

Nutritivne karakteristike kamenice (*Ostrea edulis*) nakon primjene individualnog brzog zamrzavanja (IQF) pri različitim periodima i temperaturama skladištenja

Balenović, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:162:083287>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Sveučilište u Zadru
Universitas Studiorum
Jadertina | 1396 | 2002 |

Repository / Repozitorij:

[University of Zadar Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



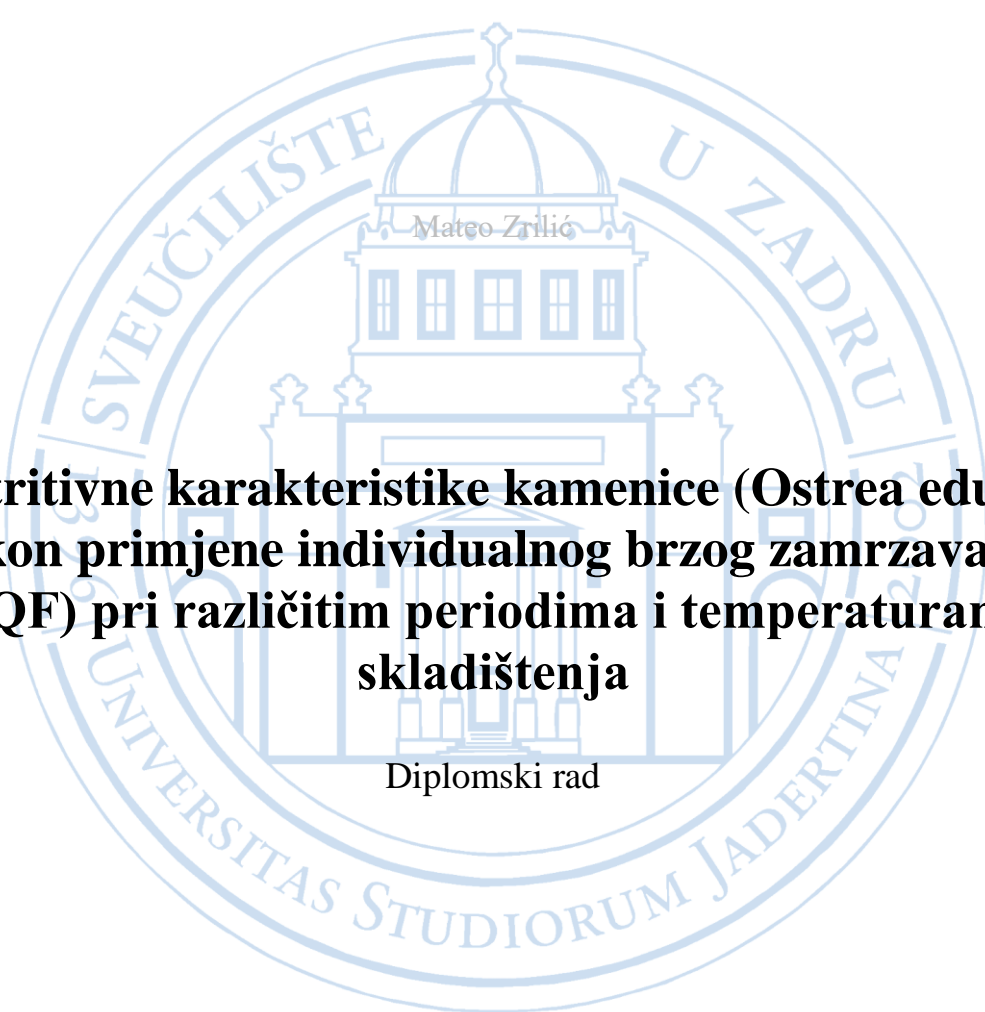
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Sveučilište u Zadru

Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu

Sveučilišni diplomski studij

Održivo upravljanje vodenim ekosustavima



**Nutritivne karakteristike kamenice (*Ostrea edulis*)
nakon primjene individualnog brzog zamrzavanja
(IQF) pri različitim periodima i temperaturama
skladištenja**

Diplomski rad

Zadar, 2024.

Sveučilište u Zadru

Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu

Sveučilišni diplomski studij

Održivo upravljanje vodenim ekosustavima

Nutritivne karakteristike kamenice (*Ostrea edulis*) nakon primjene individualnog brzog zamrzavanja (IQF) pri različitim periodima i temperaturama skladištenja

Diplomski rad

Student/ica:

Matea Balenović

Mentor/ica:

Izv. prof. dr. sc. Ivan Župan

Komentor/ica:

Izv. prof. dr. sc. Tomislav Šarić

Zadar, 2024.



Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, Matea Balenović, ovime izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom Nutritivne karakteristike kamenice (*Ostrea edulis*) nakon primjene individualnog brzog zamrzavanja (IQF) pri različitim periodima i temperaturama skladištenja rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio mojega rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši bilo čija autorska prava.

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

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

Zadar, 12. veljače 2024.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Biologija, ekologija i rasprostranjenost kamenice	2
2.2. Zdravstvena ispravnost kamenica	4
2.3. Tehnologije uzgoja kamenica	7
2.4. Klasifikacija kamenica	8
2.5. Nutritivni sastav i promjene prilikom zamrzavanja u kamenica te ostalih školjkaša	10
2.6. Dosadašnja istraživanja kemijskog sastava školjkaša	12
3. CILJ I SVRHA RADA	15
4. MATERIJALI I METODE	16
4.1. Određivanje ukupnog hlapivog baznog dušika (TVB-N)	17
4.2. Određivanje pH vrijednosti	18
4.3. Određivanje stupnja oksidacije masti (TBA test)	18
4.4. Određivanje sastava masnih kiselina	19
4.5. Određivanja indeksa kondicije	20
4.6. Određivanja udjela proteina po KJELDAHL-u	21
4.7. Određivanje udjela vode	22
4.8. Određivanje količine mineralnih tvari (pepela)	23
4.9. Određivanje ukupnog udjela masti	24
5. REZULTATI	26
5.1. Ukupni hlapivi bazni dušik (TVB-N)	26
5.2. pH	27
5.3. Stupanj oksidacije masti (TBA)	28
5.4. Masne kiseline	28
5.5. Indeks kondicije	31
5.6. Proteini, voda, pepeo i masti	32
6. RASPRAVA	34
7. ZAKLJUČAK	38
8. POPIS LITERATURE	40

Nutritivne karakteristike kamenice (*Ostrea edulis*) nakon primjene individualnog brzog zamrzavanja (IQF) pri različitim periodima i temperaturama skladištenja

Europska kamenica (*Ostrea edulis*) jedna je od najznačajnijih komercijalnih vrsta školjkaša na Jadranu. Uzgoj školjkaša predstavlja najraniji oblik marikulture, a gotovo tisućljeće naša se zemlja oslanjala na tradicionalne metode uzgoja kamenica. Jedan od razloga uzgoja je vrlo visoka nutritivna vrijednost ove vrste školjkaša te povoljan omjer masnih kiselina i nutrijenata ključnih za čovjekovo zdravlje. Kako bi se provela procjena kemijskog sastava te sastava masnih kiselina uzorkovani su školjkaši sa područja Malostonskog zaljeva te sa ušća rijeke Krke, zamrznuti na temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ te skladišteni na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega su provedene analize tijekom 3 mjeseca. Cilj je bio utvrditi kemijske promjene nastale uslijed konzerviranja zamrzavanjem kako bi se dobiveni podaci iskoristili za unaprjeđenje proizvodnje i plasmana kamenica te naposljetku zdravstvenu ispravnost kamenica za tržište nakon različitih perioda i temperatura skladištenja. Dobiveni rezultati su pokazali da ne postoje značajne razlike u povećanju ukupnog hlapivog baznog dušika (TVB-N) s obzirom na različite temperature zamrzavanja ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), a proizlazi da je pH vrijednost kamenica lagano porasla tijekom skladištenja, s tim da je malo veći porast bio nakon prvih mjesec dana čuvanja s obzirom da su pH vrijednosti porasle u rasponu od 0,2 do 0,4. Rezultati TBA testa određivanja stupnja oksidacije masti su pokazali da je vrijednost rasla pri obje temperature skladištenja, s tim da je ukupni porast bio manji tijekom skladištenja kod temperature od $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analizom masnih kiselina u svim uzorcima primjenom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom (GC FID) identificirano je 14 različitih masnih kiselina, od kojih je 6 zasićenih, 6 polinezasićenih i 2 mononezasićene masne kiseline. I kod kamenica iz Malostonskog zaljeva i kod kamenica s ušća rijeke Krke, u travnju kao i u svibnju i srpnju nakon skladištenja pri temperaturama od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, najzastupljenije su polinezasićene masne kiseline (PUFA), potom zasićene masne kiseline (SFA) i sa najmanjim udjelom mononezasićene masne kiseline (MUFA). Palmitinska (C16:0) i stearinska (C18:0) su najzastupljenije zasićene masne kiseline, od polinezasićenih su najzastupljenije dokosaheksaenoična kiselina (C22:6n3, DHA) i eikosapentaenoična kiselina (C20:5n3, EPA), a od mononezasićenih, oleinska kiselina (C18:1 *cis*). Udjeli zasićenih masnih kiselina su kod obje vrste kamenica u većini slučajeva tijekom skladištenja neznatno rasli ili imali vrijednosti približne onim početnima pri obje temperature skladištenja. Kod obje vrste kamenica i pri obje temperature skladištenja ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$) udjeli

