

ZNANSTVENA STUDIJA O KAKVOĆI ZAMRZNUTOG MESA SVINJA

Znanstvena studija izrađena je sukladno čl. 15., st. 1. Zakona o hrani (NN 81/13, 14/14), Pravilniku o izdavanju znanstvenog mišljenja i pružanju znanstvene i tehničke pomoći (NN 130/09) te čl. 14.

Pravilnika o sadržaju, obrazloženju i objavi znanstvenih mišljenja Hrvatske agencije za hranu

Znanstvena studija izrađena je na vlastitu inicijativu.

Znanstvena studija usvojena je na 2. sjednici Znanstvenog vijeća Hrvatske agencije za hranu održanoj 10. rujna 2014.

ČLANOVI RADNE GRUPE

Prof. dr. sc. Goran Kušec, Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski, Veterinarski fakultet, Zagreb

Prof. dr. sc. Bela Njari, Veterinarski fakultet, Zagreb

Prof. dr. sc. Helga Medić, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

Doc. dr. sc. Jelka Pleadin, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Doc. dr. sc. Vladimir Margeta, Poljoprivredni fakultet u Osijeku

KOORDINATOR RADNE GRUPE

Dr. sc. Brigita Hengl, Hrvatska agencija za hranu

SAŽETAK

Kakvoća zamrznutog mesa svinja u ovoj se studiji procjenjivala u uzorcima mesa leđnog mišića (kare, *m. longissimus dorsi*), buta i trbušno-rebarnog dijela („hamburger slanina“). Od fizikalnih parametara određivala se boja mesa, otpuštanje mesnog soka, kapacitet zadržavanja vode i tekstura mesa. Kemijske promjene praćene su kroz aktivnost vode, određivao se udio sirovih bjelančevina, sirovih masti i vode, peroksidni broj, TBA (tiobarbituratna kiselina) i sastav masnih kiselina, a pH vrijednost odredila se 45 minuta nakon klaoničke obrade te nakon tehnološkog hlađenja od 24 sata. Mikrobiološke pretrage obuhvatile su *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, sulfitreducirajuće klostridije, *Enterobacteriaceae*, ukupni broj psihrofilnih bakterija, ukupni broj

aerobnih mezofilnih bakterija i *Pseudomonas* spp.. Fizikalne, kemijske i mikrobiološke promjene praćene su na način da su promatrani parametri analizirani na uzorcima svježeg mesa, te u uzorcima mesa čuvanim na temperaturi od -18 °C, nakon tri, šest, dvanaest, petnaest i osamnaest mjeseci.

Iz studije se može vidjeti trend povećanja udjela otpuštene vode nakon odmrzavanja koji raste s dužinom pohrane uzoraka u zamrzivaču. Utvrđene su značajne razlike između pH vrijednosti tijekom razdoblja pohrane u zamrzivaču, iako one nisu od praktične važnosti i ne upućuju na anomalije u kakvoći mesa nastale tijekom uskladištenja mesa. Rezultati ove studije pokazuju kako meso buta postupno postaje bljeđe tijekom pohrane u zamrzivaču, a sličan trend pokazuje i ledni mišić. Tijekom istraživanih razdoblja pohrane mesa u zamrzivaču razlike u tvrdoći, odnosno nježnosti mesa izražene kao Warner-Bratzler otpornost na presjek, u slučaju buta nisu bile značajne. S druge strane, zabilježeno je značajno omekšavanje mesa leđnog dijela nakon tri mjeseca zamrzavanja. Na temelju dobivenih TBA vrijednosti možemo zaključiti da je meso nakon osamnaest mjeseci uskladištenja prihvatljive kakvoće za potrebe prerade u asortiman mesnih proizvoda. Međutim, kontinuirani porast peroksidnog broja tijekom pohrane, odnosno njegove visoke vrijednosti nakon petnaest mjeseci uskladištenja, upućuju na najduže preporučeno razdoblje pohrane svinjskog mesa u zamrznutom stanju do dvanaest mjeseci. Mikrobiološke promjene koje smo pratili u svježim i zamrznutim uzorcima mesa svinja sukladne su podacima u literaturi koji ukazuju da se zamrzavanjem može smanjiti broj bakterija koje se nalaze u mesu, a mikroflora zamrznutog mesa ovisi o mikroflori svježeg mesa. Kako bakterije ne rastu ili rastu otežano na temperaturama ispod -10 °C, eventualno onečišćenje mesa koje će biti konzervirano zamrzavanjem vezano je uz higijensku kakvoću sirovine i manipulaciju mesom prije zamrzavanja odnosno pri i nakon odmrzavanja. U pogledu mikrobiološke ispravnosti zamrznute svinjetine u našem istraživanju nakon osamnaest mjeseci pohrane mesa nisu utvrđena odstupanja na osnovu kojih bi meso bilo upitne mikrobiološke kakvoće, međutim, mikrobiološka slika nije jedini čimbenik procjene održivosti zamrznutog mesa. Broj patogenih bakterija ili bakterija kvarenja mesa može biti smanjen primjenom strategija dobre proizvodne prakse (DPP) na farmi, dobre higijenske prakse (DHP) u klaoničkom objektu i primjenom adekvatnih tehnoloških postupaka proizvodnje, ne ulazeći potom u procjenu hranjive vrijednosti mesa odnosno njegovu komercijalnu kakvoću.

KLJUČNE RIJEČI

Zamrznuto meso svinja, fizikalni, kemijski i mikrobiološki parametri, kakvoća mesa,

SUMMARY

The quality of frozen pork meat in this study was estimated through three categories of meat: loin, ham and bacon. The following physical parameters were recorded: meat color, drip loss, water holding capacity and texture of meat. Chemical changes were monitored through water activity, crude protein, crude fat and water content, peroxide number, TBA (tiobarbiturat acid) and fatty acid

composition. pH value was determined 45 minutes after slaughter processing and after storage of 24 hours. Microbiological analyses cover *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, sulphite reducing clostridia, *Enterobacteriaceae*, the total colony count for psychrotrophic bacteria and aerobic mesophilic bacteria, and *Pseudomonas* spp.. Physical, chemical and microbiological changes were observed in the way that the observed parameters analyzed in fresh meat, and meat stored at -18 °C and analyzed after three, six, twelve, fifteen and eighteen months.

The results from studies showed the increasing share of discharged water after thawing, which grows with the length of sample storage in the freezer. Significant differences were found between pH value during the storage period in the freezer, although they are not of practical importance and do not indicate anomalies in the quality as a result of meat storage. Results of this study show that meat ham gradually becoming paler during storage in the freezer, and a similar trend is shown by the loin. During the investigation period differences in hardness or tenderness of meat expressed as Warner-Bratzler resistance section, in the case of the ham were not significant. On the other hand, a considerable softening of loin meat three months after freezing was recorded. Based on the TBA values, we can conclude that the meat after six months of storage is of adequate quality for processing. However, the continuous increase of peroxides during storage, and its high value after fifteen month storage period, indicates that the maximum recommended storage period pork in a frozen state is for a period of up to twelve months. Microbiological changes that we monitored in fresh and frozen pork were consistent with the data in the literature to suggest that freezing may reduce the number of bacteria that are found in meat and frozen meat microflora depends on the microflora of fresh meat. As bacteria do not grow or grow more difficult at temperatures below -10 °C, possibly contamination of meat that will be preserved by freezing, is related to the hygienic quality of raw materials and handling meat before freezing or when defrosting. The microbiological safety of frozen pork in our study after eighteen months of storage showed no deviations based on which the meat was questionable microbiological quality, however, microbiological image is not the only factor assess the sustainability of frozen meat. The number of pathogenic bacteria or bacterial spoilage of meat can be reduced by applying strategies GPP on the farm, GHP in slaughterhouses and applying adequate technological methods of production, not including later assessment of the nutritional value of meat and its commercial quality.

KEY WORDS

Frozen pork meat, physical, chemical and microbiological parameters, meat quality

ZAHVALE

Hrvatska agencija za hranu zahvaljuje svim članovima Radne skupine na doprinosu u izradi ove studije.

Posebna zahvala mr. sc. Domagoju Ovničeviću na pomoći u organizaciji i pripremi uzoraka za pokusni dio ove studije.

SADRŽAJ

ČLANOVI RADNE GRUPE	1
KOORDINATOR RADNE GRUPE	1
SAŽETAK	1
KLJUČNE RIJEČI	2
SUMMARY	2
KEY WORDS	3
ZAHVALE	3
SADRŽAJ	5
UVOD	6
PREGLED LITERATURE	7
Promjene u fizikalnim svojstvima tijekom zamrzavanja	7
Promjene u kemijskom sastavu smrznutog svinjskog mesa	8
Mikrobiološke promjene u zamrznutom svinjskom mesu	10
METODE	14
REZULTATI	18
Fizikalna svojstva zamrznutog mesa	18
Kemijska svojstva zamrznutog mesa	26
Zastupljenost pojedinih masnih kiselina	30
RASPRAVA	39
Fizikalna svojstva zamrznutog mesa	39
Kemijska svojstva zamrznutog mesa	40
Osnovni kemijski sastav	40
Sastav masnih kiselina	40
Promjene peroksidnog broja	41
Mikrobiološka svojstva zamrznutog mesa	43
ZAKLJUČCI I PREPORUKE	44
Promjene u fizikalnim svojstvima zamrznutog mesa svinja	44
Promjene mikrobioloških svojstava zamrznutog mesa svinja	45
LITERATURA (REFERENCE)	47
DODATAK 1.	53
DODATAK 2.	57

UVOD

Kakvoća mesa svinja koje je podvrgnuto tehnološkom postupku zamrzavanja višegodišnja je tema rasprave hrvatske javnosti u medijima, nadležnom tijelu i među potrošačima. S jedne strane subjekti u poslovanju s hranom koriste tehnološki postupak zamrzavanja kao najpouzdaniji način zadržavanja optimalnih svojstava svinjskog mesa, a s druge strane potrošači su izloženi nejasnim informacijama o posljedicama tog tehnološkog procesa na kakvoću mesa s mikrobiološkog, kemijskog, nutritivnog, zdravstvenog i tehnološkog stajališta. Subjekti u poslovanju s hranom suočeni su s nedostatkom precizne zakonske legislative, te nedostatkom odobrenih vodiča za takvu vrstu proizvodnje. Osim toga, literaturni izvori koji bi mogli poslužiti kao smjernice u rješavanju ovog problema su rijetki. Stoga je, u praksi, često vrlo teško donositi pravilne odluke sa stajališta sigurnosti i kakvoće hrane.

Na kakvoću zamrznutog svinjskog mesa utječe čitav niz čimbenika, kao što su zdravstveno stanje svinja prije klaoničke obrade, anatomska lokacija u trupu svinje (udio masnog tkiva), primjena dobre higijenske prakse tijekom klaoničke obrade, trajanje obrade od trenutka klanja do tehnološkog hlađenja, pohrana ohlađenog mesa do njegovog zamrzavanja, režim zamrzavanja, vremenski rok uskladištenja, način odmrzavanja, te namjena mesa nakon odmrzavanja. Svaki od nabrojenih čimbenika ima veći ili manji utjecaj na kakvoću mesa svinja, pa ih je potrebno dodatno pojasniti kako bi i utjecaj na meso bio jasniji te se mogli spriječiti ili potpuno isključiti. Kako se radi o kompleksnom problemu, potrebno je dati znanstveno pojašnjenje s različitih stajališta: zootehničkog, veterinarskog, prehrambeno – tehnološkog, mikrobiološkog i kemijskog, a u funkciji javnog zdravstva i sigurnosti hrane.

Svrha i cilj ove studije je na znanstveno – stručnim temeljima provesti istraživanje čiji bi se rezultati mogli koristiti u svrhu poboljšanja dobre proizvođačke prakse, kako bi se zamrzavanje mesa svinja provodilo na način kojim je osigurano da se u najvećoj mjeri sačuvaju sva poželjna svojstva svinjskog mesa. Subjekti u poslovanju s hranom dobiti će smjernice o dijelovima tehnološkog procesa kojima se treba obratiti posebna pažnja. Potrošači će dobiti nedvosmisleni znanstveno utemeljenu informaciju o kakvoći zamrznutog mesa svinja kojom se doprinosi edukaciji potrošača te im se otvara mogućnost pravilnog odabira ove vrste hrane.

Studija o kakvoći zamrznutog mesa svinja, pokrenuta od strane Hrvatske agencije za hranu, imala je za cilj utvrditi kakvoću pojedinih osnovnih dijelova trupa svinja nakon zamrzavanja: buta, leđa i slanine (hamburgera), odnosno nakon različitih vremenskih intervala pohrane u određenom režimu zamrzavanja. U studiji je dan pregled zakonski propisanih uvjeta objekata i načina uspostave postupaka tehnološkog procesa zamrzavanja. Dobiveni rezultati su osnova za identifikaciju potencijalne opasnosti te moguće preporuke nadležnim tijelima za donošenje potrebnih podzakonskih akata, pomoć pri radu inspeksijskih veterinarskih, sanitarnih i gospodarskih službi, ovlaštenih i akreditiranih nadzornih i certifikacijskih tijela, usmjeravanje subjekata u poslovanju s hranom u

ispravno provođenje dobre higijenske i proizvođačke prakse, a potrošačima dovoljna informacija o svojstvima kakvoće zamrznutog mesa svinja.

PREGLED LITERATURE

Zamrzavanje mesa je stara tehnologija očuvanja hrane, a datira još od davne 1880. godine kada je u V. Britaniju isporučena pošiljka zamrznutog mesa (govedina i ovčetine) iz Australije. U pogledu moguće održivosti zamrznutog mesa važno je naglasiti da se ono može čuvati različito dugo i zavisno o visini primijenjene temperature i drugim mikroklimatskim uvjetima (cirkulacija zraka, vlažnost). Različiti autori navode približne vrijednosti vremena održivosti svinjetine ovisno o temperaturi pohrane, tako da je na temperaturi od -18 °C svinjetina održiva od šest do dvanaest mjeseci, a na -15 °C od tri do pet mjeseci. Slične podatke iznosi Hadžiosmanović (2005) koji navodi da su optimalna vremena za održivost mesa svinja na -5 °C 25 do 30 dana; -10 °C 60 dana; -15 °C 150 dana; -20 °C 450 dana. Prema Graceyju i sur. (1999) praktično vrijeme pohrane svinjskih polovica iznosi šest mjeseci na -12 °C, deset mjeseci na -18 °C, odnosno petnaest mjeseci na temperaturi od -24 °C, dok Food Science Australia (Anon., 2002) navodi da je na temperaturi od -30 °C svinjetina održiva petnaest mjeseci. Takvo meso ukoliko je udovoljeno i ostalim mikroklimatskim uvjetima ne gubi značajno na svojim senzorskim niti nutritivnim svojstvima u odnosu na svježe ohlađeno meso.

Promjene u fizikalnim svojstvima tijekom zamrzavanja

Današnja trgovina svinjskim mesom u globalnom se smislu ne može ni zamisliti bez postupaka zamrzavanja koja omogućuju isporuke mesa u najudaljenije točke svijeta. Zato je ova metoda produžavanja vijeka uporabe mesa jedna od najčešće upotrebljivanih. Međutim, utjecaj zamrzavanja i odmrzavanja i dalje predstavlja značajan problem. Razumijevanje promjena koje se događaju kao posljedica zamrzavanja i odmrzavanja u mesu od velike je važnosti za mesnu industriju jer je njezin najvažniji cilj opskrba tržišta mesom dobra izgleda i drugih svojstava koja potrošači nalaze privlačnim (Renner, 1990).

Posljedice zamrzavanja mesa i promjene kvalitativnih svojstava mesa, posebice fizikalnih svojstava, najviše su povezane s vodom u mesu. Zamrzavanjem vode, koncentracija ostalih sastojaka (bjelančevina, lipida, ugljikohidrata, vitamina i minerala) se povećava što dovodi do poremećaja homeostaze složenog sustava mesa (Lawrie, 1998). Tijekom postmortalnih promjena iz mišića se prirodno gubi određen dio vode zbog biokemijskih procesa koje obilježavaju pad pH vrijednosti, razgradnja adenozin trifosfata (ATP) i sterički efekt skupljanja miofibrila koji rezultira nastankom *rigor mortis* i kondicioniranja mesa (Huff-Lonergan i Lonergan, 2005). Mjerenje gubitka vode izvodi se nizom različitih metoda za koje, na žalost, ne postoje međunarodni standardi pa je teško uspoređivati rezultate i tako izvoditi zaključke iz literaturnih pregleda gdje se spominju različiti postupci pretaga.

Najčešće korištene metode u istraživanjima gubitka vode svinjskog mesa su metoda vrećice (Honikel, 1987), metoda EZ-drip koja joj je vrlo slična, ali umjesto vrećice se koriste posebni kontaineri

(Rasmussen i Andersson, 1996) i metoda kompresije (Grau i Hamm, 1953). Bez obzira na metodu, istraživači su općenito suglasni da zamrzavanje, trajanje uskladištenja i odmrzavanje mesa doprinose smanjenju sposobnosti zadržavanja vode, odnosno doprinose povećanom gubitku vode u mesu (Ngapo i sur., 1999; Vieira i sur., 2009). Među razlozima za gubitak vode iz mesa nakon zamrzavanja, u literaturi se navode razaranje miofibrilarne strukture mišića i modifikacija, odnosno, denaturacija bjelancevina. Od ostalih fizikalnih svojstava koje se mijenjaju tijekom zamrzavanja, uskladištenja i odmrzavanja mesa treba spomenuti pH vrijednosti, parametre boje (CIE-L*, a*, b*) i tvrdoću, odnosno nježnost mesa.

U zamrznutom mesu nakon odmrzavanja, pH vrijednosti pokazuju tendenciju laganog pada u odnosu na stanje prije zamrzavanja (Leygonie i sur., 2011). Za promjene u boji mesa i stabilnost boje nakon odmrzavanja odgovornim se smatra mioglobin, odnosno denaturacija globinskog dijela molekule koja se događa u određenom trenutku tijekom zamrzavanja, pohrane i odmrzavanja (Calvelo, 1981). Dosadašnja istraživanja pokazuju visoku usuglašenost u rezultatima koji ukazuju na umanjivanje tvrdoće, odnosno povećanu nježnost mesa nakon odmrzavanja (Lagerstedt i sur., 2008).

Promjene u kemijskom sastavu smrznutog svinjskog mesa

Zamrzavanje je jedna od najvažnijih metoda konzerviranja mesa i mesnih proizvoda jer, u usporedbi s drugim metodama, izaziva minimalne promjene u kakvoći tijekom dugotrajne pohrane u zamrznutom stanju. Pohrana u zamrznutom stanju koristi se zbog usporavanja nepoželjnih biokemijskih reakcija u mesu, ali s druge strane, zbog formiranja kristala leda, dolazi do razaranja stanica i mišićnih vlakana. Veličina kristala leda i njihov smještaj u unutar i izvan staničnog prostora zamrznutog mesa variraju s brzinom zamrzavanja, dok količina formiranog leda ovisi o temperaturi zamrzavanja. Stoga, brzina zamrzavanja i temperatura pohrane zamrznutog mesa utječu na njegovu strukturu i senzorsku kakvoću (Soyer i sur., 2010).

Finalna temperatura na koju je meso zamrznuto i pohranjeno određuje količinu nezamrznute vode koja ostaje na raspolaganju za kemijske reakcije. Biokemijske reakcije se odvijaju u zamrznutom mesu koje je pohranjeno na temperaturi -20 °C jer je pri toj temperaturi još uvijek prisutna dovoljna količina nezamrznute vode da bi se te reakcije mogle odvijati. Optimalna temperatura za pohranu zamrznutog mesa je -40 °C jer pri toj temperaturi nije zamrznut izuzetno mali postotak vode te je voda vezana za komponente mesa i kemijski je neaktivna.

Općenito gledano, zamrzavanje vode odnosno stvaranje kristala leda uzrokuje povećanu koncentraciju topljivih tvari u preostaloj vodi, unutar i izvan stanično, što se smatra razlogom povećane kemijske aktivnosti u zamrznutom mesu tijekom pohrane. Frakcija vode koja nije zamrznuta važna je i u smislu oksidacije, jer kemijske reakcije koje se odvijaju u zamrznutom mesu iniciraju lipidnu oksidaciju i nastajanje primarnih produkata oksidacije – hidroperoksida. Metoda za određivanje primarnih produkata oksidacije je peroksidni broj, koja je i korištena u predmetnom istraživanju.

Tijekom vremena primarni produkti oksidacije dalje reagiraju i nastaju sekundarni produkti oksidacije koje određujemo pomoću TBA metode. Sekundarni produkti (aldehidi, ketoni) kao pentanal, heksanal, 4-hidroksinonenal i malondialdehid (MDA), uzrokuju užegao i neugodan okus i miris mesa. Uzrok kvarenja mesa i mesnih proizvoda je lipidna oksidacija. Lipidna oksidacija odvija se na masnim kiselinama, posebice na višestruko nezasićenim masnim kiselinama. Tada nastaju razni produkti koji mijenjaju kakvoću proizvoda (mijenja se boja, aroma, okus, tekstura, pa čak i nutritivna vrijednost).

