 4. Rezultati Triangle test raspoznavanja kuhanih fileta uzoraka A i B za T4.

TRIANGLE TEST RASPOZNAVANJA		
UZORAK B	UZORAK B	UZORAK A
		Svi članovi panela su prepoznali uzorak A zbog karakterističnog okusa i teksture ribljeg mesa

Rezultati za T8 pokazuju da nema više značajno vidljivih razlika između A i B uzorka već su ukupne ocjene podjednake (tablica 5.). Ukupna ocjena je iznad prosječna i vrlo dobra. Miris je karakterističan i najviše podsjeća na morsku travu za oba uzorka, okusom je meso slatkasto. Tekstura postaje slična za oba ispitivana uzorka, vlakna mesa su kratka i suha.

Tablica 5. Rezultati deskriptivne analize kuhanih fileta brancina T8.

DESKRIPTIVNA ANALIZA		
T8	UZORAK A	UZORAK B
MIRIS	9,5	9
OKUS	8,7	8,5
TEKSTURA	8,0	8,2
UKUPNA OCJENA	8,7	8,6

Rezultati T11 pokazuju da filet uzorka A ima bolje ukupne ocjene, naročito miris mesa (tablica 6.). Teksturom se uzorci najviše razlikuju, te su senzoričari primijetili da je kod uzorka B tekstura ljepljiva i vlaknasta.

Tablica 6. Rezultati deskriptivne analize kuhanih fileta brancina za T11.

DESKRIPTIVNA ANALIZA		
T11	UZORAK A	UZORAK B
MIRIS	9,4	8,9
OKUS	8,3	8,3
TEKSTURA	8,0	7,4
UKUPNA OCJENA	8,5	8,2

5.2. Rezultati mikrobiološkog i kemijskog analiziranja

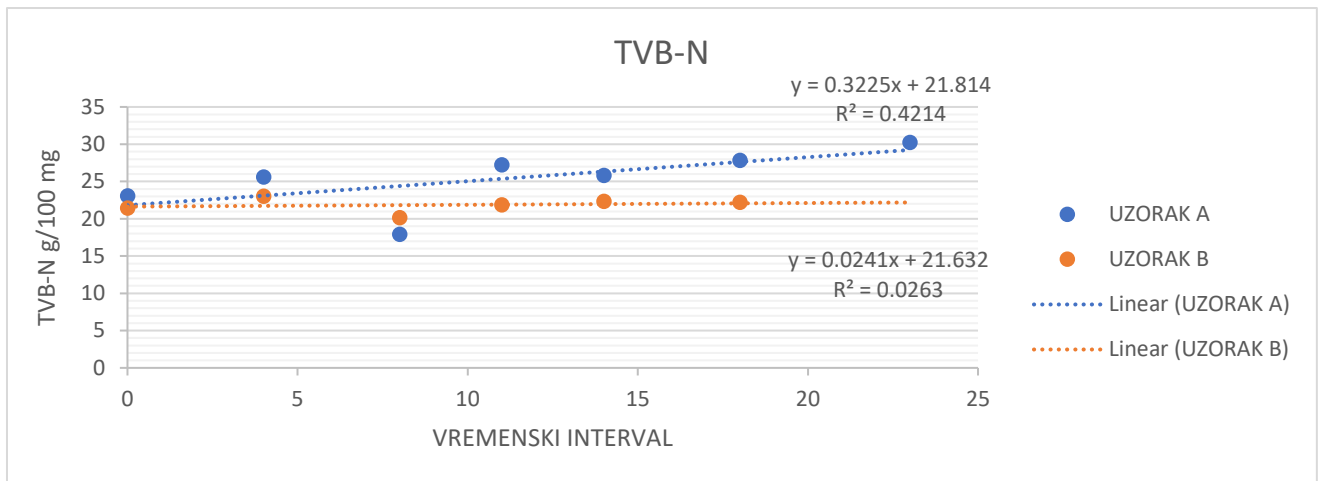
Analize su utvrdile da su uzorci A (T0, T4, T8, T11, T14 i T18) sukladni odredbama uredbe EZ br. 2073/2005 Europskog parlamenta i Vijeća od 15. studenog 2005. o mikrobiološkim kriterijima za prehrambene proizvode. Na mikrobiološkim i kemijskim ispitivanjima uzorak A nije bio sukladan za T23 (tablica 7.). Rezultati mikrobiološkog ispitivanja uzoraka pokazali su u uzorku A za T23 porast broja bakterija *Enterobacteriaceae*.