polinezasićene linolne masne kiseline (C18:2 *cis*) su se smanjivali, dok su udjeli linolenske (C18:3n3) i dokoziadienske kiseline (C22:2) tijekom skladištenja rasli. Do najveće promjene u udjelima polinezasićenih masnih kiselina došlo je smanjivanjem udjela linolne kiseline u stonskim kamenicama pri obje temperature, a najveće smanjenje dogodilo se tijekom prvog mjeseca skladištenja. Kod mononezasićenih masnih kiselina rasli su udjeli palmitoleinske kiseline (C16:1) a smanjivali se udjeli oleinske kiseline i kod stonskih i kod kamenica iz Krke pri obje temperature skladištenja.

Udio vode u kamenicama sa ušća rijeke Krke se smanjio za manje od 2 %, dok je smanjenje udjela vode kod stonskih kamenica bilo manje od 1 %. Povećanja udjela proteina, masti i pepela su također bila minimalna, odnosno udio proteina je porastao za manje od 2 %, udio masti za manje od 1 % i udio pepela za manje od 0,3 % kod kamenica s obje lokacije, pri obje temperature skladištenja (-18 °C i -60 °C).

Ključne riječi: *Ostrea edulis*, kemijski sastav, zamrzavanje, masne kiseline

Nutritional characteristics of oysters (*Ostrea edulis*) after application of individual quick freezing (IQF) at different storage periods and temperatures

The European flat oyster (*Ostrea edulis*) is one of the most significant commercial shellfish species in the Adriatic Sea. Shellfish farming represents the earliest form of mariculture, and for almost a millennium, our country has relied on traditional methods of cultivating flat oysters. One of the reasons for farming is the very high nutritional value of this shellfish species, as well as the favorable ratio of fatty acids and nutrients crucial for human health. In order to carry out an assessment of the chemical composition and fatty acid composition, shellfish samples from the Malostonski Bay area and the mouth of the Krka River were sampled, frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, and stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, after which analyses were conducted over a period of 3 months. The aim was to determine the chemical changes resulting from preservation by freezing, in order to use the obtained data to improve the production and placement of flat oysters and ultimately the health safety of flat oysters for the market after different periods and temperatures of storage. The results showed that there were no significant differences in the increase of total volatile basic nitrogen (TVB-N) concerning the different freezing temperatures ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), and it appears that the pH value of the oysters slightly increased during storage, with a slightly greater increase occurring after the first month of storage as pH values increased by 0,2 to 0,4. The results of the TBA test for determining the degree of fat oxidation showed that the value increased at both storage temperatures, with the overall increase being smaller during storage at $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analysis of fatty acids in all samples using gas chromatography with flame-ionization detector (GC FID) identified 14 different fatty acids, including 6 saturated, 6 polyunsaturated, and 2 monounsaturated fatty acids. In both the flat oysters from Malostonski Bay and the flat oysters from the mouth of the Krka River, in April as well as in May and July, after storage at temperatures of $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, polyunsaturated fatty acids (PUFA) were the most abundant, followed by saturated fatty acids (SFA) and with the lowest proportion being monounsaturated fatty acids (MUFA). Palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0) were the most abundant saturated fatty acids, while the most abundant polyunsaturated fatty acids were docosahexaenoic acid (C22:6n3, DHA) and eicosapentaenoic acid (C20:5n3, EPA), and from monounsaturated, oleic acid (C18:1 *cis*). The proportions of saturated fatty acids in both types of flat oysters mostly slightly increased during storage or had values close to the initial ones at both storage temperatures. In both types of flat oysters and at both storage temperatures ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$), the proportions of polyunsaturated linoleic acid (C18:2 *cis*) decreased, while