Također, postoje dokazi da se lipidna oksidacija odvija primarno na nivou staničnih membrana - fosfolipida, a ne u trigliceridnoj frakciji masti. Stoga je lipidna oksidacija detektirana u mršavom i masnom mesu (Leygonie i sur., 2012). Fosfolipidi su u većoj mjeri građeni od višestruko nezasićenih masnih kiselina (Fernández i sur., 1997), koje su podložnije oksidaciji od zasićenih masnih kiselina u trigliceridima. U sastavu mesa, lipidi se nalaze u mišićnom tkivu (intramuskularno i intermuskularno masno tkivo) i u pripadajućem masnom tkivu, pri čemu se u masnom tkivu nalaze trigliceridi, a u mišićnom, uz trigliceride u membranama mišićnih vlakana, i fosfolipidi (Barbir i sur., 2014).

Tijekom postupka zamrzavanja i pohrane zamrznutog mesa dolazi do kemijskih reakcija koje često imaju neželjene posljedice na kakvoću mesa, uzrokujući degradaciju lipida, vitamina, proteina, ugljikohidrata i pigmenata. Zamrzavanje pod određenim uvjetima uzrokuje promjene u kemijskom sastavu mesa u ovisnosti o vrsti mesa kao i uvjetima njegove pohrane (temperatura, trajanje, temperaturne oscilacije, itd.). Najznačajnija promjena uzrokovana dugotrajnim zamrzavanjem svinjskog mesa odnosi se na oksidaciju lipida, rezultirajući užeglošću, te je primarni uzrok negativnih promjena okusa, boje, teksture, nutritivne vrijednosti kao i nastanka potencijalno toksičnih sastojaka u mesu i proizvodima od mesa (Kanner, 1994; Hansen i sur., 2004).

Iako svi proizvodi od mesa mogu biti izloženi lipidnoj oksidaciji, zamrznuti proizvodi od svinjskog mesa tijekom uskladištenja su izrazito podložni oksidaciji i razvoju užeglosti, zbog visoke razine višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) u odnosu na druge vrste mesa (Buckley i sur., 1989). Skeletni mišić je posebno izložen oksidativnim reakcijama, jer sadrži visoke koncentracije prooksidanata (prijelaznih metala, mioglobina, hemoglobina) te lipida membrana, koje sadrže visoki postotak PUFA (Kanner, 1994). PUFA su vrlo osjetljive na oksidaciju zbog nestabilne dvostruke veze, a čak i male promjene u razinama PUFA u mišićima mogu imati značajne učinke na razvoj užeglosti. Kako se udio nezasićenih masnih kiselina povećava, osjetljivost na razvoj oksidacije i užeglosti se povećava kroz neproporcionalni omjer (Shahidi, 1992). Ujedno, visoka razina PUFA u membranama fosfolipida dodatno povećava potencijal za oksidaciju s obzirom na veliku površinu membrane i blizinu prooksidativnih spojeva u stanici. Istraživanja provedena na pojedinim vrstama proizvoda od svinjskog mesa pokazala su da kao takvi mogu biti pohranjeni na -10 °C oko 7 mjeseci, nakon čega se senzorskim metodama mogla identificirati užeglost (Hansen i sur., 2004). Ujedno, tijekom smrzavanja nisu utvrđene značajne promjene kod proteina odnosno promjene koje bi ukazivale na njihovu degradaciju.

Vitamin E (tokoferol) je snažan biološki antioksidans koji se dobiva prehranom, a u organizmu inaktivira slobodne radikale u staničnoj membrani. Istraživanja su pokazala da vitamin E unesen hranidbom svinja dovodi do smanjenja u razvoju oksidativne užežlosti cijelog mišićnog tkiva svinja te smanjuje gubitke tijekom otapanja svinjskog mesa (Hertzman i sur., 1988). Djelovanje se ostvaruje na način da kada se ovaj vitamin unese hranidbom dolazi do povišene koncentracije tokoferola u staničnoj membrani, posebno u mitohondrijima i mikrosomima, te smanjene osjetljivosti membranskih lipida na oksidaciju (Asghar i sur., 1991; Monahan i sur., 1994). Koncentracija tokoferola potrebna u mišiću za maksimalnu stabilnost na oksidaciju lipida je 7-10 mg/kg svježeg mišićnog tkiva, što se može postići pomoću 100-200 mg vitamina E / kg hrane u hranidbi svinja (Bruni, 1993). Međutim, važno je i da potreba za vitaminom E raste kako se povećava koncentracija PUFA u membranama. Razina PUFA u membranama može se povećati ugradnjom npr. ribljeg ulja i ribljeg brašna ili određenih biljnih ulja u hranu namijenjenu hranidbi životinja (Ponnompalam i sur., 2001). Povećana razina PUFA u membranama također može rezultirati proizvodnjom genetski manje masnih svinja s obzirom da su PUFA razine veće u svinja s više mišića u odnosu na udio masti (Dunshea, 1994). Stoga, može se pretpostaviti da u slučajevima u kojima prehrambene razine vitamina E nisu povećane s obzirom na višu razinu PUFA, zbog prehrambenih i genetskih učinaka lipidi mogu postati više osjetljivi na oksidaciju. Kao rezultat toga, tijekom proizvodnje proizvoda od svinjskog mesa postoji povećan rizik od razvoja oksidacije tijekom obrade i uskladištenja zamrznutog mesa. Pojedina istraživanja pokazala su da je vitamin E tijekom zamrzavanja visoko stabilan u sirovoj svinjetini u razdoblju do 10 mjeseci na temperaturi od -25 °C (Jensen i sur., 1998).

Nadalje, rezultati govore da dugotrajno uskladištenje (duže od šest mjeseci) zamrznutog mesa uzrokuje promjene u težini mesa, pojavu žućkaste boje i diskoloraciju, ali i da su nastale promjene više posljedica uvjeta smrzavanja i odmrzavanja, nego razdoblja pohrane smrznutog mesa. Istraživanja pokazuju i da se procesi oksidacije lipida i oksidacije mioglobina događaju istovremeno, pri tom utječući jedan na drugi (Filgueras i sur., 2011) te da sadržaj suhe tvari svinjskog mesa značajno ovisi o trajanju dubokog smrzavanja kao i načinu njegovog odmrzavanja (Kondratowicz i sur., 2008).

Mikrobiološke promjene u zamrznutom svinjskom mesu

Svježe meso je zbog svojih karakteristika i sastava hrana izrazite male trajnosti. Mnogi čimbenici koji se međusobno isprepliću utječu na njegovu održivost i svježinu. To su prije svega temperatura uskladištenja, prisutnost atmosferskog kisika, endogenih enzima, količina vlage, svjetlost i najznačajniji među njima – brojni mikroorganizmi.

Zahtjevi za visokom kakvoćom, koji uključuju prikladnost, sigurnost, svježinu, ali i produženi rok održivosti hrane, doveli su do ubranog razvoja postupaka konzerviranja mesa. Neke su od tih tehnologija učinkovite i inaktiviraju brojne mikroorganizme kvarenja, najčešće uzročnike bolesti prenosivih hranom, ali ne inaktiviraju spore, pa se različiti tehnološki postupci konzerviranja mogu

kombinirati (Zhou i sur., 2010). Za većinu zamrznute hrane označeno je vrijeme zamrzavanja i predloženo maksimalno vrijeme čuvanja u takvom stanju. Međutim, predložene maksimalne vrijednosti nisu bazirane na mikrobiološkoj ispravnosti takvih proizvoda, već na svojstvima poput teksture, arome, nježnosti, boje i ukupne hranjive kakvoće nakon odmrzavanja i potom kulinarske obrade (Jay, 1978; Hadžiosmanović, 2005; Sučić i sur., 2010). Takvo meso, ukoliko je udovoljeno i ostalim mikroklimatskim uvjetima, ne gubi značajno na svojim senzorskim niti nutritivnim karakteristikama u odnosu na svježe rashlađeno meso.

Prednosti primjene temperatura ispod točke zamrzavanja su u produženoj pohrani mesa na način zaustavljanja ili sprječavanja mikrobnog rasta i kemijskih promjena (Lawrie i Ledward, 2006).

Upotreba niskih temperatura u očuvanju hrane temelji se na činjenici da se aktivnost mikroorganizama, uzročnika bolesti koji se prenose hranom može usporiti i/ili zaustaviti odnosno posve prestati na temperaturama zamrzavanja. Mikrobn rast se zaustavlja na $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, a potpuna inhibicija staničnog metabolizma u animalnih tkivima događa se na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Perez-Chabela i Mateo-Oyague, 2004). Sve metaboličke reakcije mikroorganizama katalizirane su enzimima, a odnos enzimskih reakcija ovisi o temperaturi. Povišenjem temperature raste i reakcijska stopa, a temperaturni koeficijent (Q_{10}) za većinu bioloških sustava iznosi 1,5 do 2,5. Za svakih $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ porasta temperature unutar prihvatljivog raspona, dvostruko se povećava reakcijska stopa, a za svakih $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ smanjenja temperature vrijedi obrnuto. Temperature zamrzavanja ispod $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ su u normalnim uvjetima dovoljne da se spriječi rast svih mikroorganizama, iako neki mogu rasti i unutar raspona temperatura zamrzavanja, ali prema izrazito polaganoj stopi. Tijekom zamrzavanja oko 60 % mikrobne populacije ugiba, ali preostali mikroorganizmi postepeno rastu tijekom zamrzavanja (Rahman, 1999; cit. Dave i Ghaly, 2011). Na preživljavanje bakterija u zamrznutom mesu utječe i način zamrzavanja, pa bakterije teže podnose postepeni pad temperature (sporo zamrzavanje) od ubrzanog, a oba postupka dovode do oštećenja stanice, blokiranja metabolizma i hladnog šoka pa se mikroorganizmi zamrznu u kristalima leda. Značajan utjecaj na održivost bakterija na temperaturama zamrzavanja ima i raspoloživa voda u supstratu, pa se na temperaturama ispod $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ i nižim zamrzne preko 80 % vode u mesu te bakterije nemaju minimum vode potrebne za život, odnosno potreban aktivitet vode. Aktivitet vode na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ iznosi oko 0,907, na $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ oko 0,864, a na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oko 0,823. To znači da na temperaturama ispod $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ prestaju biološke aktivnosti mikroorganizama u mesu.

Mikroorganizmi koji onečišćuju hranu uključuju one koji rastu u širokom temperaturnom rasponu od -10 do $+80\text{ }^{\circ}\text{C}$, s time da niti jedan ne može preživjeti kroz cijeli raspon, već svaki ima svoj minimalni, optimalni i maksimalni. Kako ne rastu na temperaturama ispod $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, eventualno onečišćenje mesa koje će biti konzervirano zamrzavanjem vezano je uz higijensku kakvoću sirovine i manipulaciju mesom prije zamrzavanja odnosno pri odmrzavanju. U tom kontekstu, mikrobna populacija zamrznutog mesa je identična onoj prije zamrzavanja, s time da treba imati na umu da po nepravilnom odmrzavanju započinje rast preživjelih mikroorganizama pa njihov broj može sustići

inicijalni. Ujedno, procesi razgradnje svježeg ohlađenog mesa vezani su uz prisustvo psihrotrofnih, Gram-negativnih štapićastih bakterija (Mossel, 1982). Psihrofilni mikroorganizmi se nesmetano razmnožavaju do temperature od 0 °C, a na temperaturi od 0 do -8 °C sporo, ali se još uvijek razmnožavaju, poput bakterija rodova *Pseudomonas*, *Micrococcus*, ali i plijesni i kvasaca. Inicijalno, veliki broj mikroorganizama se nalazi na površini svježeg mesa, ali i u njegovoj unutrašnjosti. Oni potječu iz sveprisutnih staništa u tlu, na površini vode, prašini, ali i specifičnih niša i izvora, posebice s neprimjereno čišćenih strojeva i aparata u proizvodnim pogonima. Međutim, jedan dio te pripadajuće mikroflore mesa sudjeluje u onečišćenju u bilo kojim uvjetima pohrane pa i prethodno konzerviranog mesa.

U mikrobiološkoj analizi zamrznutog mesa i mesnih proizvoda može se primijeniti isti postupak kao i za ohlađeno meso. Pretraga ukazuje na to postoji li kontrola temperature zamrzavanja i jesu li pri tome primijenjeni higijenski standardi. Naime, na uobičajenim temperaturama ispod -18 °C mikrobni rast je kako smo već naveli spriječen i dapače, uočava se polagano smanjenje broja nesporulirajućih mikroorganizama koji uključuju i značajne patogene bakterije (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* i dr.). Iako patogeni mogu preživjeti temperaturu zamrzavanja, mnogo češće se pretraga odnosi na mikroorganizme kvarenja (Varnam i Sutherland, 1995). Bakterije se razlikuju prema svojoj sposobnosti preživljavanja tijekom zamrzavanja, pri čemu su koki općenito rezistentniji od Gram-negativnih štapićastih bakterija. *Salmonelle* su manje otporne od bakterije *Staphylococcus aureus* ili vegetativnih oblika klostridija, a ne smijemo zanemariti da endotoksini pojedinih bakterijskih vrsta ostaju neoštećeni na niskim temperaturama. Tijekom zamrzavanja može se očekivati umiranje pojedinih mikroorganizama, jednako tako i tijekom pohrane. To je najvećim dijelom posljedica smanjenja aktiviteta vode (a_w), a učinci su najzapaženiji na niskim temperaturama zamrzavanja. Međutim, sa stajališta konzerviranja hrane, zamrzavanje i pohrana u zamrznutom stanju ne mogu se sagledavati kao postupak koji se koristi u smislu smanjenja broja unesenih patogena ili uništavanja patogena koji se prenose hranom (Gracey, 1999).

Svinjetina je meso koje se u svijetu najčešće konzumira (Delgado i sur., 2001). Iako je svinjetina manje povezana s bolestima koje se prenose hranom, značajna je njezina konzumacija kroz mnoštvo različitih mesnih proizvoda. Veoma su važna saznanja o prevalenciji patogenih bakterija koje se mogu utvrditi u različitim fazama proizvodnje, prodaje i pripreme svinjetine, od farme do maloprodajnih lanaca i kućanstava. Većina bakterijskih vrsta može biti zastupljena u velikom broju na farmi, pa će predstavljati potencijalnu opasnost za kontaminaciju tijekom klaoničke obrade svinja. Naravno, broj patogenih bakterija (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *S. aureus*) može biti smanjen primjenom strategija dobre proizvodne prakse na farmi, DHP u klaoničkim objektima i primjenom adekvatnih tehnoloških postupaka proizvodnje (Arica i sur., 2013). Najveći izazov predstavlja *L. monocytogenes* kao daljnji kontaminant proizvodnog okoliša pa zahtijeva primjerenu intervenciju i kada je u pitanju svinjetina, ali i okoliš procesnih pogona. U mnogim studijama je *L. monocytogenes* utvrđena u svježem, a potom i u zamrznutom mesu svinja na razini od 20%, dok je u

drugim vrstama mesa 16% uzoraka sadržavalo bakterije roda *Listeria*. Njezin je nalaz češći u mesnim proizvodima, što se može povezati s činjenicom da je to ubikvitarna bakterija koja naknadnom kontaminacijom onečišćuje matriks (Mataragas i sur., 2008). Iako je prevalencija bakterije često visoka u svježoj svinjetini, toplinska obrada je uništava, a jednako tako i različite tehnologije konzerviranja mesa. Pri tome ne treba zaboraviti niti zakonske odredbe koje imaju jak utjecaj na praćenje pojavnosti bakterije i kidanje lanca njezinog prijenosa na hranu (Wong i sur., 2005).

U tablici 1. prikazani su najčešći patogeni uzročnici otrovanja hranom, podrijetlom iz ohlađenog ili zamrznutog mesa, pileline i njihovih proizvoda (Fernandes, 2009).

Tablica 1: Uzročnici trovanja hranom podrijetlom iz ohlađenog ili smrznutog mesa, pileline i njihovih proizvoda (Fernandes, 2009)

Mikroorganizam	Bojanje po Gramu i morfologija stanice	Potrebe za kisikom	Temperaturni zahtjevi	Vrsta trovanja hranom
<i>Aeromonas hydrophilla</i>	G- štapić	Fakultativno ananeroban	Psihotrofni	Infekcija
<i>Bacillus cereus</i>	G+ sporulirajući štapić	Fakultativno ananeroban	Mezofilni	Intoksikacija
<i>Campylobacter spp.</i>	G- spiralni štapić	Mikroaerofilan	Mezofilni	Infekcija
<i>Clostridium botulinum</i>	G+ sporulirajući štapić	Anaeroban	Mezofilni	Intoksikacija
<i>Clostridium perfringens</i>	G+ sporulirajući štapić	Anaeroban	Mezofilni	Intoksikacija
<i>Escherichia coli</i>	G- štapić	Fakultativno ananeroban	Mezofilni	Infekcija
<i>Listeria monocytogenes</i>	G+ štapić	Fakultativno ananeroban	Psihotrofni	Infekcija
<i>Salmonella spp.</i>	G- štapić	Fakultativno ananeroban	Mezofilni	Infekcija
<i>Staphylococcus aureus</i>	G+ koki	Fakultativno ananeroban	Mezofilni	Intoksikacija
<i>Yersinia enterocolitica</i>	G- štapić	Fakultativno ananeroban	Psihotrofni	Infekcija

Mikrobni rast ovisi o postupcima sa životinjom prije klaoničke obrade, o starosti životinje, vremenu i tijeku klaoničke obrade, postupanju sa životinjom tijekom klanja, osobito o evisceraciji, i daljnjim proizvodnim procesima, pa zatim kontroli temperature tijekom klanja, proizvodnje i distribucije, metodi konzerviranja, načinu pakiranja i pohrani kod konzumenta (Dave i Ghaly, 2011).

Perez-Chabela i Mateo-Oyague (2004) izvijestili su o patogenim mikroorganizmima koji su često izolirani iz odmrznutog mesa. Ukoliko se referiramo na tvrdnju da je mikroflora zamrznutog, a potom odmrznutog mesa jednaka mikroflori svježeg mesa, tada svakako rješenje treba potražiti u dobroj higijenskoj praksi u svim fazama proizvodnje mesa, od farme do pohrane mesa kod konzumenta.

Greer i Murray (1991) utvrdili su da je lag faza bakterijskog rasta u zamrznutoj, a potom i u odmrznutoj svinjetini bila kraća nego u svježem mesu, ali je vrijeme potrebno da se razvije promjena mirisa i kvarenje mesa ostalo isto. Iako nedostaje podataka o mikrobiološkoj slici zamrznutog mesa, svi upućuju na to da je mikrobiološka održivost svježeg mesa jednaka onoj u odmrznutom mesu. Održivost i razvoj bakterija nakon odmrzavanja mesa ovisi o broju i vrstama koje su preživjele i o načini odmrzavanja. Bakterije koje su zamrzavanjem mesa zbog reverzibilnih oštećenja postale inaktivne, imaju povećane zahtjeve za hranjivim tvarima kako bi nastavile svoju aktivnost.

Rast i metabolička aktivnost mikroorganizama ovisi o dostupnoj vodi (Karolyi, 2004). Redukcija u odnosu na optimalni aktivitet vode (a_w) rasta mikroorganizama dovodi do smanjenja faze eksponencijalnog rasta mikroorganizama te na koncu smanjenog broja mikrobnih stanica. Različiti mikroorganizmi imaju različite potrebe minimalnih vrijednosti a_w za svoj rast. Plijesni su općenito najtolerantnije prema niskim a_w vrijednostima, dok su bakterije najosjetljivije. Aktivitet vode u mesu predstavlja dio slobodne vode za potrebe metabolizma mikroorganizama, a jedan je od ključnih čimbenika održivosti mesa i proizvoda. Pomoću a_w može se kontrolirati rast i razvoj mikroorganizama odnosno kontrolirati kvarenje mesa i proizvoda. Kontrola putem smanjivanja količine dostupne vode u mesu može se postići zamrzavanjem ili postupcima soljenja i sušenja (Karolyi, 2004). Aktivitet vode u svježem mesu iznosi do 0,99, a zamrzavanjem se postupno smanjuje u skladu s formiranjem leda (Gill, 2002).

Minimalne a_w vrijednosti za rast nekih skupina mikroorganizama su za gram-negativne bakterije 0,97, gram-pozitivne bakterije 0,90, većina kvasaca i plijesni raste pri a_w 0,88, halofilne bakterije pri 0,75, a osmofilni kvasci pri a_w 0,6.

METODE

U ovoj studiji obuhvaćene su tri kategorije svinjskog mesa: but, kare (leđa, *m. longissimus dorsi*) i hamburger slanina (trbušno-rebarni dio, potrbušina, carsko meso). Za potrebe studije uzelo se po 20 uzoraka mesa od svake spomenute kategorije, odnosno anatomske lokacije trupa svinja. Uzorci su uzimani nasumičnim odabirom iz 20 trupova odnosno njihovih polovica. Uzorkovanje je obavljeno u lipnju 2012. godine. Svinje su bile komercijalni hibridi (ženke i kastrirani mužjaci u omjeru 50:50 %), utovljeni na obiteljskim farmama s područja Istočne Hrvatske do tjelesne mase žive životinje 110-120 kg. Klaonička obrada napravljena je u objektu „Klaonica Ravlić“, odobrenom za klaoničku obradu papkara.

Svaka kategorija mesa razdijelila se na šest uzoraka. Tako su leđa (20 komada) – bez kože i s kostima podijeljena na šest uzoraka: prvi uzorak se analizirao odmah nakon obrade, a pet uzoraka, za ostale pretrage, se zamrznuo i pohranilo na temperaturi ne višoj od -18°C. Pohranjeni zamrznuti uzorci analizirali su se nakon tri, šest, dvanaest, petnaest i osamnaest mjeseci. Od buta (20 komada) bez kože i kostiju, uzeo se najveći crveni mišić (ili grupa crvenih mišića prema shematskim prikazima za but), te cijela slanina („hamburger“, 20 komada) bez kostiju s kožom. But i slanina podijelili su se na šest dijelova i pohranili kako je opisano za leđa.