Nadalje, rezultati su pokazali da su uzorci B (T0, T4, T8 i T11) sukladni odredbama uredbe EZ br. 2073/2005 Europskog parlamenta i Vijeća od 15. studenog 2005. o mikrobiološkim kriterijima za prehrambene proizvode. Na mikrobiološkim ispitivanjima uzorci B nisu zadovoljavali mikrobiološke kriterije za T14 i T18 (tablica 7.) gdje je ustanovljena prekomjerna brojnost bakterija *S. aureus*. S obzirom da uzorci nisu zadovoljili mikrobiološke kriterije za T14 i T18, daljnja mikrobiološka analiza se nije provodila za T23.

Tablica 7. Prikaz rezultata mikrobiološkog ispitivanja.

Naziv pokazatelja	Mjerna jedinica	Mikrobiološki kriterij	Uzorak A, T23	Uzorak B, T14	Uzorak B, T18
<i>Salmonella spp.</i>	25 g	0	Nisu izolirane	Nisu izolirane	Nisu izolirane
<i>Enterobacteriaceae</i>	cfu/g	100	43000	< 10	< 10
Sulfitreducirajuće klostridije	cfu/g	100	< 10	< 10	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	cfu/g	10	< 10	480	1200
<i>Listeria monocytogenes</i>	25 g	0	Nisu izolirane	Nisu izolirane	Nisu izolirane

Kod uzoraka B nisu zabilježene značajne oscilacija u vrijednostima koncentracije TVB-N, dok je za uzorak A vidljiv blagi porast koncentracije TVB-N u vremenskim intervalima: T0, T4, T8, T11, T14, T18, T23 (slika 5).



Slika 5. Prikaz vrijednosti koncentracije TVB-N prema vremenskim intervalima: T0, T4, T8, T11, T14, T18, T23.

Rasprava

Ike Jime, tradicionalna japanska tehnika usmrćivanja i asfiksija u ledenoj bljuzgi, predstavljaju dva različita pristupa sa zajedničkim ciljem očuvanja kvalitete mesa i poboljšanja okusa finalnog proizvoda. Bolje razumijevanje prednosti i nedostataka obje metode pridonosi razvoju održive proizvodnje i humane prakse u ribolovnoj i prerađivačkoj industriji, istovremeno promičući visoke standarde u proizvodnji svježih i kvalitetnih riba. Tehnički aspekti oba postupka igraju ključnu ulogu u određivanju kvalitete ribe. Ike Jime metoda se smatra učinkovitom metodom usmrćivanja koja rezultira s minimalnim stresom za ribu (Diggles, 2006.). Omogućuje kontrolirano iskrvarenje i sprječava lučenje enzima koji mogu utjecati na okus mesa. S druge strane, asfiksijom u ledenoj bljuzgi riba se guši što može produžiti vrijeme smrti, a samim time dolazi i do veće vjerojatnosti za pojavu stresa kod ribe (Poli i sur., 2005.). Ekonomski gledano, Ike Jime metoda zahtjeva stručnost i obučenosn radnika, što može povećati troškove, dok je asfiksija u ledenoj bljuzgi jednostavnija za primjenu, ali potencijalno rezultira lošijom kvalitetom mesa. Etički aspekti uključuju pitanja o humanoj praksi prema ribi. Ike Jime se često percipira kao brža i manje stresna metoda usmrćivanja (Diggles, 2016.), dok asfiksija u ledenoj bljuzgi produžuje vrijeme smrti, a samim time predstavlja i patnju za ribu.

Mnogi autori navode da je najhumanija metoda usmrćivanja ribe prvenstveno njeno omamljivanje, a kasnije usmrćivanje (Filipović i sur., 2006.). Omamljivanjem riba nije mrtva, ali nema moždanu aktivnost te ne dolazi do stresa i lučenja stresnih hormona čime dolazi do manje vjerojatnosti za pojavu postmortalnih promjena koje utječu na kvalitetu mesa (Diggles, 2016.).

Slične rezultate istraživanja su dobili i Acerete i sur. (2008.) usporedbom asfiksije u ledu s omamljivanjem ugljičnim dioksidom naspram asfiksije bez leda. Ustanovili su kod riba koje su omamljene manji stres nego kod onih koje su usmrćene bez ikakvog omamljivanja, prema razinama kortizola u plazmi i posljedicama u metaboličkim mjerenjima, odnosno glukoze u plazmi i laktata u plazmi. Također, ribe koje nisu bile omamljene su pokazivale brže pogoršanje kvalitete. Razlika u senzorskim svojstvima je bila minimalna.