the proportions of linolenic (C18:3n3) and docosadienoic acid (C22:2) increased during storage. The greatest change in the proportions of polyunsaturated fatty acids occurred with the decrease in the proportion of linoleic acid in flat oysters at both temperatures, with the greatest decrease occurring during the first month of storage. The proportions of palmitoleic acid (C16:1) increased for monounsaturated fatty acids, while the proportions of oleic acid decreased in both flat oysters and oysters from the Krka River mouth at both storage temperatures. The water content in flat oysters from the Krka River mouth decreased by less than 2 %, while the decrease in water content in flat oysters was less than 1 %. Increases in protein, fat, and ash content were also minimal, with protein content increasing by less than 2 %, fat content by less than 1 %, and ash content by less than 0,3 % in flat oysters from both locations at both storage temperatures (-18 °C and -60 °C).

Keywords: *Ostrea edulis*, chemical composition, freezing, fatty acids

Zahvale

Srdačno se zahvaljujem svome mentoru izv. prof. dr. sc. Ivanu Županu, komentoru izv. prof. dr. sc. Tomislavu Šariću i doc. dr. sc. Tiboru Janči na konstruktivnim savjetima i podršci tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala svim članovima tvrtke MARIKOMERC d.o.o. koji su svojim znanjem, vještinama i opremom sudjelovali u IQF tehnologiji zamrzavanja (zasebno brzo zamrzavanje) kamenica.

Naposlijetku se posebno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci, ohrabivanju te vjeri tijekom studiranja.

1. UVOD

Marikultura je grana akvakulture usmjerena na kontrolirani uzgoj u morskoj i/ili bočatoj vodi. U Republici Hrvatskoj marikultura obuhvaća uzgoj školjkaša te plave i bijele ribe (Banovac, 2023). Godine 2012., u morskoj akvakulturi Republike Hrvatske, evidentirano je 147 uzgajivača (koncesija), od kojih je 118 predstavljalo uzgajivače školjkaša. Pet godina kasnije, 2017. godine, taj broj je porastao na 191 uzgajivača u sedam županija (Istarska, Primorsko-goranska, Ličko-senjska, Zadarska, Šibensko-kninska, Splitsko-dalmatinska i Dubrovačko-neretvanska) od kojih je 126 bilo usmjereno isključivo na uzgoj školjkaša (https://ribarstvo.mps.hr/UserDocsImages/NSP/NSP_OP_06112013/Nacionalni%20strate%C5%A1ki%20plan%20razvoja%20ribarstva%20Republike%20Hrvatske.pdf).

U istočnom Jadranu obitava otprilike 200 različitih vrsta školjkaša. Lokalno stanovništvo koje nastanjuje hrvatski dio Jadranskog mora konzumira čak 66 od tih vrsta školjkaša u svojoj svakodnevnoj prehrani. Nadalje, od tih vrsta, njih 16 se komercijalno nudi na tržištima. Najčešće korištene vrste dobivene iz prirodnih staništa uključuju: *Mytilus galloprovincialis* (dagnja), *O. edulis* (kamenica), *Pecten jacobaeus* (jakovljeva kapica), *Arca noae* (kunjka) te *Venus verrucosa* (prnjavica) (<https://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=10254>).

Prema statistikama FAO-a, Hrvatska prvenstveno uzgaja dvije vrste školjkaša: dagnju i kamenicu (<https://faolex.fao.org/docs/pdf/cro158202.pdf>). Jadransko more karakterizira oligotrofni status te pripada kategoriji umjereno toplih mora. Temperature su stabilne, s prosječnim vrijednostima zimi između 10 i 13 °C, dok ljeti dosežu od 22 do 26 °C. Vjetrovi su obično umjereni. Općenito, meteorološki, klimatološki te hidrološki uvjeti povoljni su za uzgoj ovih vrsta školjkaša (prozirnosti vode, boja, strujanja, valovi, salinitet) (Šarušić, 2000).

Trenutno se najveći uzgoj školjkaša u Hrvatskoj nalazi u Malostonskom zaljevu, Limskom kanalu i ušću rijeke Krke u Šibeniku. Zbog svoje iznimne kvalitete i vrijednosti, mediteranske dagnje i kamenice imaju veliki značaj kako za lokalno stanovništvo tako i za turističku privredu u Hrvatskoj (<https://www.europarl.europa.eu/factsheets/hr/sheet/120/akvakulturna-proizvodnja-u-europskoj-uniji>). Kao rezultat visoke kvalitete uzgoja, stonska kamenica je na Svjetskoj izložbi u Londonu 1936. godine nagrađena zlatnom medaljom za kvalitetu (Tomšić i Lovrić, 2004).