Uzorak od svake kategorije mesa analiziran je na slijedeće fizikalne, kemijske i mikrobiološke parametre:

1. Fizikalne - boja mesa, otpuštanje mesnog soka, EZ DripLoss, kapacitet zadržavanja vode, nježnost/tekstura mesa
2. Kemijske - aktivnost vode, udio sirovih bjelancevina, udio sirovih masti, udio vode, peroksidni broj, TBA, masne kiseline, pH 24/48

3. Mikrobiološke: *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, sulfitreducirajuće klostridije, *Enterobacteriaceae*, ukupni broj psihrofilnih bakterija, ukupni broj aerobnih mezofilnih bakterija i *Pseudomonas* spp..

Boja mesa se objektivno određivala na ohlađenom odsječku *m. longissimus dorsi* i *m. semimembranosus* uporabom Minolta CR-300 kolorimetra (Minolta Camera Co. Ltd., Osaka Japan) kalibriranim na bijelu pločicu ($L^*=93,30$; $a^*=0,32$ i $1,8$; $b^*=0,33$). Vrijednosti boje izražavaju se kao CIE- $L^* a^* b^*$ (Commission Internationale de l'Eclairage, 1976.).

Otpuštanje mesnog soka odredilo se „metodom vrećice“ prema Honikel (1987): odresci *m. longissimus dorsi* su bili pohranjeni u hladnjaku (4°C) kako bi se tijekom slijedećih 48 h ocijedio mesni sok. Otpuštanje mesnog soka izračunali smo pomoću slijedeće jednadžbe:

$$\text{Otpuštanje mesnog soka (\%)} = \frac{\text{masa prije hlađenja (g)} - \text{masa nakon hlađenja (g)}}{\text{masa prije hlađenja (g)}} \times 100$$

EZ-DripLoss (Rasmussen i Andersson, 1996) proveo se na način da su se iz odsječka *m. longissimus dorsi* izvadila tri uzorka i potom stavila u prethodno izvagane posebne lijevke te pohranila slijedeća 24h/48h. Nakon toga se ponovo vagao lijevak sa uzorkom i lijevak s eksudatom te se jednadžbom istovjetnom za „metodu vrećice“ izračunao postotak otpuštenog mesnog soka.

Kapacitet zadržavanja vode (Grau i Hamm, 1953) određen je tako da se uzorak mišićnog tkiva komprimirao na filtar papiru pomoću kompresijskih stakala za trihineloskopiju, a vrijednost za sposobnost zadržavanja vode (izražena u cm²) dobila se utvrđivanjem površine ovlažene istisnutim sokom pomoću planimetra.

Utvrđivanje nježnosti/teksture mesa iz *m. longissimus dorsi* svakog trupa, provelo se tako da se uzorak zamrznuo na temperaturu od -20 °C. Nakon otapanja, kuhanja i hlađenja iz svakog ohlađenog uzorka se uporabom Warner-Bratzler noža pričvršćenog na TA.XTplus uređaj odredila maksimalna snaga potrebna za presijecanje uzoraka (WBSF,N).

Udio sirovih bjelancevina odredio se metodom po Kjeldahl-u (HRN ISO 937:1999) uz uporabu bloka za razaranje (Unit 8 Basic, Foss) i neutralizatora para te automatiziranog uređaja za destilaciju i titraciju (Kjeltec 8400, Foss).

Sirove masti odredile su se metodom po Soxhlet-u (HRN ISO 1443:1999) uz ekstrakciju masti eterom na uređaju za ekstrakciju (Soxtherm 2000, Gerhardt).

Udio vode određen je gravimetrijski (ISO 1442:1997) uz uporabu termostata (Epsa 2000, Ba-Ri) i sušenje pri 103 °C.

Peroksidni broj se odredio prvotnom ekstrakcijom masti eterom, na uređaju za ekstrakciju (Soxtherm 2000, Gerhardt), te daljnjom titracijom s Na-tiosulfatom. Navedena metoda je interna validirana metoda te se koristi u radu ovlaštenog laboratorija.

pH vrijednosti su se odredile 45 minuta i 24 sata (pH 24/48) post mortem ubodom mjerne sonde. Mjerenje pH se vršilo prijenosnim uređajem “Mettler MP 120-B”.

Određivanje stupnja oksidacije masti (TBA test)

Za detekciju oksidacije nezasićenih masnih kiselina i masti koristio se test tiobarbiturne kiseline (TBA test), koji ovisi o razvoju crvenog pigmenta koji nastaje reakcijom TBA s MDA. Koncentracija MDA određena je metodom po Lemon i sur. (1975). 20 g uzorka homogeniziralo se sa 7,5%-tnom otopinom trikloroctene kiseline (TCA), ostavio se da stoji 30 min na sobnoj temperaturi te profiltrirao. Uzelo se 5 mL filtrata i dodalo 5 mL 0,02 M otopine TBA (za slijepu probu umjesto filtrata stavi se destilirana voda) i stavilo se 40 min u vodenu kupelj na 100 °C i nakon toga ohladilo pod mlazom hladne vode. Nakon toga se na spektrofotometru (Helios β, Spectronic Unicam, Cambridge, UK) očitala apsorbancija (538 nm). Koncentracija MDA u uzorcima izračunata je pomoću kalibracijske krivulje. Rezultati su izraženi kao mg MDA/kg mesa.

Određivanje sastava masnih kiselina

Priprema metilnih estera masnih kiselina

Mast dobivena ekstrakcijom korištena je za određivanje sastava masnih kiselina. Esterski vezane masne kiseline prevedene su u metilne estere masnih kiselina koji se pogodni za analizu plinskom kromatografijom (HRN EN ISO 5509, 2004). Odvagnulo se oko 60 mg ± 10 mg uzorka u staklenu epruvetu te se dodalo 4 mL izooktana. Nakon što se uzorak potpuno otopio, dodalo se 200 µL metanolne otopine kalij hidroksida (13,6 g KOH u 100 mL metanola) i snažno protreslo dva puta po 30 sekundi. Za neutralizaciju otopini se dodao 1 g natrij hidrogensulfat monohidrata i otopina se protresla dva puta po 30 sekundi. Kada su se kristali slegli prenijelo se 500 µL dobivene otopine uzorka u posudicu za injektiranje, dodalo se 1 mL izooktana te se posudica zatvorila i promućkala.

Sastav masnih kiselina je određivan metodom plinske kromatografije (HRN EN ISO 5508, 1999) uređajem CP-3800 (Varian, Palo Alto, CA, SAD). Za injektiranje je korišten TriPlus autosampler (Thermo Scientific, Augustin, TX, SAD). Temperatura injektora s mogućnošću djelomičnog unošenja uzorka je bila 250 °C, a volumen injektiranja 1 µL uz omjer razdjeljenja 1:30. Uzorci su analizirani na kapilarnoj koloni DB-23 duljine 60 m, unutrašnjeg promjera kapilare 0,25 mm i debljine sloja selektivne tekućine 0,25 µm (Agilent, Walnut Creek, CA, SAD), a temperaturni program kolone je bio: početna temperatura kolone 60 °C, brzina porasta temperature 7 °C/min do konačne temperature kolone 220 °C, koja je zadržana 15 min. Plin nosilac je bio helij uz protok od 1,5 mL/min. Temperatura plameno-ionizacijskog detektora je bila 260 °C. Za obradu podataka je korišten računalni program Star GC Workstation Ver. 6.4 (Varian, Palo Alto, CA, SAD). Detaljniji opis metode i njene prikladnosti za analizu prikazan je u radu Petrović i suradnici (2010).

Aktivitet vode određivao se na uređaju HygroPalm AW1, Rotronic.

Mikrobiološke pretrage obavile su se u skladu s HRN EN/ISO metodama uobičajenim za pojedine bakterijske vrste, kako su navedene:

HRN EN ISO 6887-1: Mikrobiologija hrane i stočne hrane – Priprema ispitnih uzoraka, osnovnog i ostalih decimalnih razrjeđenja za mikrobiološku pretragu - Opća pravila za pripremu osnovnog i ostalih decimalnih razrjeđenja.

HRN ISO 7218:2007, Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Opći zahtjevi i upute za mikrobiološka ispitivanja.

HRN EN ISO 11290-1/A1:2008 Mikrobiologija hrane i stočne hrane - Horizontalna metoda za dokazivanje i određivanje broja stanica *Listeria monocytogenes* – 1.dio: Metoda dokazivanja (ISO 11290-1:1996; EN ISO 11290-1:1996).

HRN ISO 4833: 2003 Mikrobiologija hrane i stočne hrane- Horizontalna metoda za brojenje mikroorganizama – Tehnika brojenja kolonija na 30 °C (ISO 4833:2003).

HRN ISO 6888-1:2004 Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Vodoravni postupak brojenja koagulaza-pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) -- 1. dio: Postupak primjene Baird-Parkrove hranjive podloge na agaru (ISO 6888-1:1999+Amd 1:2003; EN ISO 6888-1:1999+A1:2003)

HRN ISO 8523:1999 Mikrobiologija -- Opće upute za dokazivanje *Enterobacteriaceae* postupkom predobogaćivanja (ISO 8523:1991).

HRN ISO 17410:2001 Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Metoda brojenja psihrotrofnih mikroorganizama (ISO 17410:2001).

HRN ISO 13720:1999 Meso i mesni proizvodi -- Brojenje *Pseudomonas* spp. (ISO 13720:1995).

HRN EN ISO 6579:2003/Ispr.1:2008 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti *Salmonella* spp.

HRN ISO 15213:2004 Mikrobiologija hrane i stočne hrane – Horizontalna metoda za brojenje sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima, prvo izdanje, rujan 2004.

Statistička obrada podataka provedena je korištenjem programa *Statistica Ver. 10.0 software* (StatSoft Inc. 1984-2011, USA). Napravljena je analiza varijance (ANOVA) korištenjem procedura General Linear Models (GLM) i *post hoc* test. Statistički značajne razlike izražavane su na razini vjerojatnosti od 95% ($P=0,05$) i 99% ($P=0,01$).

REZULTATI

Fizikalna svojstva zamrznutog mesa

Tablica 2 prikazuje srednje vrijednosti te standardne devijacije mjerenih svojstava kakvoće mesa po mjesecima pohrane za uzorke uzete iz butova, a tablica 3 za uzorke uzete iz leđnog mišića. Iz tih tablica (2 i 3) također se vidi značajnost razlika između uzoraka odmrzavanih nakon tri, šest, dvanaest, petnaest i osamnaest mjeseci pohrane u zamrzivaču na temperaturi od -18 °C.

Tablica 2 Srednje vrijednosti i standardne devijacije (u zagradi) svojstava kakvoće svinjskog mesa mjerenih na istraživanim uzorcima buta u odnosu na razdoblje zamrzavanja

Mjereno svojstvo	Trajanje pohrane u zamrzivaču					
	0 (n=20)	3 (n=19)	6 (n=20)	12 (n=20)	15 (n=20)	18 (n=20)
Kalo odmrzavanja (%)	-	9,44 ^c (2,11)	9,64 ^c (2,64)	12,63 ^b (3,51)	16,92 ^a (6,83)	13,05 ^b (3,04)
EZ – otpuštanje vode (%)	3,64 ^{ab} (1,20)	2,14 ^b (0,78)	5,42 ^a (2,47)	2,94 ^b (1,60)	3,18 ^b (2,61)	4,64 ^a (2,41)
Zbroj kala odmrzavanja i EZ-otpuštanja vode	-	11,58 ^c (2,50)	15,06 ^b (3,86)	15,57 ^b (3,42)	20,10 ^a (7,36)	17,69 ^{ab} (3,20)
Sposobnost zadržavanja vode (cm ²)	8,76 ^b (1,36)	6,96 ^c (1,05)	8,56 ^b (1,00)	10,84 ^a (1,81)	8,89 ^b (2,06)	9,46 ^{ab} (1,68)
pH vrijednost	5,51 ^b (0,08)	5,57 ^{ab} (0,14)	5,64 ^a (0,13)	5,65 ^a (0,09)	5,60 ^{ab} (0,07)	5,62 ^a (0,07)
CIE-L*	42,20 ^b (5,52)	47,76 ^a (4,70)	47,84 ^a (4,28)	48,77 ^a (4,96)	50,31 ^a (4,78)	48,70 ^a (5,25)
CIE-a*	15,61 ^a (2,33)	11,14 ^b (2,77)	13,14 ^b (2,84)	12,53 ^b (2,38)	11,00 ^b (2,49)	11,87 ^b (3,01)
CIE-b*	4,27 ^b (1,57)	6,01 ^a (2,22)	6,00 ^a (1,32)	6,13 ^a (2,29)	6,28 ^a (2,46)	5,69 ^a (2,43)
Warner-Bratzler (N)	34,05 (7,01)	34,45 (9,26)	42,27 (14,18)	43,55 (11,32)	40,94 (12,07)	39,85 (13,47)

a,b,c=P<0,05

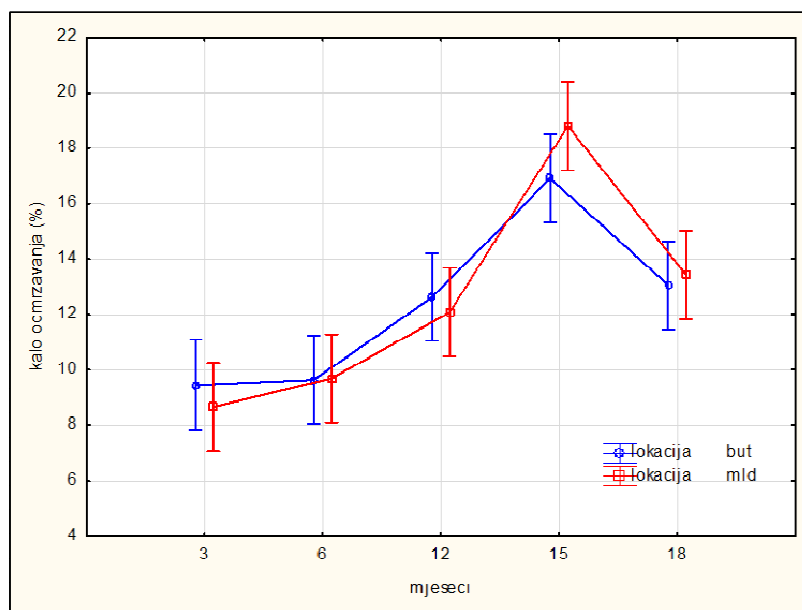
Tablica 3 Srednje vrijednosti i standardne devijacije (u zagradi) svojstava kakvoće svinjskog mesa mjerenih na istraživanim uzorcima leđnog mišića u odnosu na razdoblje zamrzavanja

Mjereno svojstvo	Trajanje pohrane u zamrzivaču					
	0 (n=20)	3 (n=19)	6 (n=20)	12 (n=20)	15 (n=20)	18 (n=20)
Kalo odmrzavanja (%)	-	8,67 ^c (1,90)	9,69 ^c (2,71)	12,08 ^b (1,90)	18,81 ^a (5,16)	13,43 ^b (2,93)
EZ – otpuštanje vode (%)	6,53 ^a (3,04)	5,00 ^{ab} (2,79)	6,98 ^a (2,95)	3,59 ^{bcd} (1,91)	1,75 ^d (1,03)	5,75 ^{abc} (2,18)
Zbroj kala odmrzavanja i EZ-otpuštanja vode	-	13,67 ^c (3,40)	16,67 ^b (3,68)	15,67 ^{bc} (2,88)	20,56 ^a (4,92)	19,18 ^a (4,31)
Sposobnost zadržavanja vode (cm ²)	12,14 ^a (1,29)	7,73 ^{bc} (1,76)	9,53 ^b (1,60)	8,47 ^b (1,79)	6,81 ^c (1,79)	9,23 ^b (1,34)
pH vrijednost	5,48 ^{cb} (0,05)	5,45 ^c (0,05)	5,50 ^b (0,05)	5,55 ^a (0,06)	5,56 ^a (0,06)	5,51 ^b (0,07)
CIE-L*	52,67 ^b (2,89)	55,86 ^a (2,94)	48,03 ^c (3,65)	56,18 ^c (3,23)	56,85 ^a (3,25)	56,54 ^a (3,53)
CIE-a*	6,58 ^b (0,85)	7,56 ^{ab} (1,50)	8,47 ^a (1,71)	7,98 ^{ab} (1,52)	7,95 ^{ab} (2,18)	7,74 ^{ab} (1,98)
CIE-b*	2,69 ^c (0,77)	6,00 ^a (1,74)	4,00 ^{bc} (1,80)	5,64 ^{cb} (2,07)	5,86 ^a (3,01)	5,15 ^{ab} (1,52)
Warner-Bratzler (N)	53,63 ^a (5,86)	41,04 ^b (5,40)	37,44 ^b (6,35)	39,50 ^b (5,04)	36,78 ^b (6,07)	38,91 ^b (8,89)

a, b, c, d = P < 0,05

Dinamika promjena istraživanih svojstava mesa svinjskih butova i leđa tijekom pohrane u zamrzivaču prikazana je slikama 1 – 8.

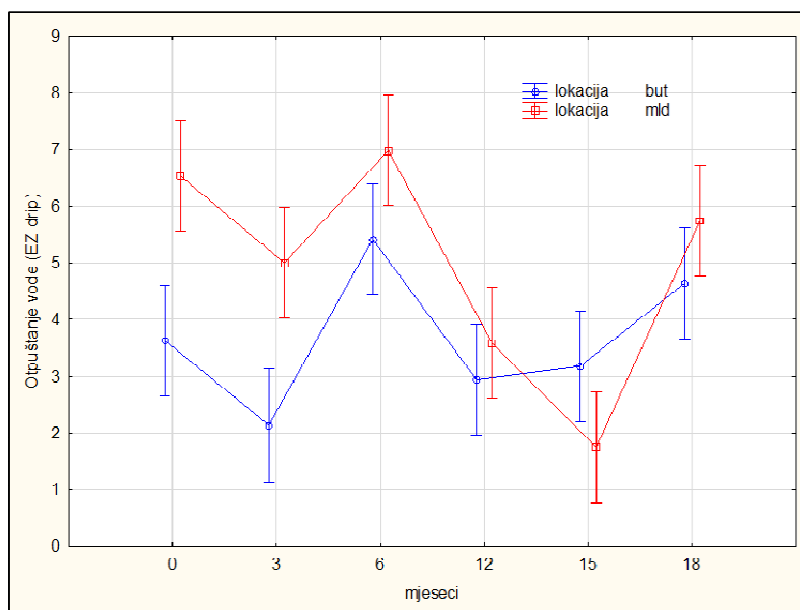
Na slici 1 vidi se tijek promjene u kalu odmrzavanja uzoraka buta i leđnog mišića tijekom istraživanog razdoblja. Može se uočiti sličan trend za obje anatomske lokacije iz kojih su se uzimali uzorci mesa. Najniži kalo odmrzavanja uzorci su imali na početku istraživanog razdoblja, nakon tri mjeseca pohrane u zamrzivaču. Trend povećavanja kala odmrzavanja trajao je do petnaestog mjeseca, kada dostiže vrijednosti od 18,81% u leđnom mišiću i 16,92% u butu, a nakon toga stagnira do 13,43% u leđnom mišiću i 13,05% u butu, koliko je izmjereno nakon osamnaest mjeseci zamrzavanja.



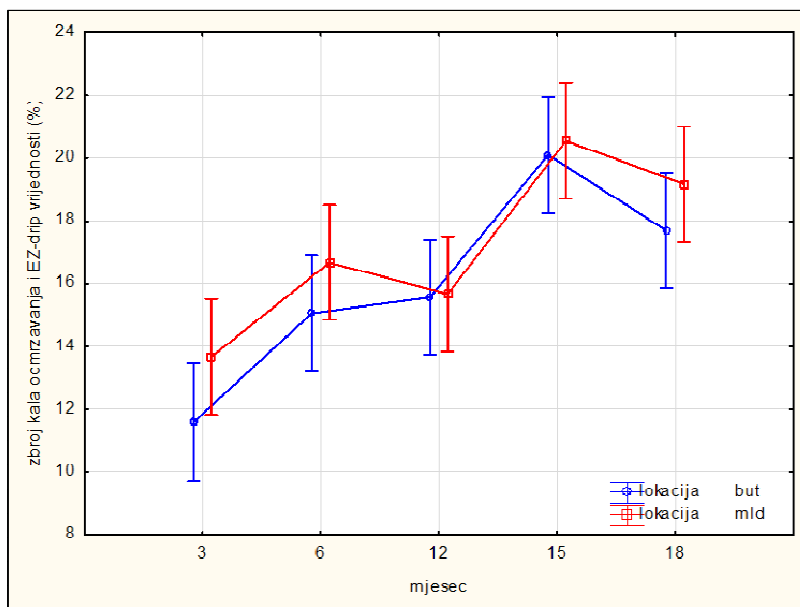
Slika 1 Promjene kala odmrzavanja uzoraka svinjskog mesa buta i leđa tijekom pokusnog razdoblja

Slika 2 prikazuje promjene u otpuštanju vode u uzorcima svinjskog mesa buta i leđnog mišića tijekom pokusnog razdoblja. Na ovoj slici može se vidjeti da je nakon tri mjeseca pohrane u zamrzivaču otpuštanje vode u uzorcima mesa buta i leđnog mišića pokazalo značajan pad u odnosu na nezamrznuto meso, nakon čega slijedi značajno povećanje ovih vrijednosti (nakon šest mjeseci zamrzavanja), a u idućim mjesecima ponovo se uočava postupno smanjenje vrijednosti otpuštanja vode. Pri tome valja imati na umu da je na ovo svojstvo sigurno utjecalo kalo odmrzavanja. To je naročito uočljivo kada se u tablici 1 i 2 promatraju vrijednosti kala odmrzavanja i vrijednosti otpuštanja vode nakon dvanaest i petnaest mjeseci zamrzavanja, gdje se vidi da vrlo niskim vrijednostima postotnog otpuštanja vode (2,94% odnosno 3,18% za but i 3,59% odnosno 1,75% za leđni mišić) prethode visoke vrijednosti kala odmrzavanja (12,63% odnosno 16,92% u butu i 12,08% odnosno 18,81% u leđnom mišiću).