Rezultati našeg eksperimenta ustanovili su vidljive razlike u senzorskim svojstvima između ispitivanih uzoraka za T4, dok kasnije, ta T8 i T11 nisu pronađene značajne razlike u senzorskim parametrima. Također, uzorak usmrćen Ike Jime metodom pokazuje slabi i neobičan miris, bljutav i metalni okus, te ima ljepljivu i viskoznu teksturu, uz svjetlije riblje meso. Nasuprot tome, brancin usmrćen asfiksijom ima prepoznatljiv okus, miris i bolju

teksturu. Rezultati senzorskog ocjenjivanja za T8 su utvrdili da nema vidljivih razlika između dva uzorka osim metalnog okusa koji je i dalje bio prisutan u uzorku usmrćen Ike Jime metodom. Za T11 senzorski analitičari su dali bolju ocjenu uzorku koji je usmrćen Ike Jime metodom, a najviše su se razlikovali teksturom koja je kod uzorka usmrćenog asfiksijom bila ljepljiva i vlaknasta.

Ovo istraživanje je pokazalo da su uzorci brancina usmrćenih Ike Jime metodom bili sukladni mikrobiološkim kriterijima za prehrambene proizvode do T23, dok uzorci B, usmrćeni klasičnim načinom, nisu zadovoljavali mikrobiološke kriterije za T14 i T18. Zbog malog broja testiranja, nisu vidljive značajne razlike u vrijednostima TVB-N između različitih metoda usmrćivanja, ali je vidljiv blagi trend porasta te pozitivna korelacija kod Ike Jime metode. Ne postoji jedinstvena definirana granična vrijednost za TVB-N za brancina u Republici Hrvatskoj, međutim vrijednosti nisu prešle 35mg/100g. Prema Min i sur. (2019.) prag početnog kvarenja ribljeg mesa postiže se kada je razina TVB-N između 25-30 mg/100 g, a kada pređe više od 30 mg/100 g kvarenje mesa značajno napreduje.

Zaključak

Na temelju dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Na temelju rezultata senzorskog ocjenjivanja nije bilo moguće precizno definirati učinkovitiju metodu usmrćivanja brancina, ali je omogućen važan uvid u kvalitativne karakteristike finalnog proizvoda.
2. Rezultati provedenog eksperimenta ukazuju na složenost procjene kvalitete mesa ribe, te iziskuje dodatna istraživanja kako bi se procjena kvalitete mesa u odnosu na različite metode usmrćivanja ribe mogla determinirati.
3. Mikrobiološka analiza pokazala je da su uzorci fileta brancina usmrćeni Ike Jime metodom pokazali potencijalno dulji rok trajanja (T23) u usporedbi s uzorcima usmrćenima asfiksijom u ledenoj bljuzgi (T14), te sugeriraju da bi metoda Ike Jime mogla pridonijeti produljenju svježine i sigurnosti hrane.
4. U kontekstu dobrobiti riba, Ike Jime metoda izdvaja se kao preferirana opcija u odnosu na klasično usmrćivanje u ledenoj bljuzgi.
5. Izbor između Ike Jime metode i klasičnog usmrćivanja u ledenoj bljuzgi ovisi o balansu između postignuća optimalne dobrobiti riba i ekonomske isplativosti, uz uzimanje u obzir edukacije, usavršavanja i nabave specifične opreme. Kontinuirano praćenje inovacija u akvakulturi ključno je za održavanje ravnoteže između dobrobiti životinja, ekonomske održivosti i zadovoljstva potrošača u ovoj rastućoj industriji.

Popis literature

1. Acerete, L., Reig, L., Alvarez, D., Flos, R., & Tort, L. (2009.) Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 287(1–2): 139–144
2. Ahmed, M. (2011.) Population dynamic and fisheries management of Eeuropen sea bass, *Dicentrarchus labrax* (f. Moronidae) from Bardawil lagoon, North Sinai, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 15(1): 43–56
3. Amlacher, E., (1961.) Chapter 12 - Rigor Mortis in Fish. *Fish As Food*, Academic Press, 385-409
4. Anderson, W.G., McKinley, R.S., Colavecchia, M. (1997.) The Use of Clove Oil as an Anesthetic for Rainbow Trout and Its Effects on Swimming Performance. *North American Journal of Fisheries Management*, 17(2): 301–307
5. Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finoia, M., Brambilla, G., & Marino, G. (2007.) Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 263(1–4): 52–60
6. Bavčević, L. (2014.) Priručnik i vodič za dobru proizvođačku praksu - Kavezni uzgoj lubina i komarče. Savjetodavna služba, Zagreb
7. Bekhit, A. E. D. A., Holman, B. W., Giteru, S. G., & Hopkins, D. L. (2021.) Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109: 280–302
8. Boaru, A., Struti, D., Georgescu, B., (2022.) Guidelines and Implications of Fish Slaughtering in the Ensuring of Welfare and Product Quality. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 79 (1): 1-6
9. Bogdanović, T. (2012.) Službeno uzorkovanje proizvoda ribarstva i školjkaša, Zdravstveni uvjeti i fizikalno-kemijske metode određivanja za žive školjkaše i proizvode ribarstva. Hrvatski veterinarski institut, Vetereinarski zavod Split
10. Boyd, N. S., Wilson, N. D., Jerrett A. R., Hall, B. I., (1984.) Effects of Brain Destruction on Post Harvest Muscle Metabolism in the Fish Kahawai (*Arripis trutta*). *Journal of Food Science*, 49(1), 177–179