2.PREGLED LITERATURE

2.1.Biologija, ekologija i rasprostranjenost kamenice

Kamenica je školjkaš duguljastog oblika i naborane ljušture. Donja ljuska je zakrivljena dok je gornja ljuska ravna. Boja ljuske kreće se od bijele do žute, sa svijetlosmeđim ili plavim koncentričnim linijama na ravnoj ljusci. Formirana je od karbonatnih slojeva koji mogu biti čvrsti ili šuplji s komorama. Zakrivljena ljuska obuhvaća meso koje može varirati od blijedosive do krem boje. Prirodno stanište joj je na stjenovitim infralitoralnim podlogama, ali najzastupljenija je u zoni plime i oseke, dok se njezine ličinke veligera nalaze u cijelom vodenom stupcu. Također može živjeti u područjima s bočatom vodom i može podnijeti niže razine slanosti bez ikakvih poremećaja homeostaze (Héral i Deslous-Paoli, 1991).

Kamenica se hrani neselektivnim procesom filtriranja, gdje zadržava fitoplankton i druge sitne čestice iz morske vode. Nadalje, klasificira se kao proteandrični hermafrodit, budući da sadrži i muške i ženske spolne stanice. Međutim, samooplodnja je rijetka pojava zbog razlike u vremenu sazrijevanja stanica. Kamenice se razmnožavaju u svibnju i rujnu (Zelić, 2015). Proces oplodnje kod vrste *O. edulis* je unutarnji, a embriogeneza počinje u šupljini plašta. Nakon oplodnje, jajašca ostaju u šupljini plašta 8 do 10 dana, ovisno o temperaturi. Nakon sazrijevanja, ličinke preveligera ispuštaju se iz šupljine plašta i žive planktonskim životom do dva tjedna, ovisno o prevladavajućoj temperaturi (Yonge, 1926). Na kraju, ličinke kroz aktivnu cementnu žlijezdu nakratko ispuštaju vapnenastu sluz, što im omogućuje da se povežu sa supstratom i započnu svoj ciklus rasta (Segarić, 2020).



Slika 1. Europska plosnata kamenica (*O. edulis*)

(Izvor: autor)

Pretežno se hrane planktonom, a nametnici planarije su im glavni neprijatelji, uzrokujući značajne štete na uzgajalištima. Europska kamenica koja se uzgaja u Hrvatskoj gotovo je izumrla iz Europe zbog bolesti uzrokovane parazitom *Bonamia ostreae* početkom prošlog stoljeća (<https://www.vliz.be/niet-inheemse-soorten/en/bonamia-ostreae>). No, europska kamenica (slika 1) još uvijek se može pronaći u istočnom Atlantiku, Sredozemlju, Jadranskom i Crnom moru. Linski kanal, Pulski i Malostonski zaljev, zaljev Klimno (Krk) i Pirovački zaljev su među najvećim uzgajalištima u Hrvatskoj, gdje raste i divlja kamenica (Stagličić i sur., 2020).

Obitava češće u obalnim vodama koje nisu dublje od 10 metara. Mjesta njezina obitavanja zahtijevaju zaštitu od jakih udara valova i vjetra, a za preživljavanje joj je potrebna stalna opskrba svježom vodom i blagim, postojanim strujanjem. Idealni životni uvjeti uključuju postotak slanosti između 25-35 ‰ i temperaturni raspon od 2-22 °C. Zauzimanjem takvog okoliša dobiva pristup solima bogatim hranjivim tvarima i fitoplanktonu koji su ključni za njen opstanak (Skaramuca i sur., 1997).

2.2. Zdravstvena ispravnost kamenica

Kontaminacija morskog okoliša ima sve veći utjecaj na sigurnost i kvalitetu morskih plodova. Svijest o mogućim bolestima i opasnostima koje mogu proizaći iz konzumiranja morskih proizvoda potaknula je uspostavljanje novih standarda u proizvodnji, preradi i pakiranju (Labudović, 2023). Održavanje sigurnosti i kvalitete hrane glavni je prioritet i za proizvođače i za potrošače, što je dovelo do stvaranja upravnih tijela, a jedan od najvažnijih je upravo WHO (eng. World Health Organization) – Svjetska zdravstvena organizacija zadužena za reguliranje i procjenu pojedinačnih prehrambenih proizvoda. S obzirom da školjkaši filtriraju vodu u kojoj žive, skupljaju i akumuliraju patogene uzročnike i/ili otrovne tvari u svoja tkiva, a kontaminacija se može dogoditi tijekom skupljanja, pročišćavanja, transporta i obrade, no najčešći slučajevi kontaminacije događaju se tijekom uzgoja u vodi zagađenoj fekalnim onečišćenjima. Zdravstvena ispravnost kamenica te odluka o stavljanju na tržište proizlazi sukladno o rezultatima analize tkiva (Pećarević i Bratoš, 2004).