Zbog toga je na slici 3 prikazana ukupna otpuštena voda izražena kao zbroj kala odmrzavanja i postotka otpuštene vode mjerene metodom EZ-drip. Na toj se slici vidi da je trend povećanja udjela otpuštene vode iz mesa proporcionalan s produženjem dužine trajanja pohrane u zamrzivaču.



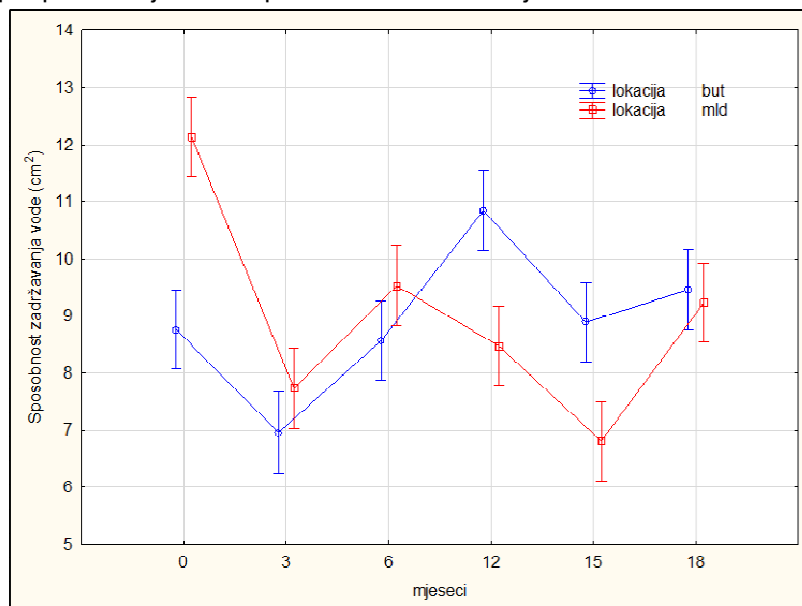
Slika 2 Promjene vrijednosti otpuštanja vode (%) uzoraka svinjskog mesa buta i leđa tijekom pokusnog razdoblja zamrzavanja



Slika 3 Promjene zbroja kala odmrzavanja i EZ vrijednosti otpuštanja vode iz uzoraka svinjskog mesa buta i leđa tijekom pokusnog razdoblja

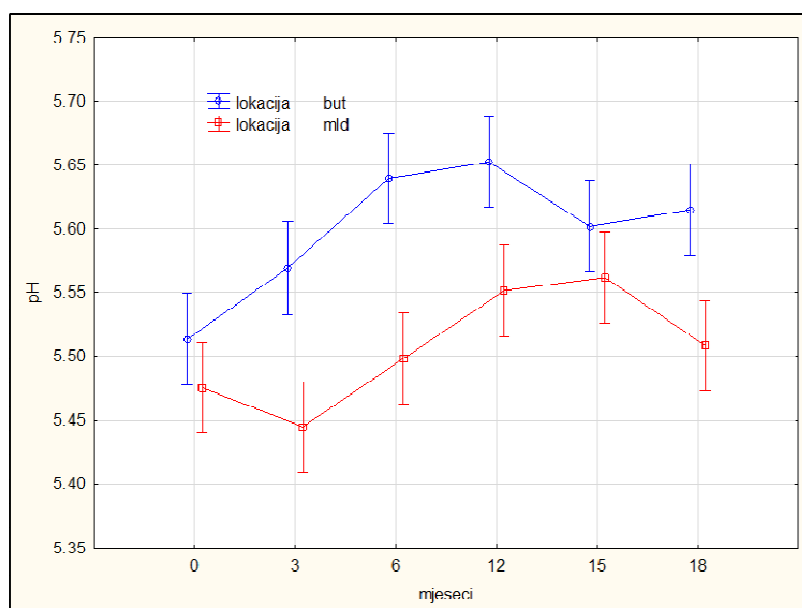
Kretanje vrijednosti izmjerenih za sposobnost vezanja vode metodom kompresije (Comberg) prikazano je na slici 4. Najviše vrijednosti zabilježene su za svježe meso, a nakon tri mjeseca zamrzavanja slijedi nagli pad te nakon toga u butu slijedi trend porasta do dvanaestog mjeseca i manji pad u petnaestom i osamnaestom mjesecu istraživanja. U slučaju leđnog mišića nakon trećeg mjeseca pohrane slijedi porast do šestog mjeseca, nakon čega slijedi pad do petnaestog mjeseca te u osamnaestom opet porast vrijednosti sposobnosti zadržavanja vode u mesu.

osamnaestom opet porast vrijednosti sposobnosti zadržavanja vode u mesu.



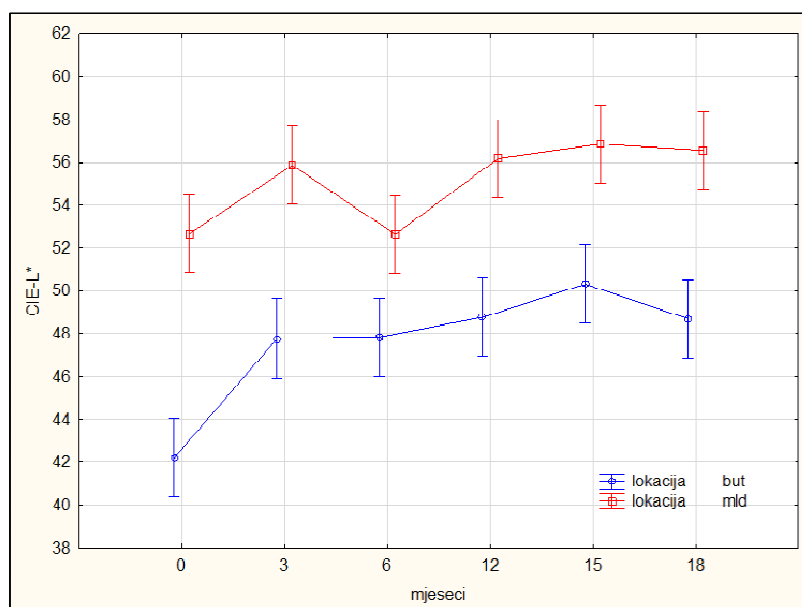
Slika 4 Promjene vrijednosti sposobnosti zadržavanja vode uzoraka svinjskog mesa buta i leđa tijekom pokusnog razdoblja zamrzavanja

Promjene pH vrijednosti izmjerenih u butu i leđnom mišiću tijekom istraživanog razdoblja prikazane su na slici 5. Iako se u tablici 2 i 3 mogu uočiti značajne razlike između pH vrijednosti tijekom razdoblja pohrane u zamrzivaču, one nisu od praktične važnosti jer se nalaze u rasponu uobičajenih pH vrijednosti te ne upućuju na bilo kakve anomalije u kakvoći mesa.



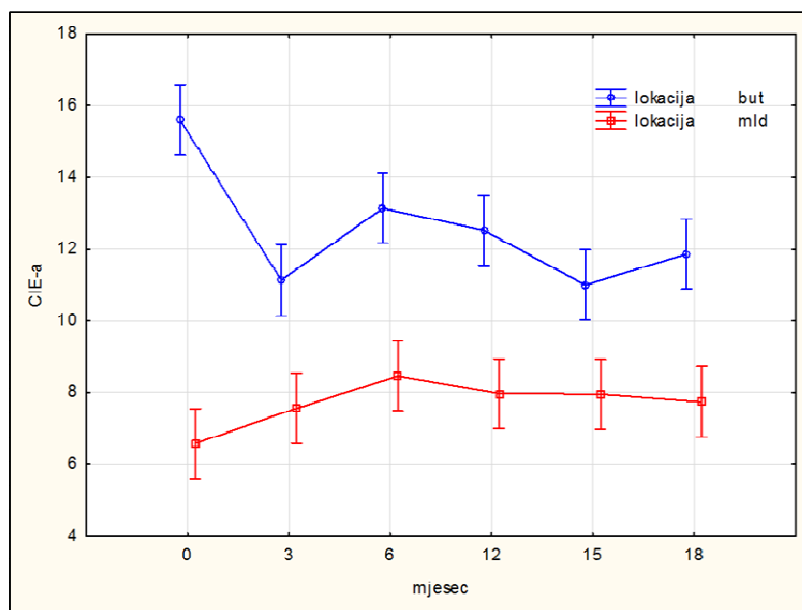
Slika 5 Promjene pH vrijednosti uzoraka svinjskog mesa buta i leđa tijekom pokusnog razdoblja zamrzavanja

Promjene pokazatelja refleksije (bljedoća) izražene kao CIE-L* vrijednosti mjerene Minolta CR-400 kromametrom prikazane su na slici 6. Na uzorcima buta može se uočiti kako meso postupno postaje bljeđe tijekom pohrane u zamrzivaču. Sličan trend pokazuju i uzorci mesa uzeti iz leđnog mišića. Jedino odstupanje od ove tendencije vidi se nakon šestoga mjeseca pohrane, kada su izmjerene vrijednosti CIE-L* parametra pokazale značajan pad. Ovo se vjerojatno dogodilo zbog lokacije poduzorka za mjerenje parametara boje u leđnom mišiću. Naime, zbog velikog broja mjerenih pokazatelja, uzorci su uzimani iz širokog područja na leđnom mišiću pa je moguće da su ove niže vrijednosti bljedoće nastale mjerenjem na području bližem vratnom dijelu koji je uobičajeno tamniji od srednjeg, lumbalnog dijela leđnog mišića u svinja.



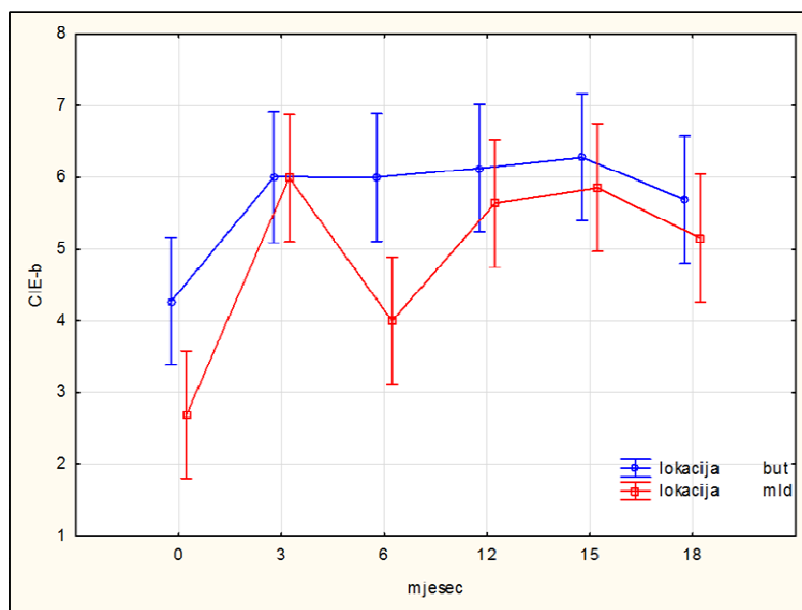
Slika 6 Promjene vrijednosti bljedoće (CIE-L*) uzoraka svinjskog mesa buta i leđa tijekom pokusnog razdoblja zamrzavanja

Na slici 7 može se vidjeti kako se tijekom pohrane u zamrzivaču mijenjao pokazatelj razine crvene boje mesa (CIE-a*). Prirodno, ove vrijednosti su bile uočljivo veće u slučaju uzoraka mišića buta. One su nakon tri mjeseca zamrzavanja pokazale značajan pad nakon čega se više ne mijenjaju statistički značajno. U slučaju uzoraka mesa uzetih iz leđnog mišića vidi se lagani trend povećanja razine crvene boje. U odnosu na svježe meso značajna razlika u ovom svojstvu javlja se nakon šest mjeseci pohrane u zamrzivaču, nakon čega uslijed laganog pada vrijednosti izmjerenih za ovo svojstvo razlike nisu značajne.



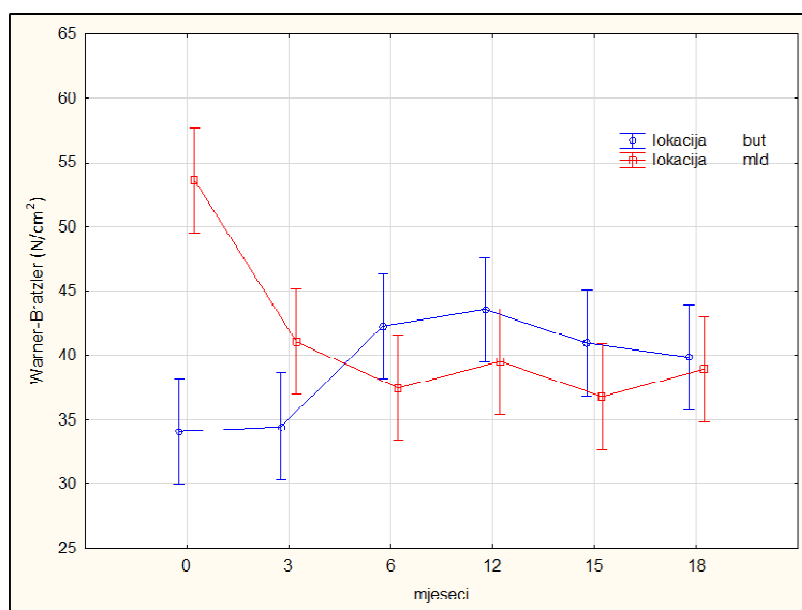
Slika 7 Promjene razine crvene boje (CIE-a*) uzoraka svinjskog mesa buta i leđa tijekom pokusnog razdoblja zamrzavanja

Na slici 8 prikazane su promjene u razinama žute boje uzoraka svinjskog mesa buta i leđa tijekom pohrane u zamrzivaču. U slučaju mesa buta uočava se značajan porast vrijednosti CIE-b* nakon tri mjeseca zamrzavanja, a nakon toga razlike između odmrznutih uzoraka više nisu bile značajne. Za uzorke mesa uzete iz leđnog mišića također se vidi značajan porast u ovim vrijednostima nakon tri mjeseca, nakon čega slijedi značajan pad u šestom mjesecu pohrane, a nakon toga se vidi lagani porast do petnaestog mjeseca dok u osamnaestom mjesecu slijedi lagani, neznačajni pad. U uzorcima leđnog mišića vidljive su veće varijacije u razini žute boje, na što je vjerojatno utjecala varijabilnost u sadržaju intramuskularne masti uzduž samog mišića.



Slika 8 Promjene razine žute boje (CIE-b*) uzoraka svinjskog mesa buta i leđa tijekom pokusnog razdoblja zamrzavanja

Iako se na slici 9, u slučaju buta može primijetiti povećanje otpornosti na presjek, odnosno povećanje tvrdoće mesa, nakon trećeg mjeseca, razlike u tom svojstvu s obzirom na dužinu pohrane mesa u zamrzivaču nisu statistički značajne. S druge strane, u slučaju leđnog mišića vidljivo je značajno omekšavanje mesa nakon tri mjeseca zamrzavanja, nakon čega se te vrijednosti ne razlikuju značajno do kraja istraživanih razdoblja trajanja pohrane zamrznutog mesa.



Slika 9 Promjene otpornosti na presjek (nježnosti) uzoraka svinjskog mesa buta i leđa tijekom pokusnog razdoblja zamrzavanja

Kemijska svojstva zamrznutog mesa

Kemijski sastav zamrznutog svinjskog mesa po mjesecima uzorkovanja tijekom uskladištenja (svježe meso, dvanaest i osamnaest mjeseci) analiziran je određivanjem masenog udjela (%) vode, ukupnih bjelančevina i masti. Utvrđene vrijednosti navedenih parametara po mjesecima uskladištenja zamrznutog mesa te njihove prosječne vrijednosti (svježe meso prije uskladištenja, dvanaest i osamnaest mjeseci uskladištenja) prikazane su u Tablici 4.

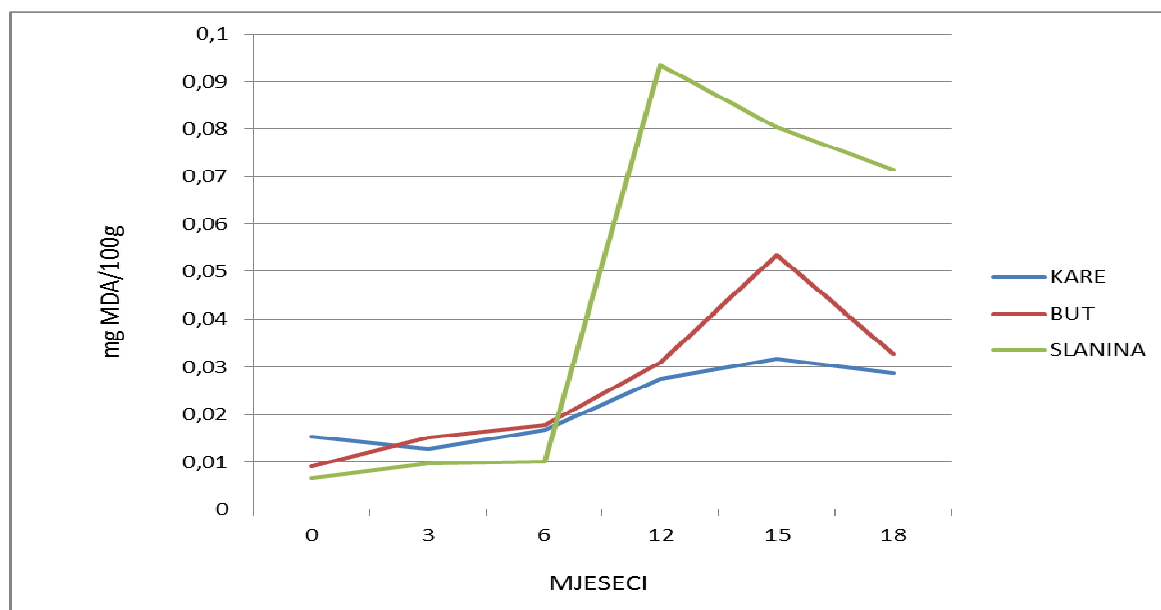
Tablica 4 Srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) parametara osnovnog kemijskog sastava zamrznutog svinjskog mesa tijekom uskladištenja

	Srednja vrijednost \pm SD (%)			
	Svježe meso	12 mjeseci	18 mjeseci	Prosječne vrijednosti
Kare				
Voda	68,16 ^a \pm 2,48	68,14 ^a \pm 1,45	67,43 ^a \pm 2,05	67,91 \pm 1,99
Bjelančevina	23,03 ^a \pm 1,23	24,11 ^a \pm 1,01	23,31 ^a \pm 1,27	23,48 \pm 1,17
Mast	8,08 ^a \pm 3,17	7,17 ^a \pm 2,46	8,24 ^a \pm 2,92	7,83 \pm 2,85
But				
Voda	72,12 ^a \pm 1,98	69,67 ^b \pm 2,73	70,02 ^b \pm 1,44	70,60 \pm 2,05
Bjelančevina	22,08 ^a \pm 0,67	22,94 ^b \pm 0,99	22,83 ^{a,b} \pm 1,03	22,62 \pm 0,90
Mast	4,93 ^a \pm 2,08	6,34 ^a \pm 3,13	6,94 ^a \pm 2,22	6,07 \pm 2,48
Slanina				
Voda	49,03 ^a \pm 3,35	51,86 ^a \pm 3,09	51,19 ^a \pm 4,44	50,69 \pm 3,63
Bjelančevina	15,12 ^a \pm 1,25	15,31 ^a \pm 1,35	15,65 ^a \pm 1,44	15,36 \pm 1,35
Mast	35,08 ^a \pm 3,37	32,23 ^a \pm 4,73	32,70 ^a \pm 5,75	33,34 \pm 4,62

a, b = $P < 0,05$

Usporedbom udjela vode, ukupnih bjelančevina i masti po mjesecima tijekom uskladištenja zamrznutog mesa, nije utvrđena statistički značajna razlika ($P > 0,05$) za uzorke karea, buta i slanine, osim za udio bjelančevina nakon dvanaest mjeseci uskladištenja ($P < 0,05$). Statistički značajna razlika ($P < 0,05$) po mjesecima uskladištenja utvrđena je za udio vode u uzorcima buta nakon dvanaest i osamnaest mjeseci uskladištenja.

Vrijednosti TBA u uzorcima mesa tijekom uskladištenja u zamrznutom stanju prikazane su na slici 10.