11. Boyland N., Brooke P., (2017.) The welfare of Farmed fish during slaughter in the European union. Aquaculture Advisory Council (AAC) Report, Brussels, Belgium
12. Castro, P., Millán, R., Penedo, J. C., Sanjuán, E., Santana, A., & Caballero, M. J. (2012.) Effect of Storage Conditions on Total Volatile Base Nitrogen Determinations in Fish Muscle Extracts. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(5): 519–523
13. Costa, M.J. (1988.) Écologie alimentaire des poissons de l'estuarie du Tage. *Cybium* 12(4): 301–320
14. Ćosić, D. (2020.) Utjecaj uzgojne tehnike na ponašanje i kvalitetu ribe (Završni rad). Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
15. Daskalova, A. (2019.) Farmed fish welfare: stress, post-mortem muscle metabolism, and stress-related meat quality changes. *International Aquatic Research*, 11: 113–124
16. Diouf, B. i Rioux, P. (1999.) Use of the Rigor Mortis Process as a Tool for Better Understanding of Skeletal Muscle Physiology: Effect of Ante-Mortem Stress on the Progression of Rigor Mortis in Brook Charr (*Salvelinus fontinalis*). *The American Biology Teacher*, 61(5): 376–379
17. Dubuisson, M. (1954.) *Muscular Contraction*, Springfield: Thomas, Cambridge, United Kingdom
18. Dufour, V., Cantou, M. i Lecomte, F. (2009.) Identification of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nursery areas in the north-western Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89(7): 1367–1374
19. Embden, G. (1925.) *Chemismus der Muskelkontraktion und Chemie der Muskulatur*. *Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie*, 7: 369-400
20. Fiedler, K., (1991.) *Lehrbuch der Speziellen Zoologie. Fische*, 2(2): 498
21. Filipović, I., Kozačinski, L., Hadžiosmanović, M., Cvrtila, Ž., Zdolec, N. i Bojanić, K. (2007.), Omamljivanje riba, *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu*, 9(2), 109-113
22. Flückiger (1937.) The Marking of Animals for Veterinary Police Purposes. *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, 14: 228-244
23. Ganguly, S., Bordoloi, R. (2014.) An insight to the quality parameters in fish processing technology: A review. *Indian Journal Of Scientific Research and Technology*, 2(3): 1-3
24. Harada, K. (1988.) Presenting fish for sale on the Japanese market. *Australian Fisheries*, 47(6) 45: 38-42
25. Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S., Eliassen, R.A. (2003.) The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S and Benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo*

- salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, 221 (1–4): 549–556
26. Jardas, I., (1996.), *Jadranska ihtiofauna*. Školska knjiga, Zagreb
 27. Keene, J.L., Noakes, D.L.G., Moccia, R.D., Soto, C.G., (1998.) The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29(2): 89–101
 28. Kestin, S., Wotton, S., Adams, A., (1995.) The effect of CO₂, concussion or electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on fish welfare. *Proceedings of Aquaculture Europe 95*: 9-12
 29. Kildea, M.A., Allan, G.L., Kearney, R.E. (2003.) Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* 232 (1–4): 265–277
 30. Lambooij, E., Grimsbø, E., van de Vis, J.W., Reimert, H.G.M., Nortvedt, R., Roth, B. (2010.) Percussion and electrical stunning of Atlantic salmon (*Salmo salar*) after dewatering and subsequent effect on brain and heart activities. *Aquaculture*, 300(1–4): 107–112
 31. Martinis, I. (2004.) *Nutritivna alegrija*. *Medix*, 52: 86-88
 32. Maruthi, V., Varatharajan, D., Sivaraman, B. (2021.) Ikejime or Brain spiking method - A better way to kill a fish.
 33. Mikuš, T., Kozačinski, L., Ostović, M. (2020.) Utjecaj metoda za omamljivanje i usmrćivanje na kvalitetu mesa riba. *Meso: Prvi hrvatski časopis o mesu*, 22(3): 227-233
 34. 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
 35. Min, J. G., Joung, B., C.. Jung, W. Y. (2019.) Postmortem Changes in Spinal Cord-damaged Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Food and Nutrition Research*, 7(7): 500-505
 36. Mochizuki, S., i Sato, A. (1994.) Effects of Various Killing Procedures and Storage Temperatures on Post-mortem Changes in the Muscle of Horse Mackerel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 60(1): 125-130
 37. Muscolino, D., Giarratana, F., Beninati, C., Tornambene, A., Panebianco, A., Ziino, G. (2014.) Hygienic-Sanitary Evaluation of Sushi and Sashimi Sold in Messina and Catania, Italy. *Italian Journal of food safety*, 3(2): 134-136

38. NN (1999.) Pravilnik o kriterijima o pogodnosti dijelova pomorskog dobra za uzgoj riba i drugih organizama. Narodne novine 08/99
39. NN (2004.) Pravilnik o općem deklariranju ili označavanju hrane. Narodne novine 114/2004
40. NN (2008.) Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Narodne novine 74/08.
41. NN (2012.) Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani. Narodne novine 146/2012
42. NN (2013.) Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Službeni list Europske unije, L br. 338, 15. studenoga 2005., str. 1-26.
43. NN (2022.) Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu. Narodne novine 83/2022
44. Pérez-Ruzafa, A., Marcos, C. (2014) Ecology and Distribution of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus 1758). U: Biology of European Sea Bass - CRC Press, Boca Raton, 3-34
45. Poli, B. M., Messini, A., Parisi, A., Scappini, F., Vigiani, V., Giorgi, G., Vincenzini, M. (2005.) Sensory, physical, chemical and microbiological changes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets packed under modified atmosphere/air or prepared from whole fish stored in ice. International Journal of Food Science & Technology, 41(4): 444–454
46. Rahman, M.S., Velez-Ruiz, J.F. (1999.) Food preservation by freezing. Handbook of Food Preservation, 2: 636-657
47. Ribas, L., Flos, R., Reig, L., MacKenzie, S., Barton, B. A., Tort L. (2007.) Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. Aquaculture, 269(1–4): 250–258
48. Riesser, O. (1925.) Totenstarre der glatten Muskulatur. Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, 209: 395-413
49. Robb, D.H.F. i Kestin, S.C. (2002.) Methods Used to Kill Fish: Field Observations and Literature Reviewed. Animal Welfare, 11(3): 269–282
50. Službeni list Europske unije L 338/27 (2005.) Uredba komisije (EZ) br. 2074/2005
51. Sorensen, N.K., Brataas, R., Nyvold, T.E., Lauritzen, K. (1997.) Influence of early processing (pre-rigor) on fish quality. Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality. 253–263.
52. Tahsin, K.N. (2017.) A review on the techniques for quality assurance of fish and fish products. International Journal of Advanced Research in Science and Engineering, 4: 4190-4206.

53. The EFSA Journal (2009.) Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission on welfare aspect of the main systems of stunning and killing of farmed seabass and seabream. 1010, 1-52
54. Wall, A.J., (2001.) Ethical considerations in the handling and slaughter of farmed fish. *Farmed Fish Quality*. 108–115.
55. Zampacavallo, G., Parisi, G., Mecatti, M., Lupi, P., Giotgi, G., Poli, B. M. (2014.) Evaluation of different methods of stunning/killing sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by tissue stress/quality indicators. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5): 2585–2597
56. Žoldoš, P., Popelka, P., Marcinčák, S., Nagy, J., Mesarčová, L., Pipová, M., Mařa, P. (2011.) The effect of glaze on the quality of frozen stored Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) fillets under stable and unstable conditions. *Acta Veterinaria Brno*, 80(3): 299-304

Web stranice:

IGFA (2001.)

Preuzeto s https://igfa.org/2023/09/28/the-catch-heard-round-the-world/?gad_source=1&gclid=CjwKCAjw7-SvBhB6EiwAwYdCAUU5Bwi8cMgx2OESRCdNYJqnBpgAuUF9TiMqqwwvMFD4oSFsuqARuBoCmYEQA vD BwE , (pristupljano 14.3.2024.)