Zdravstvenu ispravnost školjkaša najčešće ugrožavaju virusi i bakterije. Osim toga, postoje razne kemijske tvari koje mogu negativno utjecati na ljudsko zdravlje. To uključuje prirodne toksine proizvedene cvjetanjem fitoplanktona, koji mogu uzrokovati različite vrste trovanja školjkaša kao što su paralitička, dijaretička i amnestička trovanja te teški metali poput kadmija, olova i žive. Kamenice se često konzumiraju sirove ili lagano kuhane s cijelim probavnim sustavom, a ovi načini nisu dovoljni da bi se inaktivirala većina mikroorganizama. Rizik od štetnih učinaka na zdravlje potrošača određen je brojnim čimbenicima, uključujući vrstu patogena, razinu kontaminacije te vrijeme proteklo od kontaminacije do sakupljanja školjkaša (Frazier i George, 1983).

Područja uzgoja školjkaša u Europi kategorizirana su u dvije zone: A i B. Područja koja se smatraju neprikladnima za uzgoj zbog velikog broja mikroorganizama svrstana su u kategoriju C-zone. Zona A pridržava se strogih higijenskih i sanitarnih standarda kako bi se osiguralo da su mikrobiološki i kemijski uvjeti zadovoljeni. Ta se područja smatraju potpuno prikladnima za uzgoj školjkaša i plasiraju se na tržište ili izravno ili preko centara za otpremu. Područja u zoni B sadrže više mikroorganizama i kemikalija nego što dopušta Direktiva 91/492/EE (<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=CELEX%3A31991L0492>).

Školjkaši iz zone B prije plasiranja na tržište moraju proći proces ponovnog polaganja. Taj proces obuhvaća prijenos živih školjkaša u odobreno područje kako bi se postupkom prirodnog pročišćavanja smanjila koncentracija nedozvoljenih tvari (Zelić, 2015). Živi školjkaši imaju definirane mikrobiološke standarde temeljene na klasifikaciji uzgojnih područja (tablica 1) prema Direktivi 91/492/EEC (Pećarević i Bratoš, 2004).

Tablica 1. Klasifikacija uzgojnih područja prema maksimalnoj dopuštenoj količini mikroorganizama

(Izvor: Pećarević i Bratoš, 2004)

Mikroorganizam	MAKS. KOLIČINA	PODRUČJE	MJERE
<i>Salmonella</i> spp.	0/25g	A	
Fekalni koliformi	<300/100 g	A	
	<60000/100 g	B	PURIFIKACIJA
	<60000/100 g	C	PREMJEŠTANJE (DUGOTRAJNO) ILI INTENZIVNA PURIFIKACIJA
<i>Escherichia coli</i>	< 230/100 g	A	
	< 4600/100 g	B	PURIFIKACIJA

Uprava za veterinarstvo Ministarstva poljoprivrede propisuje godišnji Plan praćenja kvalitete poznatih uzgajališta školjkaša u Limskom kanalu, ušću rijeke Krke, Malostonskom zaljevu, Vabrigi i Novigradskom moru, Piranskom zaljevu, Raškom zaljevu, Pašmanskome kanalu, Pirovačkom zaljevu i Kanalu sv. Ante u Šibeniku. Ovaj plan izrađen je prema Pravilniku o veterinarsko-zdravstvenim uvjetima za ulov, uzgoj, pročišćavanje i stavljanje u promet živih školjkaša, a uključuje analizu mikrobiološke kakvoće morske vode i mesa školjkaša, kao i otkrivanje biotoksina i koncentracije kemijskih spojeva u tkivu. Dodatno se prati prisutnost toksičnih fitoplanktonskih vrsta u području uzgoja (<https://ribarstvo.mps.hr/default.aspx?id=228>).