Slika 10 Promjena stupnja oksidacije masti tijekom pohrane svinjskog mesa u zamrznutom stanju

Oksidacija masti povećava se vremenom uskladištenja. Vrijednosti se povećavaju za uzorke karea i buta do petnaest mjeseci nakon čega padaju dok su u uzorcima slanina najviše vrijednosti zabilježene nakon dvanaest mjeseci (slika 10). Pad TBA vrijednosti mogao bi se objasniti reakcijom aldehida s drugim prisutnim spojevima pri čemu nastaju produkti koji ne reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom. Drugo moguće objašnjenje je da TBA vrijednosti prolaze kroz nekoliko tipičnih „indukcija-propagacija-terminacija“ ciklusa tvoreći tipična kolebanja u TBA vrijednostima (Barnett i sur., 1991), koja su uočljivija kad se analize provode u kraćim vremenskim periodima, što nije slučaj u predmetnom istraživanju jer je period pohrane bio izuzetno dug.

Završne vrijednosti TBA dobivene u ovom istraživanju nisu prešle prag osjetljivosti (>1.0 mgMA/kg) za nepoželjan užegao miris i okus mesnih proizvoda (Kolsarici i sur., 2010).

U tablici 5 a),b),c) prikazane su srednje TBA vrijednosti i njihove standardne devijacije u kareu, butu i slanini u vremenu kada su analize provedene (svježi, nakon tri, šest, dvanaest, petnaest i osamnaest mjeseci).

Tablica 5 a), b), c) TBA vrijednosti u a) kareu, b) butu i c) slanini u svježem svinjskom mesu i u mesu nakon 3, 6, 12, 15 i 18 mjeseci uskladištenja u zamrznutom stanju

Tablica 5 a)

KARE						
TBA vrijednost (mg MDA / 100 g)						
	svježi	3 mjeseca	6 mjeseci	12 mjeseci	15 mjeseci	18 mjeseci
srednja vrijednost	0,015 ^{ab}	0,013 ^a	0,017 ^{ab}	0,027 ^{ab}	0,032 ^b	0,029 ^{ab}
standardna devijacija	0,006	0,006	0,014	0,013	0,019	0,013

a,b=P<0,05

Tablica 5 b)

BUT						
TBA vrijednost (mg MDA / 100 g)						
	svježi	3 mjeseca	6 mjeseci	12 mjeseci	15 mjeseci	18 mjeseci
srednja vrijednost	0,009 ^a	0,015 ^{ab}	0,018 ^{ab}	0,031 ^b	0,053 ^c	0,033 ^{bc}
standardna devijacija	0,002	0,013	0,009	0,014	0,029	0,014

a,b,c=p<0,05

Tablica 5 c)

SLANINA						
TBA vrijednost (mg MDA / 100 g)						
	svježi	3 mjeseca	6 mjeseci	12 mjeseci	15 mjeseci	18 mjeseci
srednja vrijednost	0,007 ^a	0,010 ^a	0,010 ^a	0,094 ^b	0,080 ^b	0,072 ^b
standardna devijacija	0,003	0,004	0,003	0,031	0,021	0,017

a,b,c=p<0,05

Tablica 6 a), b), c) Vrijednosti peroksidnog broja određene u a) kareu, b) butu i c) slanini u svježem svinjskom mesu i u mesu nakon 3, 6, 12, 15 i 18 mjeseci uskladištenja u zamrznutom stanju

Tablica 6 a)

KARE						
Peroksidni broj (mmol O ₂ /kg)						
	svježi	3 mjeseca	6 mjeseci	12 mjeseci	15 mjeseci	18 mjeseci
srednja vrijednost	0,85 ^a	5,95 ^b	13,72 ^c	9,78 ^d	65,19 ^e	34,60 ^f
standardna devijacija	0,05	1,28	3,78	6,62	18,79	12,68

a,b,c,d,e,f=P<0,05

Tablica 6 b)

BUT						
Peroksidni broj (mmol O ₂ /kg)						
	svježi	3 mjeseca	6 mjeseci	12 mjeseci	15 mjeseci	18 mjeseci
srednja vrijednost	0,81 ^a	2,03 ^b	11,25 ^c	22,26 ^d	91,64 ^e	35,08 ^f
standardna devijacija	0,02	0,92	4,03	8,73	25,67	9,15

a,b,c,d,e,f=P<0,05

Tablica 6 c)

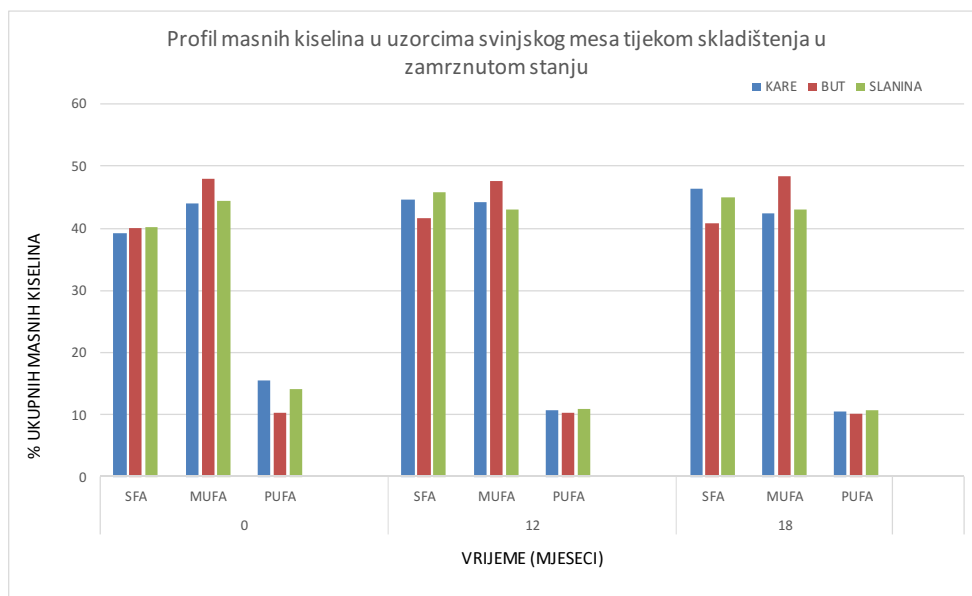
SLANINA						
Peroksidni broj (mmol O ₂ /kg)						
	svježi	3 mjeseca	6 mjeseci	12 mjeseci	15 mjeseci	18 mjeseci
srednja vrijednost	1,00 ^a	2,15 ^b	3,04 ^c	8,68 ^d	18,09 ^e	13,43 ^f
standardna devijacija	0,09	0,48	0,41	2,51	2,45	2,29

a,b,c,d,e,f=P<0,05

Statističkom obradom podataka, uspoređujući dobivene vrijednosti peroksidnog broja po svim mjesecima tijekom uskladištenja (tablica 6 a),b),c)), određena je statistički značajna razlika ($P<0,05$) za sve tri kategorije svinjskog mesa i za sve mjesece uskladištenja.

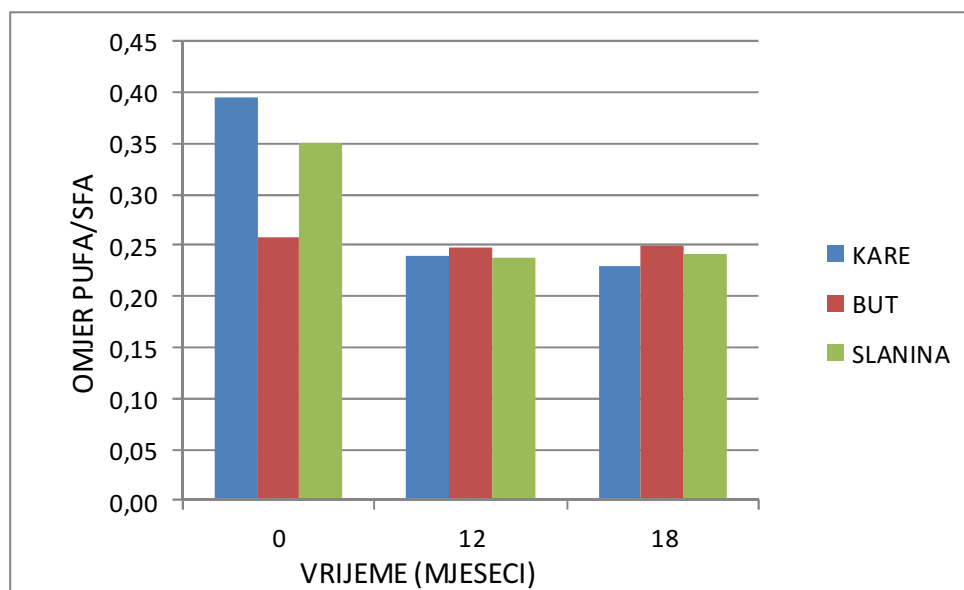
Zastupljenost pojedinih masnih kiselina

Palmitinska i stearinska kiselina su najzastupljenije zasićene masne kiseline dok je oleinska kiselina najzastupljenija jednostruko nezasićena masna kiselina u uzorcima karea, buta i slanine. Zastupljenost pojedinih masnih kiselina u uzorcima karea, buta i slanine, te promjena kroz vrijeme pohrane, prikazana je u tablicama 11, 12 i 13 u dodatku 1. Znanstvene studije.



Slika 11 Prikaz udjela masnih kiselina u kareu butu i slanini u svježem svinjskom mesu, te nakon 12 i 18 mjeseci uskladištenja u zamrznutom stanju

SFA- zasićene masne kiseline, MUFA – jednostruko nezasićene masne kiseline, PUFA – višestruko nezasićene masne kiseline



Slika 12 Prikaz omjera PUFA i SFA za kare, but i slaninu u svježem svinjskom mesu, te nakon 12 i 18 mjeseci uskladištenja u zamrznutom stanju

SFA- zasićene masne kiseline, PUFA – višestruko nezasićene masne kiseline

Mikrobiološka svojstva zamrznutog mesa

Svježi i zamrznuti uzorci svinjetine pretraživani su na pojedine bakterijske vrste te ukupni broj bakterija u određenim vremenskim razmacima (tri, šest, dvanaest, petnaest i osamnaest mjeseci) nakon zamrzavanja. Rezultati mikrobiološke pretrage uzoraka u pokusu prikazani su u tablicama 7, 8, 9 i 10, te slikama od 13 do 17.

U tablici 7, 8 i 9 prikazani su rezultati mikrobiološke pretrage svježih (0 mj) i zamrznutih uzoraka karea, buta i slanine, te vrijednosti aktiviteta vode u ispitivanom razdoblju. U svježem su mesu u svim uzorcima utvrđene enterobakterije, *S. aureus*, *Pseudomonas* spp. i psihrofilne bakterije. Veoma je značajno napomenuti da *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* i sulfitreducirajuće klostridije nisu utvrđene. *S. aureus* utvrđen je samo u svježem mesu, dok je *Pseudomonas* spp. bio utvrđen u svježem mesu te u trećem i šestom mjesecu u svim zamrznutim uzorcima. Inicijalni ukupni broj bakterija je u svim uzorcima svježeg mesa bio veći od 4 log cfu/g (najmanje u kareu 3,60 log cfu/g do najviše 5,00 log cfu/g u butu), dok je u slanini prosječno iznosio 5,97 log cfu/g i iznosio od 4,65 do 7,0 log cfu/g). Tijekom osamnaest mjeseci pohrane broj se bakterija postepeno smanjivao za oko 1 log. Broj enterobakterija bio je 2,08 log cfu/g u kareu odnosno 2,60 log cfu/g u uzorcima buta, za razliku od slanine u kojoj je taj broj iznosio 4,20 log cfu/g. Također, postoji trend smanjivanja broja enterobakterija tijekom pohrane zamrznute svinjetine pa je nakon 18 mjeseci njihov broj bio veoma nizak i iznosio prosječno 0,36 log cfu/g u kareu, 0,69 log cfu/g u butu, a u slanini 1,15 log cfu/g. U uzorcima slanine uočeno je smanjenje broja enterobakterija za 3 log za vrijeme pohrane. Broj psihrofilnih bakterija u svježem mesu bio je >3 log cfu/g u kareu, >4 log cfu/g u butu i >5 log cfu/g u slanini. Nakon povećanja broja za 1 log u prva tri mjeseca u zamrznutom mesu, nakon 18 mjeseci je u kareu utvrđeni broj psihrofilnih bakterija bio sličan inicijalnom broju, dok je u slanini iznosio 3,32 log cfu/g.

U tablici 10 prikazana je značajnost razlika ispitivanih parametara (ukupnog broja bakterija, broja enterobakterija, *S. aureus*, *Pseudomonas* spp., psihrofilnih bakterija i a_w) s obzirom na uzorak i vrijeme pohrane zamrznutih uzoraka.

Aktivitet vode je iznosio 0,91, odnosno 0,92 u svježim uzorcima. Nakon zamrzavanja se a_w smanjio i bio najniži s dvanaest mjeseci (0,816 u kareu, 0,81 u butu i 0,88 u slanini), te se do kraja pohrane povećao i bio sličan ili veći od inicijalnih vrijednosti.

Tablica 7 Rezultati mikrobiološke pretrage uzoraka karea tijekom uskladištenja u zamrznutom stanju

KARE						
PARAMETAR	Srednja vrijednost	Minimum	Maksimum	Standardna devijacija	Koeficijent varijabilnosti	Standardna pogreška
Ukupni broj bakterija						
0 mj	4,07	3,60	4,67	0,32	7,84	0,07
3 mj	4,18	3,30	4,90	0,42	10,14	0,09
6 mj	4,14	3,44	4,87	0,42	10,23	0,09
12 mj	4,05	3,35	4,90	0,44	10,95	0,10
15 mj	3,82	3,00	4,50	0,37	9,72	0,08
18 mj	3,65	2,60	4,23	0,45	1,39	0,10
<i>Staphylococcus aureus</i> *						
0 mj	0,11	0,00	2,30	0,51	447,21	0,11
Enterobakterije						
0 mj	2,08	1,30	3,04	0,41	19,54	0,09
3 mj	1,80	1,30	2,17	0,24	13,11	0,05
6 mj	1,51	0,00	2,24	0,73	48,45	0,16
12 mj	1,24	0,00	2,47	0,73	58,69	0,16
15 mj	0,59	0,00	1,40	0,56	94,27	0,12
18 mj	0,36	0,00	1,30	0,51	140,90	0,12
<i>Pseudomonas</i> spp.**						
0 mj	0,66	0,00	2,47	1,04	157,75	0,23
3 mj	0,93	0,00	2,90	1,18	127,42	0,26
6 mj	0,43	0,00	2,30	0,87	205,67	0,20
Psihrofilne bakterije						
0 mj	3,55	3,00	4,63	0,38	10,77	0,09
3 mj	5,65	5,11	7,00	0,46	8,09	0,10
6 mj	4,81	3,00	6,00	0,80	16,56	0,18
12 mj	4,71	3,80	5,60	0,50	10,3	0,11
15 mj	3,75	3,00	4,40	0,43	11,51	0,10
18 mj	3,32	2,00	4,20	0,67	20,19	0,15
a _w						
0 mj	0,91	0,91	0,92	0,00	0,34	0,00
3 mj	0,89	0,89	0,90	0,00	0,42	0,00
6 mj	0,91	0,89	0,91	0,01	0,70	0,00
12 mj	0,86	0,85	0,88	0,01	0,97	0,00
15 mj	0,91	0,91	0,91	0,00	0,30	0,00
18 mj	0,94	0,94	0,95	0,00	0,27	0,00

* Od 3. mjeseca na dalje nije utvrđen; **Od 12. mjeseca na dalje nije utvrđen; Vrijednosti izražene u log cfu/g

Tablica 8 Rezultati mikrobiološke pretrage uzoraka buta tijekom uskladištenja u zamrznutom stanju

BUT						
PARAMETAR	Srednja vrijednost	Minimum	Maksimum	Standardna devijacija	Koeficijent varijabilnosti	Standardna pogreška
Ukupni broj bakterija						
0 mj	4,68	4,00	5,20	0,34	7,25	0,08
3 mj	4,86	4,00	6,47	0,60	12,29	0,13
6 mj	4,41	3,77	6,04	0,57	12,93	0,13
12 mj	4,26	3,60	5,20	0,43	10,15	0,10
15 mj	3,93	3,00	4,43	0,43	10,99	0,10
18 mj	3,82	2,30	4,51	0,49	12,81	0,11
<i>Staphylococcus aureus</i>						
0 mj	0,93	0,00	3,53	1,33	143,18	0,30
Enterobakterije						
0 mj	2,60	2,00	4,14	0,51	19,63	0,11
3 mj	2,39	2,00	2,90	0,36	14,96	0,08
6 mj	1,57	0,00	3,20	1,05	66,75	0,23
12 mj	1,38	1,00	2,20	0,47	34,13	0,11
15 mj	0,76	0,00	1,47	0,53	69,32	0,12
18 mj	0,69	0,00	2,17	0,71	103,59	0,16
<i>Pseudomonas spp.</i>						
0 mj	2,22	0,00	3,20	0,82	36,75	0,18
3 mj	1,67	0,00	2,69	0,91	54,42	0,20
6 mj	1,15	0,00	2,69	1,19	103,50	0,27
Psihrofilne bakterije						
0 mj	4,38	3,77	5,32	0,50	11,33	0,11
3 mj	5,31	4,80	6,95	0,48	8,99	0,11
6 mj	4,64	3,00	6,60	0,83	17,88	0,19
12 mj	4,66	3,60	6,20	0,70	15,12	0,16
15 mj	3,69	3,00	4,60	0,49	13,21	0,11
18 mj	3,32	2,00	4,77	0,71	21,35	0,16
a_w						
0 mj	0,91	0,91	0,92	0,01	0,70	0,00
3 mj	0,90	0,89	0,92	0,01	0,65	0,00
6 mj	0,91	0,90	0,92	0,00	0,53	0,00
12 mj	0,81	0,80	0,89	0,02	2,10	0,00
15 mj	0,91	0,91	0,92	0,00	0,28	0,00
18 mj	0,92	0,91	0,93	0,01	0,57	0,00

* Od 3. mjeseca na dalje nije utvrđen; **Od 12. mjeseca na dalje nije utvrđen ;Vrijednosti izražene u log cfu/g

Tablica 9 Rezultati mikrobiološke pretrage uzoraka slanine tijekom uskladištenja u zamrznutom stanju

SLANINA						
PARAMETAR	Srednja vrijednost	Minimum	Maksimum	Standardna devijacija	Koeficijent varijabilnosti	Standardna pogreška
Ukupni broj bakterija						
0 mj	5,97	4,65	7,00	0,61	10,16	0,14
3 mj	4,69	3,90	6,40	0,60	12,86	0,13
6 mj	4,70	3,92	5,23	0,34	7,17	0,08
12 mj	4,58	3,90	5,20	0,37	8,13	0,08
15 mj	4,43	3,69	4,95	0,36	8,21	0,08
18 mj	4,42	3,95	5,00	0,35	7,86	0,08
<i>Staphylococcus aureus</i>						
0 mj	2,47	0,00	3,00	0,87	35,47	0,20
Enterobakterije						
0 mj	4,20	3,66	5,04	0,39	9,32	0,09
3 mj	1,91	1,30	2,65	0,36	18,70	0,08
6 mj	1,22	0,00	2,17	0,50	41,26	0,11
12 mj	1,04	0,00	2,00	0,44	42,27	0,10
15 mj	0,96	0,00	2,00	0,51	52,44	0,11
18 mj	1,15	0,00	2,47	0,51	44,40	0,11
<i>Pseudomonas spp.</i>						
0 mj	2,42	0,00	4,65	1,50	62,15	0,34
3 mj	0,73	0,00	2,30	1,02	140,15	0,23
6 mj	2,31	0,00	3,34	0,69	29,75	0,15
Psihrofilne bakterije						
0 mj	5,84	4,00	7,14	0,73	12,58	0,16
3 mj	4,68	3,00	5,80	0,64	13,58	0,14
6 mj	3,75	3,00	4,90	0,43	11,47	0,10
12 mj	3,92	3,20	5,20	0,40	10,13	0,09
15 mj	3,86	3,00	4,68	0,46	12,04	0,10
18 mj	4,08	3,30	480	0,40	9,71	0,09
a_w						
0 mj	0,92	0,91	0,92	0,00	0,41	0,00
3 mj	0,90	0,88	0,91	0,01	0,97	0,00
6 mj	0,92	0,91	0,92	0,00	0,24	0,00
12 mj	0,88	0,86	0,89	0,01	0,71	0,00
15 mj	0,92	0,91	0,92	0,00	0,23	0,00
18 mj	0,94	0,94	0,95	0,00	0,47	0,00

* Od 3. mjeseca na dalje nije utvrđen; **Od 12. mjeseca na dalje nije utvrđen; Vrijednosti izražene u log cfu/g

Tablica 10. Značajnost razlika ukupnog broja bakterija, broja enterobakterija, *S.aureus*, *Pseudomonas* spp., psihrofilnih bakterija i a_w s obzirom na uzorak i vremensko razdoblje uskladištenja svinjskog mesa u zamrznutom stanju

Parametri	Uzorak	Mjeseci						$s \bar{X}$	Prosje ²	$s \bar{X}$
		0	3	6	12	15	18			
Ukupan broj bakterija	But	4,68 ^{abA}	4,86 ^{aA}	4,41 ^{acAB}	4,26 ^{bcdAB}	3,93 ^{cdA}	3,82 ^{dA}	0,10	4,33 ^A	0,05
	Kare	4,07 ^{abB}	4,18 ^{aB}	4,14 ^{abA}	4,05 ^{abB}	3,85 ^{abA}	3,65 ^{bA}		3,99 ^B	
	Slabine	5,97 ^{aC}	4,69 ^{bA}	4,70 ^{bB}	4,58 ^{bA}	4,43 ^{bB}	4,42 ^{bB}		4,80 ^C	
	Prosje ¹	4,91 ^a	4,58 ^b	4,42 ^b	4,30 ^{bc}	4,07 ^{cd}	3,97 ^d		0,08	
Enterobakterije	But	2,60 ^{aA}	2,39 ^a	1,57 ^b	1,38 ^{bc}	0,76 ^{cd}	0,69 ^{dAB}	0,12	1,56 ^{AB}	0,09
	Kare	2,08 ^{aA}	1,80 ^{ab}	1,51 ^{ab}	1,25 ^b	0,59 ^c	0,36 ^{cB}		1,26 ^A	
	Slabine	4,20 ^{aB}	1,91 ^b	1,22 ^c	1,04 ^c	0,97 ^c	1,15 ^{cA}		1,75 ^B	
	Prosje ¹	2,96 ^a	2,03 ^b	1,43 ^c	1,22 ^c	0,77 ^d	0,73 ^d		0,09	
<i>S. aureus</i>	But	0,93 ^{aA}	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,09	0,15 ^A	0,06
	Kare	0,11 ^B	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,02 ^A	
	Slabine	2,47 ^{aC}	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b		0,41 ^B	
	Prosje ¹	1,17 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b		0,07	
<i>Pseudomonas</i> spp.	But	2,22 ^{aA}	1,67 ^{abA}	1,15 ^{bA}	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	0,17	0,84 ^A	0,10
	Kare	0,66 ^{abB}	0,93 ^{aAB}	0,43 ^{abA}	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b		0,33 ^B	
	Slabine	2,42 ^{aA}	0,73 ^{bB}	2,31 ^{aB}	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b		0,91 ^A	
	Prosje ¹	1,77 ^a	1,11 ^b	1,29 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c		0,11	
Psihrofilne bakterije	But	4,38 ^{aA}	5,31 ^{bAB}	4,64 ^{aA}	4,66 ^{aA}	3,69 ^c	3,32 ^{cA}	0,13	4,33	0,08
	Kare	3,55 ^{aB}	5,65 ^{bB}	4,81 ^{cA}	4,71 ^{cA}	3,75 ^a	3,32 ^{aA}		4,30	
	Slabine	5,84 ^{aC}	4,68 ^{bA}	3,75 ^{cB}	3,92 ^{cB}	3,86 ^c	4,08 ^{bcB}		4,35	
	Prosje ¹	4,59 ^a	5,21 ^b	4,40 ^a	4,43 ^a	3,77 ^c	3,57 ^c		0,10	

Parametri	Uzorak	Mjeseci						s \bar{X}	Prosje ²	s \bar{X}
a _w	But	0,915 ^a	0,901 ^b	0,911 ^{aAB}	0,872 ^{cA}	0,911 ^a	0,917 ^{aA}		0,904 ^A	
	Kare	0,912 ^a	0,894 ^b	0,907 ^{aA}	0,864 ^{cB}	0,909 ^a	0,943 ^{dB}	0,001	0,905 ^A	0,002
	Slabine	0,917 ^a	0,897 ^b	0,917 ^{aB}	0,881 ^{cC}	0,916 ^a	0,942 ^{dB}		0,911 ^B	
	Prosje ¹	0,915 ^a	0,897 ^b	0,912 ^a	0,872 ^c	0,912 ^a	0,934 ^d	0,001		

a,b,c,d Vrijednosti u istom redu tablice označene različitim slovima značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

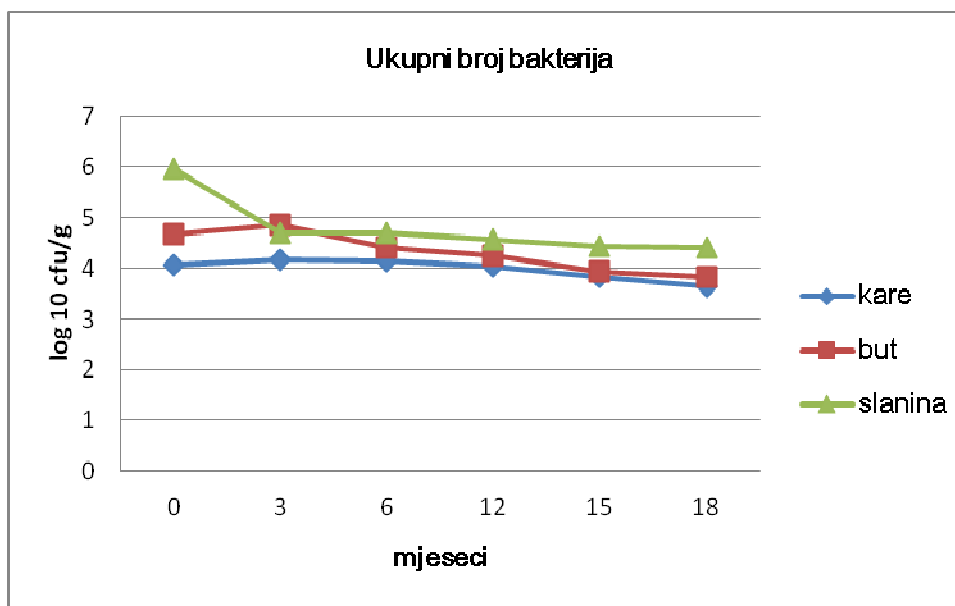
A,B,C Vrijednosti u istom stupcu tablice označene različitim slovima značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

Prosje¹ – prosječna vrijednost tri grupe mišića s obzirom na različito vremensko razdoblje

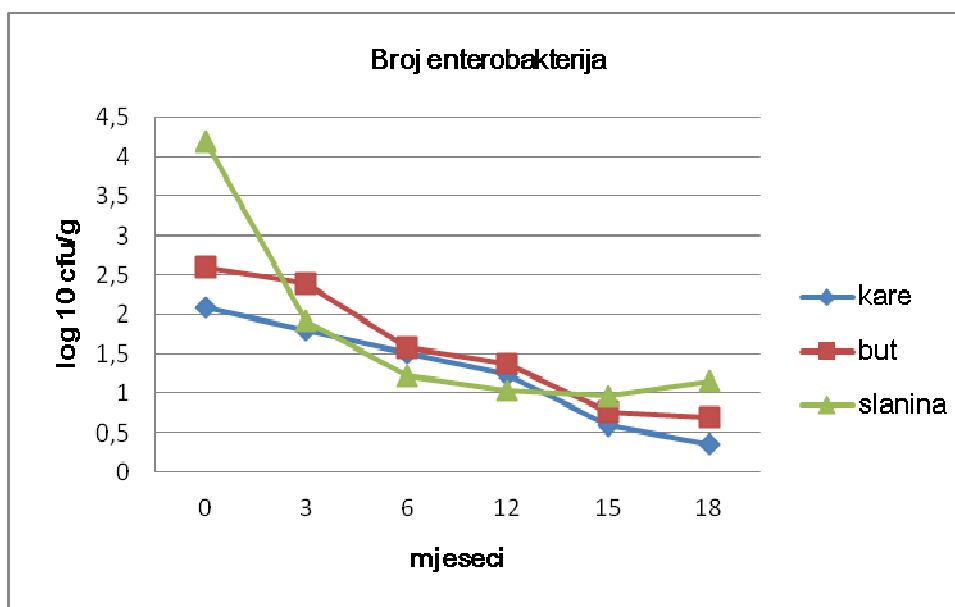
Prosje² – prosječna vrijednost pet mjeseci vremenskog razdoblja s obzirom na različite mišiće

Vrijednosti izražene u log cfu/g

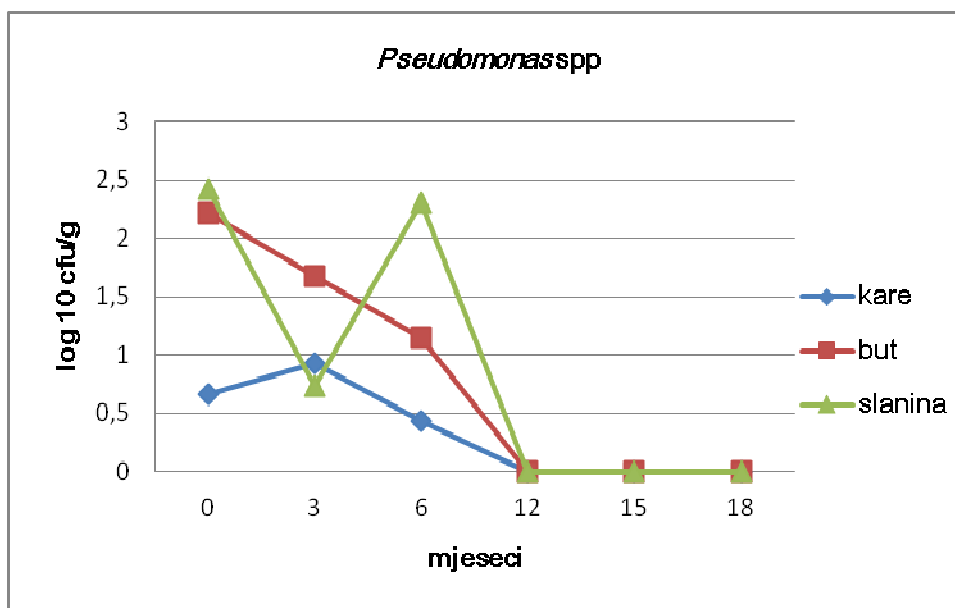
Kretanje ukupnog broja pojedinih bakterijskih vrsta u uzorcima karea, buta i slanina u promatranom periodu od osamnaest mjeseci uskladištenja prikazano je na slikama od 13 do 17.



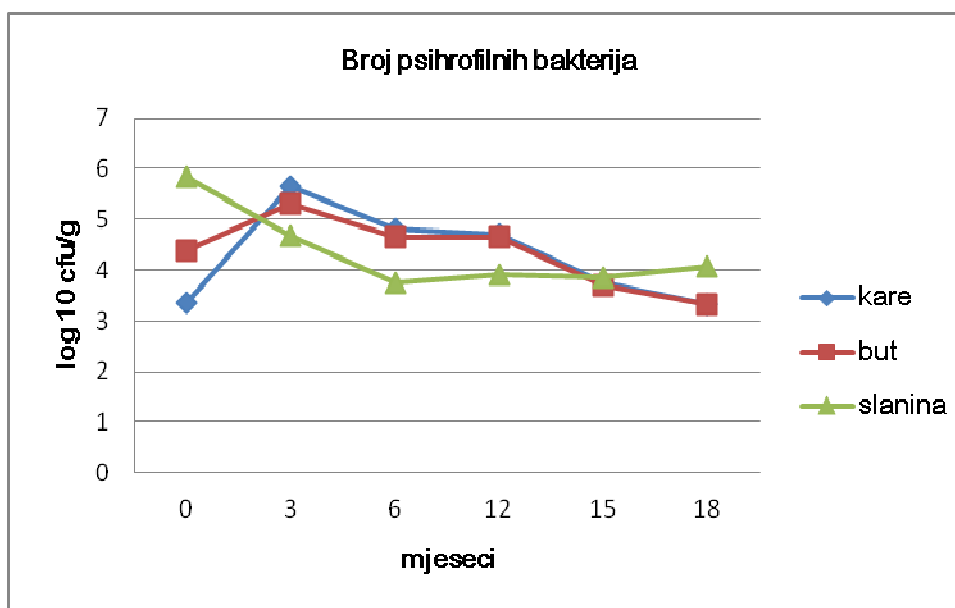
Slika 13 Kretanje ukupnog broja bakterija tijekom pokusnog perioda od 18 mjeseci uskladištenja svinjskog mesa u zamrznutom stanju



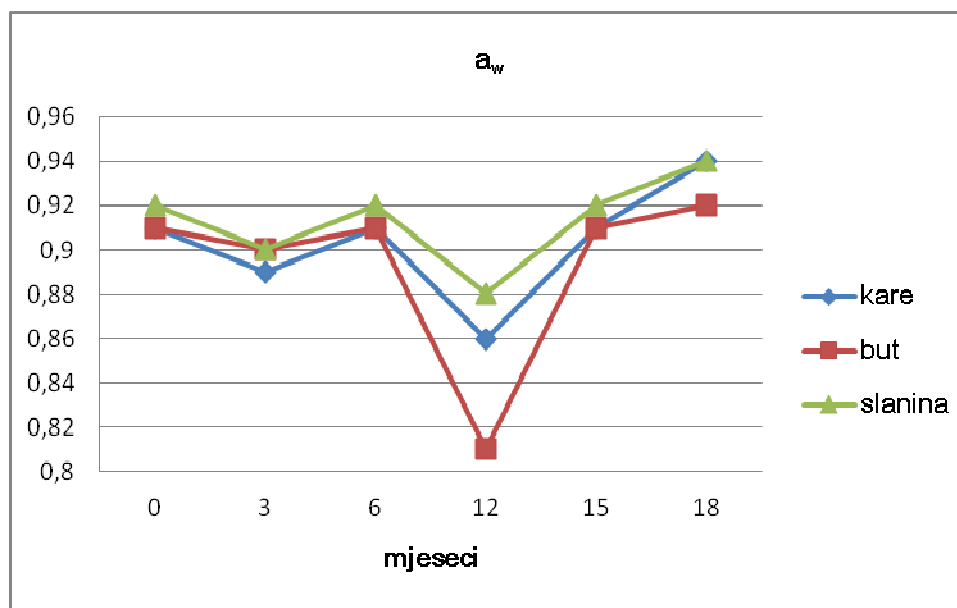
Slika 14 Kretanje enterobakterija tijekom pokusnog perioda od 18 mjeseci uskladištenja svinjskog mesa u zamrznutom stanju



Slika 15 Kretanje broja *Pseudomonas* spp tijekom pokusnog perioda od 18 mjeseci uskladištenja svinjskog mesa u zamrznutom stanju



Slika 16 Kretanje broja psihrofilnih bakterija tijekom pokusnog perioda od 18 mjeseci uskladištenja svinjskog mesa u zamrznutom stanju



Slika 17 Kretanje vrijednosti aktiviteta vode (a_w) psihofilnih bakterija tijekom pokusnog perioda od 18 mjeseci uskladištenja svinjskog mesa u zamrznutom stanju

RASPRAVA

Fizikalna svojstva zamrznutog mesa

Rezultati studije potvrđuju navode iz znanstvene i stručne literature o utjecaju zamrzavanja, uskladištenja i naknadnog odmrzavanja na svojstva zadržavanja vode u mesu bez obzira na primijenjenu metodu istraživanja tog svojstva (Ngapo i sur., 1999; Vieira i sur., 2009). Pokazatelji koji su korišteni u ovoj studiji bili su kalo odmrzavanja, EZ-drip metoda utvrđivanja otpuštanja vode i sposobnost zadržavanja vode metodom kompresije. Zbog očite povezanosti rezultata kao mjerilo je uzet i zbroj kala odmrzavanja i EZ-drip otpuštanja vode; obje ove metode izražavaju se kao postotak otpuštene vode u odnosu na početnu težinu uzorka. Trend kojeg su zabilježili mnogi drugi istraživači (Ngapo i sur., 1999; Vieira i sur., 2009) potvrđen je i na ovaj način, a nedosljednosti koje su se pojavile u rezultatima EZ-drip pristupa dodatno su pojašnjene. Naime, vrijednosti otpuštanja vode utvrđene nakon dvanaest i petnaest mjeseci pohrane u zamrznutom stanju bile su vrlo niske (2,94% odnosno 3,18% za but i 3,59% odnosno 1,75% za leđni mišić) na što je vjerojatno utjecalo vrlo visok kalo odmrzavanja upravo u tim mjerenjima (12,63% odnosno 16,92% u butu i 12,08% odnosno 18,81% u leđnom mišiću). Iako prethodna istraživanja ukazuju na snižavanje pH vrijednosti mesa nakon odmrzavanja (Leygonie i sur., 2011), ova studija to ne može potvrditi. Istraživanje tijekom izrade ove studije ukazuju na lagano, ali značajno povećanje pH vrijednosti. Neka istraživanja slične rezultate

objašnjavaju djelovanjem mikroorganizama što bi govorilo o onečišćenju mesa prije zamrzavanja, ali ovdje to nije slučaj (vidjeti rezultate mikrobioloških istraživanja u ovoj studiji). Pri tumačenju rezultata i usporedbi s literaturnim navodima glede ispitivanja pH vrijednosti i drugih pokazatelja kao što su boja i nježnost mesa, valja imati na umu činjenicu da su istraživanja u ovom segmentu vrlo raznolika i da se rijetko mogu naći primjeri u kojima su dovoljno usporedivi mnogobrojni čimbenici kao što su temperatura, dužina uskladištenja, uvjeti uskladištenja, načini pakiranja, metode odmrzavanja i drugo. Primjerice, utvrđeno je da se nježnost mesa povisuje proporcionalno dužini trajanja razdoblja pohrane i u ovisnosti o zrelosti mesa prije zamrzavanja (Vieira i sur., 2009). Lui i suradnici (2010) navode da je uzrok smanjenju sile potrebne za presjek uzorka mesa slabljenje stanične membrane zbog formiranja kristala leda, a sličnih je rasprava puno. Ovi primjeri govore da je vrlo teško uspoređivati brojna istraživanja koja su provedena na temu zamrzavanja mesa posljedičnim promjenama fizikalnih svojstava.

Kemijska svojstva zamrznutog mesa

Osnovni kemijski sastav

Količina vode, bjelančevina i masti u svakom proizvodu, pa tako i svježem mesu, predstavlja osnovne parametre njegove kakvoće. Kako bi se dobio uvid u kakvoću svinjskog mesa iz različitih kategorija (kare, but i slanina) namijenjenog uskladištenju u zamrzivaču, uzevši u obzir da se literaturni podaci uglavnom odnose na rezultate istraživanja kemijskog sastava i promjena u sastavu svinjskog mesa tijekom razdoblja uskladištenja šest do dvanaest mjeseci (Novelli i sur., 1998; Pradhan i sur., 2000; Heš i sur., 2007; Botsoglou i sur., 2014), u ovom istraživanju navedeni parametri kakvoće određivani su na početku istraživanja, odnosno prije zamrzavanja (svježe meso), te nakon dvanaest i osamnaest mjeseci uskladištenja.

Analizom navedenih parametara utvrđene su pojedinačne (po mjesecima uskladištenja) i prosječne vrijednosti kemijskog sastava za cjelovito razdoblje uskladištenja (svježe meso prije uskladištenja, dvanaest i osamnaest mjeseci uskladištenja). Blagi trend pada udjela vode tijekom uskladištenja u odnosu na svježe meso određen je u uzorcima buta, što pokazuju i rezultati ranijih istraživanja (Novelli i sur., 1998). Utvrđene prosječne vrijednosti sastava, određene tijekom cijelog razdoblja uskladištenja, karakteristične su za svinjsko meso i u skladu su sa literaturnim podacima objavljenim od drugih autora (Kovačević, 2001; Senčić i sur., 2011; Pleadin i sur., 2011).

Sastav masnih kiselina

U literaturi su nedostatni podaci o sastavu masnih kiselina različitih anatomskih dijelova svinjskog trupa kao i promjeni u sastavu masnih kiselina tijekom pohrane u zamrznutom stanju. U cilju informiranja potrošača, neupitna je važnost određivanja sastava masnih kiselina u hrani životinjskog

podrijetla kao značajnom izvoru masti u ljudskoj prehrani. Brojna istraživanja pokazuju da na sastav masnih kiselina u hrani životinjskog podrijetla značajno utječe niz čimbenika, kao što su: hranidba, dob, tjelesna masa, anatomska pozicija, spol i genotip životinje. Ova saznanja daju mogućnosti za kreiranje i primjenu različitih tehnoloških postupaka u uzgoju životinja, koji će doprinijeti proizvodnji mesa poželjnog udjela masti i omjera masnih kiselina (Barbir i sur., 2014). U predmetnom istraživanju određen je sastav masnih kiselina u uzorcima svinjskog mesa i to karea, buta i slanine te su praćene promjene u sastavu masnih kiselina kroz period pohrane u zamrznutom stanju.

Sastav masnih kiselina (tablica 11, 12 i 13 u Dodatku 1.) razlikuje se među uzorcima buta, karea i slanine. Najviše višestruko nezasićenih masnih kiselina (eng. polyunsaturated fatty acids – PUFA) određeno je u uzorcima karea, kao i najbolji omjer višestruko nezasićenih i zasićenih masnih kiselina (0,40). U svim uzorcima najzastupljenije su jednostruko nezasićene masne kiseline (eng. monounsaturated fatty acids – MUFA). Tijekom pohrane u zamrznutom stanju se povećava udjel zasićenih masnih kiselina (eng. saturated fatty acids – SFA) koji ima najveće vrijednosti nakon šest mjeseci uskladištenja (Slike 11 i 12 na stranici 29).