Školjkaši koji su neprikladni za javnu potrošnju zbog neadekvatnih sanitarnih uvjeta uključuju:

1. školjkaše koji su uginuli, na što ukazuju njihove otvorene ljuske koje se ne zatvaraju čvrsto na dodir;
2. školjkaše koje dolaze iz onečišćenih i zagađenih voda;
3. školjkaše koje imaju izrazit miris te nisu dobro očišćene od obraštaja;
4. školjkaše koje sadrže biotoksine nastale iz morskih algi;
5. školjkaše koje nisu u skladu sa odredbama Pravilnika o uvjetima vezanih za mikrobiološke uvjete;
6. školjkaše koje nisu u skladu sa odredbama Pravilnika o dozvoljenim količinama pesticida, hormona, antibiotika i mikotoksina;
7. školjkaše koje sadrže nedopustive količine radionuklida (Mašić, 2004).

Kako bi se osigurala dugotrajnost školjkaša koji čekaju otpremu nakon uklanjanja s uređaja za uzgoj, treba ih držati u čistoj, higijenski ispravnoj morskoj vodi. Bolesni školjkaši obično rezultiraju bezukusnim mesom koje je nemasno i sluzavo zbog nedostatka zaliha glikogena, te se takvi školjkaši odbacuju (Mašić, 2004). Kvarenje kamenica na nižim temperaturama skladištenja uzrokuju bakterije *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, a na višim *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Bacillus*. Kvarenje nastaje uslijed proteolitičkih i saharolitičkih procesa. Prilikom transporta na velike udaljenosti ključno je održavati određeni raspon relativne vlažnosti i temperature, a istovremeno izbjegavati izravno izlaganje sunčevoj svjetlosti. Školjkaše nije moguće transportirati u standardnim hladnjacima ili na ledu jer bi temperature ispod 0 °C dovele do njihovog uginuća. Optimalna temperatura za skladištenje i transport školjkaša je između +6 °C do +10 °C (Pušić, 1962).

Sirova morska hrana glavni je krivac za više od polovice slučajeva trovanja hranom u Japanu. Slučajevi trovanja kamenicama su sve češći budući da se upravo meso kamenica konzumira sirovo ili uz minimalnu termičku obradu (Zrnčić i sur., 2001). Meso školjkaša najčešće je zaraženo sojevima bakterija kao što su *Clostridium botulinum* tip E i F, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Proteus* spp i *Clostridium perfringens*. Prema istraživanju koje su proveli Živković i Hađiosmanović (1996) bakterije iz soja *V. parahaemolyticus* otkrivene su i diljem Jadrana.

U školjkašima se osim virusa i bakterija mogu pronaći i fiziološki toksini. Mikotoksini su otrovi koje proizvode plijesni. Mogu uzrokovati bolesti i kod ljudi jer u organizam ulaze putem

konzumacije kontaminirane hrane, a bolesti koje izazivaju nazivaju se mikotoksikoze. Školjkaši akumuliraju ove mikotoksine u svoja tkiva, a ključno je naglasiti da su ovi toksini termostabilni odnosno otporni su na visoke temperature (Skitarelić, 2020).

2.3. Tehnologije uzgoja kamenica

U kamenica se oplodnja odvija u plaštanoj šupljini, pokrećući embrionalni razvoj koji traje sedam dana. Tijekom tog vremena, ličinke dostižu veličinu od 160 do 200 μm . Nakon što se oslobode iz plaštane šupljine, ličinke započinju planktonsku fazu. U planktonskom obliku ličinke se slobodno kreću 2 tjedna. Nakon završetka planktonske faze života, ličinke kamenica se prihvaćaju na čvrste podloge. U uzgoju, za prihvatanje ličinki koriste se specijalizirane strukture poznate kao kolektori (Treer i sur., 1995).

Uzgoj kamenica počinje prihvatom ličinki na kolektore, što označava početak prve faze uzgoja.

Ukupan proces uzgoja se sastoji od tri faze:

- (i) prihvatanje ličinki na kolektore,
- (ii) prerada ili uklanjanje jedinki s kolektora,
- (iii) cementiranje kamenica (Hajder, 2020).