Omjer višestruko nezasićenih i zasićenih masnih kiselina, kao i sam sastav podložni su promjenama. Na njih najviše utječe način hranidbe svinja, odnosno pojedine komponente krmiva kao što su soja i ječam. U radu Reig i suradnika (2013) uvođenjem ječma i soje u hranidbu svinja sastav masnih kiselina se promijenio i posljedično je omjer višestruko nezasićenih i zasićenih kiselina narastao na 0,70. Karakteristično visok udio PUFA u mesu svinja, a prema tome i nutritivno povoljan omjer višestruko nezasićenih masnih kiselina i zasićenih masnih kiselina (P/S) koji se najčešće kreće u zdravstveno preporučenim granicama $\geq 0,4$, ponajprije proizlazi iz visokog sadržaja linolne kiseline (C18:2n6) (Barbir i sur., 2014). U našem istraživanju je taj omjer prisutan jedino u svježim uzorcima svinjskog karea.

Tijekom pohrane u zamrznutom stanju dolazi do smanjenja udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina dok se udjel jednostruko nezasićenih masnih kiselina nije značajno mijenjao. Udjel zasićenih masnih kiselina raste tijekom pohrane u zamrznutom stanju.

Sastav masnih kiselina određen u ovom istraživanju u skladu je s rezultatima istraživanja drugih autora (Enser i sur., 1996; Sinclair i sur., 2010). Prema zastupljenosti, od zasićenih, tu je još miristinska (C14:0) masna kiselina, a od jednostruko nezasićenih palmitoleinska (C16:1), što je u skladu s navodima Barbir i suradnika (2014).

Promjene peroksidnog broja

Kod procjene kakvoće i prihvatljivosti mesa, kao važan čimbenik za promjenu senzornih svojstava mesa te formiranje potencijalno toksičnih spojeva, navodi se oksidacija lipida u mesu. Oksidacija lipida u mesu povezana je s negativnim pojavama okusa i mirisa, koje se najčešće opisuju kao užeglost ili općenito neprihvatljivost mesa za konzumiranje, predstavljajući pri tom veliki problem za mesne

industrije (Einerson i Reineccius, 1977; Bailey i sur., 1980; Ladikos i Lougovois, 1990; Pettersen i sur., 2004). Oksidacija lipida je složeni proces u kojem nezasićene masne kiseline stupaju u reakciju s molekularnim kisikom preko slobodnih radikala te nastaju peroksidi ili ostali primarni produkti oksidacije (Gray, 1978). Sekundarni produkti oksidacije (aldehidi, ketoni i esteri) odgovorni su za nastanak neprihvatljivog (užeglog) okusa i mirisa mesa tijekom uskladištenja zamrznutog mesa (Ladikos i Lougovois, 1990). Promjene se najlakše prepoznaju po promijenjenom mirisu i ukusu kao posljedici užglosti, uz utvrđene povećane vrijednosti peroksidnog broja.

Peroksidni broj označava razinu primarne oksidacije masnih kiselina te određuje količinu nastalih hidroperoksida kao primarnih proizvoda autooksidacije. U uskoj je vezi s načinom čuvanja svježeg mesa ili finalnih mesnih proizvoda (Lee i sur., 2010; Choe i sur., 2011). Literaturni podaci koji se odnose na određivanje stupnja oksidacije odnosno peroksidnog broja masti za različite vrste mesa i mesnih proizvoda su međutim manjkavi i različito interpretirani.

U ovom istraživanju su tijekom uskladištenja uzoraka smrznutog svinjskog mesa određivane vrijednosti peroksidnog broja u tri kategorije mesa. Rezultati ispitivanja pokazali su značajan porast vrijednosti peroksidnog broja sa povećanjem vremena uskladištenja. Značajno veće razine u odnosu na literaturne podatke te početne vrijednosti iz ovog istraživanja, za sve tri kategorije mesa, određene su nakon petnaest mjeseci pohrane zamrznutog mesa. Najveći porast peroksidnog broja pri tom je određen u uzorcima buta (91,64 mmolO₂/kg), potom karea (65,19 mmolO₂/kg), a najmanji u uzorcima slanine (18,09 mmolO₂/kg). Prosječna vrijednost za sve tri kategorije mesa nakon petnaest mjeseci uskladištenja iznosila je 58,31 mmolO₂/kg i bila je značajno veća u odnosu na prosječnu vrijednost određenu nakon dvanaest mjeseci uskladištenja (13,57 mmolO₂/kg). Uočeni trend porasta u skladu je sa rezultatima prijašnjih istraživanja koja govore da vrijednost peroksidnog broja raste s vremenom uskladištenja zamrznutog mesa, ujedno još značajnije u proizvodima sa većim udjelom nezasićenih masnih kiselina (Mărieș, 2010).

U istraživanju pojedinih vrsta proizvoda od svinjskog mesa, pohranjenim na -10 °C tijekom otprilike sedam mjeseci, senzorskim metodama identificirana je užglost (Hansen i sur., 2004). Utvrđene su referentne vrijednosti peroksidnog broja u rasponu do 15 mmolO₂/kg nakon šest mjeseci pohrane uzoraka u zamrzivaču (Novelli i sur., 1998; Hęś i sur., 2007). Također, vrijednosti u rasponu od 10 mmolO₂/kg (Lee i sur., 2010) do 20 mmolO₂/kg (Choe i sur., 2011) određene su tijekom četrnaest dana pohrane mesa u hladnjaku.

U ovom istraživanju, nakon osamnaest mjeseci uskladištenja uočen je pad peroksidnog broja u odnosu na razdoblje uskladištenja od petnaest mjeseci, na vrijednosti od 34,60 mmolO₂/kg za kare, 35,08 mmolO₂/kg za but i 13,43 mmolO₂/kg za slaninu (prosječno za sve tri kategorije mesa je 27,70 mmolO₂/kg). Pad vrijednosti peroksidnog broja pokazuje da je nakon perioda indukcije oksidacije do primarnih produkata, brzina raspadanja primarnih (peroksida) do sekundarnih produkata bila veća od brzine njihovog nastajanja. Literaturni podaci također pokazuju da u određenom razdoblju tijekom

uskladištenja, nakon kontinuiranog rasta peroksidnog broja, dolazi do pada njegove vrijednosti, što se objašnjava daljnjom razgradnjom peroksida na sekundarne oksidacijske produkte (Lee i sur., 2010; Mărieș, 2010).

Mikrobiološka svojstva zamrznutog mesa

Propisima kojima se utvrđuje mikrobiološka ispravnost svinjetine propisani su kriteriji higijene u procesu proizvodnje (Anon., 2005) prema kojima meso svinjskog trupa nakon rasijecanja, a prije rashlađivanja, ne smije sadržavati bakterije roda *Salmonella* u 25 g, a ukupni broj bakterija i broj enterobakterija smije se kretati u određenim graničnim vrijednostima. Prema Vodiču o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Anon., 2011) preporučeni kriteriji za svježe i zamrznuto meso obuhvaćaju, uz već navedene, dodatne bakterijske vrste (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, sulfitreducirajuće klostridije) u određenom broju uzoraka odnosno jedinica uzoraka. Upravo o mikrobiološkoj slici svježeg mesa ovisit će daljnja mikrobiološka slika zamrznutog mesa (Mossel, 1982; Perez-Chabela i Mateo-Oyague, 2004).

U ovom su istraživanju praćene promjene broja mikroorganizama u uzorcima zamrznutog mesa tijekom osamnaest mjeseci pohrane. Osvrnemo li se na podatke u tablicama 7, 8 i 9 te slikama 13-17, možemo uočiti da se ukupni broj bakterija, broj enterobakterija, te psihrofilnih bakterija smanjio u odnosu na njihov inicijalni broj.

Sama činjenica da nisu utvrđene bakterije roda *Salmonella*, *L. monocytogenes* i sulfitreducirajuće klostridije u svježem mesu niti kasnije u zamrznutom, upućuje na dobru higijensku i proizvodnu praksu u kloničkom objektu i proizvodnim pogonima. Ukupni broj bakterija nije prelazio preporučene granične vrijednosti (10^5 cfu/g). Bakterija *S. aureus* utvrđena je samo u svježem mesu, u broju manjem od 10 cfu/g, a u svježoj slanini u broju od 2,47 log cfu/g. Važno je napomenuti da je postupak zamrzavanja povoljno utjecao na smanjivanje broja stafilocoka, koji više nisu utvrđeni u zamrznutom mesu nakon trećeg mjeseca. Također, a_w se do trećeg mjeseca smanjio ispod 0,9 što nepovoljno utječe na rast bakterija (Gracey 1999; Karolyi, 2004; Arica i sur., 2013). Broj enterobakterija u mesu bio je manji od preporučenih kriterija (Vodič, 2011), no u slanini je inicijalno bio veći (4,2 log cfu/g). Pretpostavljamo da je tome razlog konfekcioniranje i način oblikovanja slanine uz odvajanje rebara te otvaranje površine mesa koje postaje dostupno naknadnoj kontaminaciji. No unatoč visokom broju, tijekom zamrzavanja u vremenu od osamnaest mjeseci broj enterobakterija se smanjio za 3 log cfu/g u slanini, odnosno u mesu za oko 2 log cfu/g u odnosu na inicijalni broj i bio manji od preporučenih vrijednosti (10^2 cfu/g). Na smanjivanje broja bakterija ili njihovo umiranje na temperaturama zamrzavanja upozoravaju i drugi autori (Mossel, 1982; Varnam i Sutherland, 1995; Gracey, 1999; Dave i Ghaly, 2011).

Ukupni broj bakterija također je pokazao trend smanjivanja tijekom zamrzavanja. Nakon osamnaest mjeseci bio je ispod preporučenih kriterija $<10^3$ cfu/g (kare i but) odnosno $<10^4$ cfu/g (slanina).

Uzorci slanine su u usporedbi s mesom imali uvijek veći broj mikroorganizama i kao svježja i zamrznuta slanina. Inicijalni je broj svih pretraživanih parametara uvijek bio veći u slanini, a jednako tako je bio veći i nakon osamnaest mjeseci, a kao što smo već istaknuli, najviše se za 3 log cfu/g smanjio broj enterobakterija.

Psihrofilni mikroorganizmi se mogu razmnožavati i na temperaturama zamrzavanja (Mossel, 1882). U našem su istraživanju bakterije roda *Pseudomonas* utvrđene tijekom 6 mjeseci zamrzavanja, a broj im se smanjivao. Ukupni broj psihrofilnih bakterija bio je na kraju pohrane 3,32 log cfu/g u uzorcima mesa, a nešto viši, 4,08 log cfu/g u slanini. U uzorcima mesa je inicijalni broj psihrofilnih bakterija (3,35 log cfu/g u kareu i 4,38 log cfu/g u butu) porastao nakon zamrzavanja i u trećem mjesecu pohrane bio veći od 5 log cfu/g). Nakon toga je njihov broj opadao za oko 1 log cfu/g do 12 mjeseci te još jednom do osamnaestog mjeseca pohrane.

Aktivitet vode izmjeren u svježim uzorcima u granicama je povoljnog odnosa za rast bakterija, a tu je vrijednost zadržao i tijekom zamrzavanja sve do dvanaestog mjeseca uskladištenja, kada je uočen u uzorcima mesa i slanine nagli pad a_w (0,88 u slanini, 0,81 u butu i 0,86 u kareu). Podudara se sa bržim padom enterobakterija i psihrofilnih bakterija u uzorcima mesa, a *Pseudomonas* spp. više nije utvrđen. Potom a_w opet raste do granica koje pogoduju rastu bakterija (0,91 do 0,94). Bakteriološkom pretragom na kraju pokusa u zamrznutom mesu utvrđene su psihrofilne bakterije u broju većem od 3 log cfu/g i 4 log cfu/g u slanini, jednako kao i ukupni broj bakterija. Dobiveni rezultati i utjecaj a_w na bakterije je sukladan literaturnim podacima (Gracey, 1999; Karolyi, 2004).

ZAKLJUČCI I PREPORUKE

Promjene u fizikalnim svojstvima zamrznutog mesa svinja

Zaključno se može reći da su potvrđeni literaturni navodi o utjecaju zamrzavanja, uskladištenja i naknadnog odmrzavanja na većinu fizikalnih svojstva mesa.

Iz ove studije može se vidjeti trend povećanja udjela otpuštene vode nakon odmrzavanja koji raste s dužinom pohrane uzoraka mesa u zamrzivaču. Utvrđene su značajne razlike između pH vrijednosti tijekom razdoblja pohrane u zamrzivaču, iako one nisu od praktične važnosti i ne upućuju na anomalije u kakvoći mesa nastale tijekom uskladištenja. Rezultati ove studije nisu u suglasnosti s literaturnim podacima u kojima se navodi snižavanje pH vrijednosti kao posljedica zamrzavanja i naknadnog odmrzavanja. Rezultati ove studije pokazuju kako meso buta postupno postaje bljeđe tijekom pohrane u zamrzivaču, a sličan trend pokazuje i ledni mišić. Prirodno veće vrijednosti CIE- a^* koje izražavaju razinu crvene boje u mesu snižavaju se nakon tri mjeseca pohrane nakon čega se ne mijenjaju značajno tijekom pohrane uz zamrzivaču. U slučaju uzoraka mesa uzetih iz lednog mišića

vidi se lagani trend povećanja razine crvene boje. Meso buta povećava razinu žute boje tijekom istraživnog razdoblja zamrzavanja, a slično se može reći i za meso iz leđnog dijela svinjske polovice koje više varira u ovom svojstvu tijekom razdoblja pohrane što se može objasniti varijabilnošću udjela intramuskularne masti uzduž leđnog mišića. Tijekom istraživnog razdoblja pohrane mesa u zamrzivaču razlike u tvrdoći, odnosno nježnosti mesa izražene kao Warner-Bratzler otpornost na presjek, u slučaju buta nisu bile značajne. S druge strane, zabilježeno je značajno omekšavanje mesa leđnog dijela nakon tri mjeseca zamrzavanja, nakon čega razlike više nisu značajne tijekom istraživnog razdoblja.

Promjene u kemijskim svojstvima zamrznutog mesa svinja

Na temelju dobivenih TBA vrijednosti možemo zaključiti da je meso nakon osamnaest mjeseci pohrane prihvatljive kakvoće za preradu. Iako je u uzorcima buta uočen blagi trend pada udjela vode tijekom uskladištenja, utvrđene prosječne vrijednosti kemijskog sastava, određene tijekom cijelog razdoblja uskladištenja, karakteristične su za svinjsko meso i u skladu su sa ranije objavljenim literaturnim podacima. Međutim, kontinuirani porast peroksidnog broja tijekom uskladištenja, odnosno njegove visoke vrijednosti nakon 15-mjesečnog uskladištenja, upućuju na najduže preporučeno razdoblje pohrane svinjskog mesa u zamrznutom stanju tijekom razdoblja do dvanaest mjeseci.

Promjene mikrobioloških svojstava zamrznutog mesa svinja

Mikrobiološke promjene koje smo pratili u svježoj i zamrznutoj svinjetini sukladne su podacima u literaturi koji ukazuju da se zamrzavanjem može smanjiti broj bakterija koje se nalaze u mesu. Potvrdili smo i navode da mikroflora zamrznutog mesa ovisi o mikroflori svježeg mesa. Kako bakterije ne rastu ili rastu otežano na temperaturama ispod -10 °C, eventualno onečišćenje mesa koje će biti konzervirano zamrzavanjem vezano je uz higijensku kakvoću sirovine i manipulaciju mesom prije zamrzavanja odnosno pri odmrzavanju. Broj patogenih bakterija ili bakterija kvarenja mesa može biti smanjen primjenom strategija DPP na farmi, DHP u kloničkim objektima i primjenom adekvatnih tehnoloških postupaka obrade trupova i mesa, ne ulazeći kasnije u procjenu hranjive vrijednosti mesa odnosno njegovu komercijalnu kakvoću.

U pogledu mikrobiološke ispravnosti zamrznute svinjetine u našem istraživanju nakon osamnaest mjeseci pohrane mesa nisu utvrđena odstupanja na osnovu kojih bi meso bilo upitne mikrobiološke kakvoće. Međutim, mikrobiološka slika nije jedini čimbenik u procjeni održivosti zamrznutog mesa i treba ju promatrati u kontekstu sveobuhvatne ocjene kakvoće zamrznutog mesa.

Takvom promišljanju idu u prilog nalazi vrsta i količina masnih kiselina tijekom vremena uskladištenja. No, unatoč njihovom blagom porasu tijekom čuvanja smrznutog mesa nisu uočene vrijednosti koje bi u znatnoj mjeri mogli ugroziti dobar status mesa, napose, za potrebe prerade. To se ponajprije odnosi na oksidaciju masnih kiselina tijekom čuvanja smrznutog mesa. Da ta pojava nije u značajnoj mjeri

utjecala na ocjenu upotrebljivosti mesa nakon smrzavanja i dužeg čuvanja (dvanaest i više mjeseci), čini se, možemo pripisati pasmini svinja te načinu hranidbe koji su količinom, rasporedom i svojstvima tkiva (mišićno, masno) utjecali na cjelokupna zbivanja u prošlosti i sada, pri razmatranju optimalnog vremena čuvanja smrznutog mesa svinja.

LITERATURA (REFERENCE)

1. Anonimno (2002): Storage life of meat. Food Science Australia.
<http://www.meatupdate.csiro.au/StorageLife-of-Meat.pdf>.
2. Anonimno (2005): Uredba Komisije (EZ-a) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu
3. Anonimno (2011): Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. Treće izmijenjeno izdanje, ožujak 2011. Ministarstvo poljoprivrede.
4. Arica A. B., M. J. Miller, A. C. Dilger (2013): Pathogens of Interest to the Pork Industry: A Review of Research on Interventions to Assure Food Safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 12, 183-217.
5. Asghar, A., Gray, J.I., Booren, A.M., Gomaa, E.A., Abouzied, M.M., Miller, E.R. (1991): Effects of supranutritional dietary Vitamin E levels on subcellular deposition of alpha-tocopherol in the muscle and on pork quality. Journal of the Science of Food and Agriculture. 57, 31-41.
6. Bailey, M.E., Dupuy, H.P., Legendre, M.G. (1980): Undesirable meat flavor and its control. Page 31. In: The Analysis and Control of Less Desirable Flavors in Foods and Beverages. G. Charalambous, ed. Academic Press, Inc., New York, SAD.
7. Barbir, T., Vulić, A., Pleadin, J. (2014): Masti i masne kiseline u hrani životinjskog podrijetla. Veterinarska stanica [online], 45 (2), 97-109, <<http://www.veterina.com.hr>>. Pristupljeno 28. srpnja 2014.
8. Barnett, H.J., Nelson, R.W., Poysky, F.T. (1991) A comparative study using multiple indices to measure changes in quality of pink and coho salmon during fresh and frozen storage. NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-208, < www.nwfsc.noaa.gov>. Pristupljeno 29. srpnja 2014.
9. Botsoglou, E., Govaris, A., Ambrosiadis, I., Fletouris, D., Botsoglou, N. (2014): Effect of olive leaf (*Olea europea* L.) extracts on protein and lipid oxidation of long-term frozen n-3 fatty acids-enriched pork patties. Meat Science. 98, 150-157.
10. Bruni, M. (1993): Vitamin E and meat quality. CAB abstracts. Rivista di Avicoltura. 62, 15-19.
11. Buckley, D.J., Gray, J.I., Asghar, A., Booren, A.M., Crackel, R.L., Price, J.F., Miller, E.R. (1989): Effects of dietary antioxidants and oxidised oil on membranous lipid stability pork product quality. Journal of Food Science. 54, 1193-1197.

12. Calvelo, R. J. (1981). Recent studies on meat freezing. In R. Lawrie (Ed.), Developments in meat science—2 (pp. 125–158). London: Elsevier Applied Science Publishers.
13. Choe, J.-H., Jang, A., Lee, E.-S., Choi, J.-H., Choi, Y.-S., Han, D.-J., Kim, H.-Y., Lee, M.-A., Shim, S.-Y., Kim, C.-J. (2011): Oxidative and color stability of cooked ground pork containing lotus leaf (*Nelumbo nucifera*) and barley leaf (*Hordeum vulgare*) powder during refrigerated storage. Meat Science. 87, 12–18.
14. Dave, D., A. E. Ghaly (2011): Meat Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: A Critical Review. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 6, 486-510.
15. Delgado C. L., M. W. Rosegrant, S. Meijer (2001): Livestock to 2020: the revolution continues. Auckland, New Zealand: Intl. Trade Research Consortium (IATRC).
16. Dunshea, F.R. (1994): Nutrient requirements of pigs treated with metabolic modifiers. In Proceedings of the Nutrition Society of Australia, 18, 103-114 (Inaugural Nutrition Society of Australia research Award acceptance paper presented at the 18th Annual Nutrition Society of Australia meeting, Newcastle, 26-28 September 1994).
17. Einerson, M.A., Reineccius, G.A. (1977): Inhibition of warmed-over flavor in retorted turkey by antioxidants formed during processing. Journal of Food Processing and Preservation. 1, 279–291.
18. Enser, M., Hallett, K. Hewitt, B., Fursey, G. A. J., Wood, J.D. (1996): Fatty Acid Content and Composition of English Beef, Lamb and Pork at Retail. Meat Science. 42, 443-456.
19. Fernandes, R. (2009): Chilled and frozen raw meat, poultry and their products. <http://www.rsc.org/ebooks/archive/free/BK9781905224661/BK9781905224661-0001.pdf>.
20. Fernández, J., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J.A. (1997): Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. Food Chemistry. 59, 345-353.
21. Filgueras, R.S., Gatellier, P., Zambiasi, R.C., Santé-Lhoutellier, V. (2011): Effect of frozen storage duration and cooking on physical and oxidative changes in M. Gastrocnemius pars interna and M. Iliofibularis of rhea americana. Meat Science. 88, 645-651.
22. Gill, C. O. (2002): Microbial control with cold temperatures. U: V.K. Juneja & J.N. Sofos, Control of foodborne microorganisms. New York: Marcel Dekker, 55-74.
23. Gracey, J., D.S. Collins, R. Huey (1999): Meat hygiene. Tenth edition. W.B. Saunders Company Ltd.
24. Grau R., Hamm R. (1953.): Eine einfache Methode zur Bestimmung der Wasserbildung im Fleisch. Die Fleischwirtschaft. 4: 295-297.
25. Gray, J. I. (1978): Measurement of lipid oxidation. A review. Journal of the American Oil Chemists' Society. 55, 539–546.

26. Greer, G. G., A. C. Murray (1991): Freezing effects on quality, bacteriology and retail - case life of pork. *Journal of Food Science*. 56, 891–894.
27. Hadžiosmanović, M. (2005): Kakvoća i održivost smrznutog svinjskog mesa iz uvoza. *Meso*. VII, 4-5.
28. Hansen, E., Lauridsen, L., Skibsted, L.H., Moawad, R.K., Andersen, M.L. (2004): Oxidative stability of frozen pork patties: Effect of fluctuating temperature on lipid oxidation. *Meat Science*. 68. 185-191.
29. Hertzman, C., Goransson, L., Ruderus, H. (1988): Influence of fis-meal, rapeseed and rapeseed meal in feed on the fatty acid composition and storage stability of porcine body fat. *Meat Science*. 23, 37-53.
30. Hęś, M., Korczak, J., Gramza, A. (2007): Changes of lipid oxidation degrees and their influence on protein nutritive value of frozen meat products. *Polish journal of food and nutrition sciences*. 57, 323-328.
31. Honikel K.O. (1987): The water binding of meat. *Fleischwirtschaft*. 67(9): 1098-1102.
32. Huang, L., Xiong, Y. L., Kong, B., Huang, X., Li, J. (2013): Influence of storage temperature and duration on lipid and protein oxidation and flavour change sin frozen pork dumpling filler. *Meat Science*. 95, 295-301.
33. Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005): Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of post mortem biochemical and structural changes. *Meat Science*. 71, 194–204.
34. Jensen, C., Skibsted, L.H., Bertelsen, G. (1998): Oxidative stability of frozen-stored raw pork chops, chill-stored pre-frozen raw pork chops, and frozen-stored pre-cooked sausages in relation to dietary CuSO₄, rapeseed oil and vitamin E. *European Food Research and Technology*. 207, 363-368.
35. Kanner, J. (1994): Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. *Meat Science*. 36, 169-189.
36. Karolyi, D. (2004): Aktivitet vode (a_w) kao čimbenik održivosti mesa. *Meso*. VI, 9-18.
37. Kolsarici, N., Candoğan, K., Akoğlu, I.T. (2010) Effect of frozen storage on alterations in lipids of mechanically deboned chicken meats. *GIDA* 35 (6): 403-410.
- 38.** Kondratowicz, J., Chwastowska-Siwiecka, I., Burczyk, E. (2008): Technological properties of pork thawed in the atmospheric air or in the microwave oven as determined during a six-month deep-freeze storage. *Animal Science Papers and Reports*. 26(3), 175-181.
39. Kovačević, D. (2001) *Kemija i tehnologija mesa i ribe*. Prehrambeno tehnološki fakultet. Osijek: Grafika Osijek.

40. Ladikos, D., Lougovois, V. (1990): Lipid oxidation in muscle foods: A review. Food Chemistry. 35, 295–314.
41. Lagerstedt, A., Enfalt, L., Johansson, L., & Lundstrom, K. (2008): Effect of freezing on sensory quality, shear force and water loss in beef *M. longissimus dorsi*. Meat Science. 80, 457–461.
42. Lawrie, R. A. (1998): In Anonymous (Ed.), Lawrie's meat science (pp. 1–336). (6th ed.). Lancaster, PA: Technomic Publishing Inc.
43. Lawrie, R. A., D. A. Ledward (2006): Lawrie's Meat Science. Seventh English, edition ed. Cambridge England: Woodhead Publishing Limited.
44. Lee, M.-A., Choi, J.-H., Choi, Y.-S., Han, D.-J., Kim, H.-Y., Shim, S.-Y., Chung, H.-K., Kim, C.-J. (2010): The antioxidative properties of mustard leaf (*Brassica juncea*) kimchi extracts on refrigerated raw ground pork meat against lipid oxidation. Meat Science. 84, 498–504.
45. Leygonie, C., Britz, T. J., Hoffman, L. C. (2011): Oxidative stability of previously frozen ostrich *M. iliofibularis* packaged under different modified atmospheric conditions. International Journal of Food Science and Technology. 46, 1171–1178.
46. Leygonie, C., Britz, T.J., Hoffman, L.C. (2012): Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. Meat Science. 91, 93-98.
47. Lui, Z., Xiong, Y., Chen, J. (2010): Protein oxidation enhances hydration but suppresses water-holding capacity in Porcine Longissimus muscle. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58, 10697–10704.
48. Mărieș, F. M. (2010): Research concerning sensory and physicochemical changes of animal fats during storage. Summary of Ph.D. thesis. Faculty of Veterinary Medicine, Cluj-Napoca.
49. Mataragas M., P. N. Skandamis, E. H. Drosinos (2008): Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. International Journal of Food Microbiology. 126, 1–12.
50. Monahan, F.J., Gray, J.I., Asghar, A., Haug, A., Strasburg, G.M., Buckley, D.J., Morrissey, P.A. (1994): Influence of diet on lipid oxidation and membrane structure in porcine muscle microsomes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42, 59-63.
51. Mossel, D. A. A. (1982): Microbiology of Foods. The ecological essential of assurance and assessment of safety and quality. Third Edition. The University of Utrecht. Faculty of Veterinary Medicine.
52. Ngapo, T. M., Babare, I. H., Reynolds, J., Mawson, R. F. (1999): Freezing and thawing rate effects on drip loss from samples of pork. Meat Science. 53, 149–158.

53. Novelli, E., Zanardi, E., Ghiretti, G. P., Campanini, G., Dazzi, G., Madarena, G., Chizzolini, R. (1998): Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame Milano and Mortadella. *Meat Science*. 48, 29-40.
54. Perez-Chabela, M.L., J. Mateo-Oyague (2004): Frozen meat: Quality and shelf life. In: *Handbook of Frozen foods*. Hui, Y.H., P. Cornillon, I.G. Legaretta, M.H. Lim, K.D. Murrell. Kit Nip, W. (Eds.). Marcel Dekker Inc. NY, pp 205.
55. Pettersen, M.K., Mielnik, M.B., Eie, T., Skrede, G., Nilsson, A. (2004): Lipid oxidation in frozen, mechanically deboned turkey meat as affected by packaging parameters and storage conditions. *Poultry Science*. 83, 1240-1248.
56. Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Milić, D. (2011): Učinak subkronične primjene raktopamina na kemijski sastav i razine ostataka u svinjskom mesu. *Meso*. 8, 26-30.
57. Ponnompalam, E.N., Sinclair, A.J., Egan, A.R., Trout, G.R., Leury, B.J. (2001): Effect of dietary manipulation of long chain polyunsaturated fatty acids on the colour and oxidative stability of lamb muscle. *Meat Science*. 58(2), 151-161.
58. Pradhan, A. A., Rhee, K. S., Hernández, P. (2000): Stability of catalase and its potential role in lipid oxidation in meat. *Meat Science*. 54, 385-390.
59. Rahman, S.F. (1999): Food preservation by freezing. In: *Handbook of food preservation*. Rahman. S.F. (Ed). Marcel Dekker, NY, pp: 259, 262, 268. cit. Dave i Ghaly, 2011.
60. Rasmussen A.J. & Andersson M. (1996) New method for determination of drip loss in pork muscles. *Proc. 42nd Int. Congr. Meat Sci. and Tech.*, Lillehammer, Norway.
61. Reig, M., Aristoy M.C., Toldra, F. (2013): Variability in the contents of pork meat nutrients and how it may affect food composition databases. *Food Chemistry*. 140, 478-482.
62. Renner, M. (1990). Factors involved in the discolouration of beef meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 25, 613–630.
63. Senčić, Đ., Samac, D., Antunović, Z. (2011): Utjecaj proizvodnog sustava na fizikalno - kemijska i senzorska svojstva mesa crnih slavonskih svinja. *Meso*. 8, 32-35.
64. Shahidi, F. (1992): Prevention of lipid oxidation in muscle foods by nitrite and nitrite-free compositions. In A.J. St Angelo (Ed.), *Lipid oxidation in food*. American Chemical Society Symposium Series, 500. Washington, DC: American Chemical Society.
65. Sinclair, A.J., Barone, S., Stobaus, T., Tume, R., Beilken, S., Müller, W., Cunningham, J., Barnes, J.A., Greenfield, H. (2010): Lipid composition of Australian pork cuts 2005/2006. *Food Chemistry*. 121, 672-681.

66. Soyer, A., Özalp, B., Dalmuş, Ü., Bilgin, V. (2010): Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat. *Food Chem.* 120, 1025-1030.
67. Sučić, R., Ž. Cvrtila, B. Njari, L. Kozačinski (2010): Senzorne, kemijske i mikrobiološke promjene u smrznutom mesu peradi. *Meso XII*, 342-351.
68. Varnam, A. H., J. P. Sutherland (1995): *Meat and Meat Products. Technology, Chemistry and Microbiology.* Chapman & Hall, London, UK.
69. Vieira, C., Diaz, M. Y., Martínez, B., García-Cachán, M. D. (2009): Effect of frozen storage conditions (temperature and length of storage) on microbial and sensory quality of rustic crossbred beef at different stages of aging. *Meat Science.* 83, 398–404.
70. Wong T.L., G. V. Carey-Smith, L. Hollis, J. A. Hudson (2005): Microbiological survey of prepackaged pâté and ham in New Zealand. *Letters in Applied Microbiology.* 41, 106–11.
71. Zhou, G.H. X.L. Xu, Y. Liu (2010): Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science.* 86, 119–128.

DODATAK 1.

Popis masnih kiselina koje su analizirane u ovoj studiji:

C10:0 KAPRINSKA KISELINA
C12:0 LAURINSKA KISELINA
C14:0 MIRISTINSKA KISELINA
C15:0 PENTADEKANSKA KISELINA
C16:0 PALMITINSKA KISELINA
C16:1 CIS PALMITOLEINSKA KISELINA
C17:0 HEPTADEKANSKA KISELINA
C17:1 HEPTADECENSKA KISELINA
C18:0 STEARINSKA KISELINA
C18:1 OLEINSKA KISELINA
C18:2 LINOLNA KISELINA
C18:3 LINOLENSKA KISELINA
C20:0 ARAHIDSKA KISELINA
C20:1 EIKOZENSKA KISELINA

Tablica 11 Sastav masnih kiselina u uzorcima karea tijekom uskladištenja svinjskog mesa u zamrznutom stanju

KARE																
		Masna kiselina (izražena kao % ukupnih m. k.)														
		C 10:0	C 12:0	C 14:0	C 15:0	C 16:0	C 16:1	C 17:0	C 17:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 20:1	n.i.
0 mjeseci	X	0,11	0,10	1,50	0,04	24,58	2,08	0,39	0,29	12,26	41,10	15,00	0,53	0,27	0,55	1,19
	SD	0,07	0,04	0,54	0,05	5,70	0,92	0,17	0,13	3,00	3,77	14,02	0,15	0,09	0,29	0,43
12 mjeseci	X	0,15	0,14	1,85	0,01	28,86	2,96	0,39	0,36	12,99	40,26	10,10	0,56	0,21	0,51	0,65
	SD	0,06	0,02	0,48	0,02	1,76	0,29	0,05	0,06	0,99	1,15	2,18	0,16	0,06	0,08	0,07
18 mjeseci	X	0,08	0,17	2,22	0,04	30,12	2,63	0,44	0,34	13,04	39,07	10,06	0,55	0,21	0,42	0,62
	SD	0,09	0,05	0,12	0,05	1,15	0,27	0,07	0,05	1,21	1,07	0,94	0,07	0,08	0,13	0,14

Tablica 12 Sastav masnih kiselina u uzorcima buta tijekom uskladištenja svinjskog mesa u zamrznutom stanju

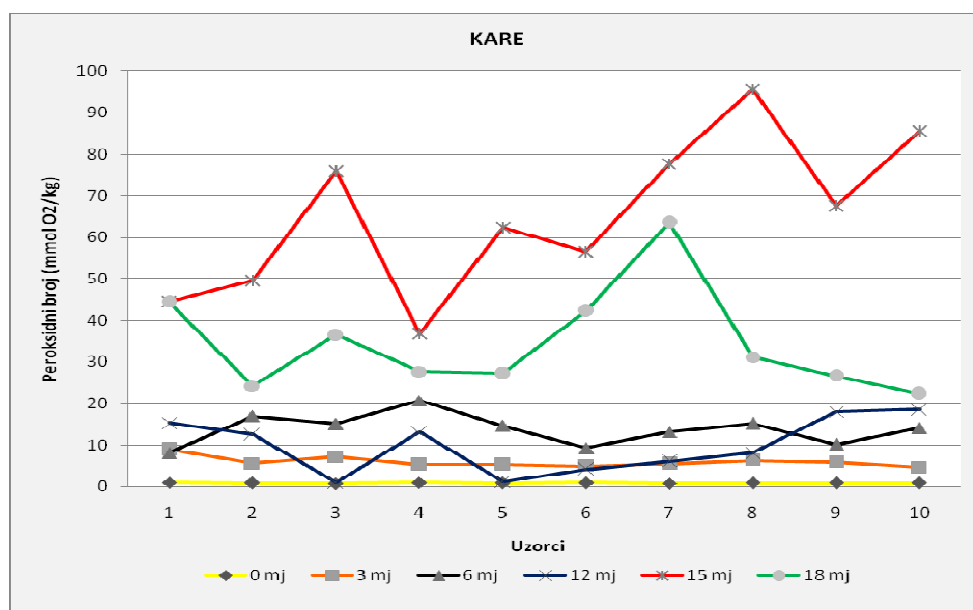
BUT																
		Masna kiselina (izražena kao % ukupnih m. k.)														
		C 10:0	C12:0	C 14:0	C 15:0	C 16:0	C 16:1	C 17:0	C 17:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 20:1	n.i.
0 mjeseci	X	0,12	0,10	1,48	0,03	25,31	2,82	0,41	0,34	12,35	44,19	9,76	0,54	0,26	0,69	1,61
	SD	0,04	0,03	0,46	0,03	1,09	0,52	0,07	0,05	1,26	1,83	1,23	0,14	0,08	0,16	0,50
12 mjeseci	X	0,17	0,14	1,90	0,03	26,84	3,04	0,42	0,39	11,63	43,71	9,78	0,54	0,39	0,44	0,58
	SD	0,02	0,01	0,12	0,05	0,72	0,35	0,10	0,11	0,50	1,66	1,88	0,15	0,21	0,17	0,14
18 mjeseci	X	0,17	0,35	2,15	0,07	25,64	3,46	0,44	0,40	11,54	44,32	9,70	0,48	0,38	0,27	0,62
	SD	0,10	0,40	0,60	0,05	7,87	0,52	0,07	0,05	1,19	5,00	1,30	0,10	0,16	0,17	0,10

Tablica 13 Sastav masnih kiselina u uzorcima slanine tijekom uskladištenja svinjskog mesa u zamrznutom stanju

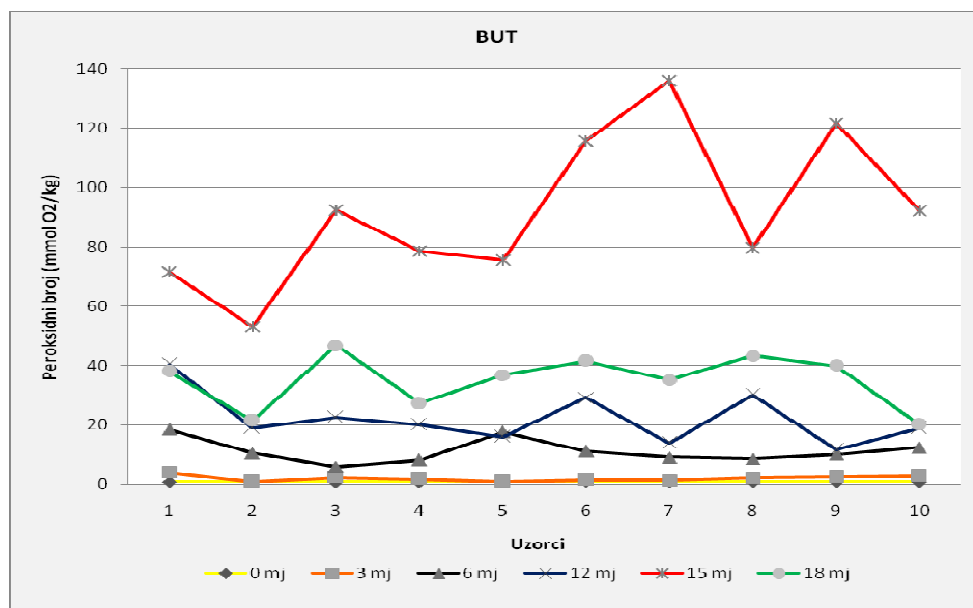
SLANINA																
		Masna kiselina (izražena kao % ukupnih m. k.)														
		C 10:0	C12:0	C 14:0	C 15:0	C 16:0	C 16:1	C 17:0	C 17:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 20:1	n.i.
0 mjeseci	X	0,08	0,09	1,49	0,08	24,83	2,19	0,41	0,33	13,00	41,07	13,28	0,85	0,29	0,71	1,30
	SD	0,03	0,01	0,14	0,08	1,24	0,20	0,05	0,05	0,34	1,27	1,12	0,08	0,03	0,09	0,11
12 mjeseci	X	0,10	0,14	2,08	0,07	29,79	2,57	0,45	0,35	12,80	39,51	10,41	0,45	0,29	0,46	0,52
	SD	0,07	0,02	0,22	0,03	1,62	0,32	0,02	0,05	1,30	1,32	1,49	0,25	0,20	0,19	0,21
18 mjeseci	X	0,05	0,19	3,22	0,04	28,51	2,39	0,46	0,38	12,27	39,97	10,32	0,51	0,21	0,35	1,13
	SD	0,11	0,08	0,87	0,05	3,25	0,59	0,08	0,05	0,84	3,21	0,92	0,10	0,14	0,18	0,69

DODATAK 2.

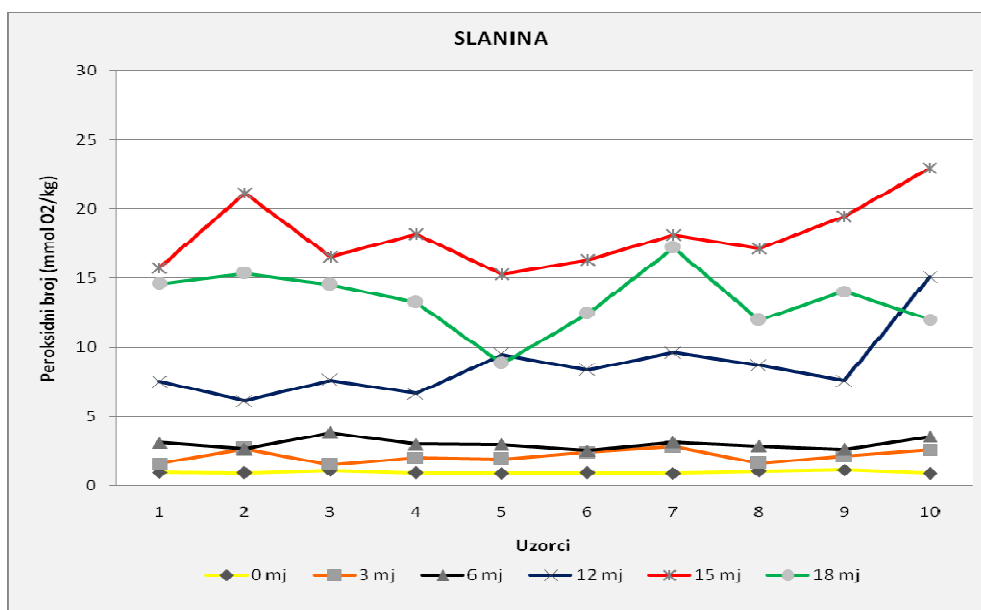
Određene vrijednosti peroksidnog broja (mmol O₂/kg) u uzorcima zamrznutog svinjskog mesa, po kategorijama mesa (kare, but i slanina) i mjesecima uskladištenja (svježe meso, tri, šest, dvanaest, petnaest, osamnaest mjeseci), prikazani su na slikama 18, 19 i 20. Svaki uzorak oznake 1-10 predstavlja srednju vrijednost peroksidnog broja dvaju analiziranih uzoraka unutar pojedine kategorije mesa (ukupno 20 uzoraka po kategoriji).



Slika 18 Promjena peroksidnog broja u uzorcima karea tijekom uskladištenja svinjskog mesa u zamrznutom stanju



Slika 19 Promjena peroksidnog broja u uzorcima buta tijekom uskladištenja svinjskog mesa u zamrznutom stanju



Slika 20 Promjena peroksidnog broja u uzorcima slanine tijekom uskladištenja svinjskog mesa u zamrznutom stanju