Za prihvatanje ličinki kamenica koriste se snopovi grana koji se bacaju u more. Ovi snopovi se polažu na dubinu od 5 do 15 metara, u vrijeme kada u populaciji kamenica postoji najmanje 5 % jedinki u stanju mrijesta i kada broj ličinki doseže oko 15000 komada/ m^3 (Treer i sur., 1995). Na ovim kolektorima, kamenice u prvoj godini života narastu 4 do 6 cm (Treer i sur., 1995). Nakon faze na kolektorima, nužno je izvršiti razrjeđivanje kamenica koje su prirasle, što zahtijeva ručni rad. Postupak razrjeđivanja prilagođava se tipu kolektora na kojem su kamenice prihvaćene. Grane s kamenicama s kolektora se sjeckaju na manje komade i upleću u konope, a često se provodi i cementiranje (Hajder, 2020).



Slika 2. Kamenice cementirane na konope (Izvor: <https://www.malistonoyster.com/en/>)

Najpovoljnije vrijeme za obaviti cementiranje je lipanj. Nakon uklanjanja kamenica s pletenica, slijedi njihovo pranje i razvrstavanje prema veličini u tri razreda. Kamenice koje su sitne, zakržljale ili nepravilne se odbacuju. Krupnije i srednje krupne kamenice se zadržavaju u košarama u moru, ali je bitno naglasiti kako se cementiranje mora obaviti unutar tri dana kako ne bi uginule. Umjesto cementiranja, uzgoj se može prakticirati i u košarama. Kada se kamenice cementiraju, važno je postaviti ih tako da su im tupi krajevi (umbo) nasuprot, a cementira se uvijek izbočena strana ljuštura. Cementiranje se obavlja na način da se kamenice postavljaju u parovima s razmakom od 15 do 20 cm, a zatim se konopac veže na mjesto gdje će kamenice doseći tržišnu veličinu (Treer i sur., 1995). Ciklus uzgoja od postavljanja kolektora do komercijalne dužine traje otprilike dvije do tri godine, a uzgoj se odvija na plutajućim instalacijama. Nakon izlova kamenica se čisti tako da se s ljuštura ukloni sav obraštaj i mulj (<https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/82/Specifikacija-Malostonska-kamenica-11.pdf>).

2.4. Klasifikacija kamenica

Vanjski izgled ljuštura školjkaša posebno je važan u ostavljanju dojma na kupce, stoga pravilnija ljuštura znači bolju poziciju na tržištu. Dakle, izgled i veličina proizvoda, ali i kvaliteta i boja mesa školjkaša ključni su elementi konkurentnosti na tržištu. Oblik kamenice određen je načinom uzgoja i brzinom rasta. Prije nego što se kamenice i drugi morski organizmi stave na tržište, podvrgavaju se fizičkoj obradi. Za postizanje atraktivnog vanjskog izgleda, kamenice se čiste od vanjskih nečistoća i naslaga. Kakvoća mesa drugi je ključni faktor koji treba uzeti u obzir. Pri ocjeni kakvoće mesa presudni su čimbenici njegova boja i sadržaj. Na ove dvije karakteristike uvelike utječu opskrba hranom unutar vodenog stupca, vrijeme mriještenja, doba godine i gustoća nasada. Kamenice se mogu klasificirati prema okusu ili masi (tablica 2) (Pećarević i Bratoš, 2004).

Tablica 2. Kategorizacija europskih kamenica prema masi

(Izvor: Pećarević i Bratoš, 2004.)

RAZRED	MASA 100 KOMADA (kg)
000	10-12
00	9-10
0	8
1	7
2	6
3	5
4	4
5	3
6	2

Prema okusu, kamenice se kategoriziraju u tri skupine. Najtraženije su kamenice čvrstog mesa, svijetle boje i slatkog okusa. Druga skupina su kamenica čije je meso krem do žute boje, pomalo mekano. Najlošijim se smatraju kamenice one čije meso ima intenzivni slani okusa te je tamne boje (Pećarević i Bratoš, 2004).

Kamenice su najukusnije u ožujku, a mogu ostati na tržištu i do 64 dana nakon prikupljanja, ovisno o uvjetima i temperaturi skladištenja koje su navedene u Tablici 3 (Llobrera i sur., 1986).

Tablica 3. Trajnost kamenica izražena u danima pri različitim temperaturama skladištenja

(Izvor: Llobrera i sur., 1986)

SKLADIŠTENJE	TRAJNOST (dan)
Sobna temperatura (24 °C)	2
U ledu (3-4 °C)	14
Rashlađene (4 °C)	22
Zamrznute (-25 °C)	64

Uz pažljivo rukovanje i skladištenje na hladnim i vlažnim mjestima, kamenice mogu preživjeti tjednima i mogu se prodavati na udaljenim tržištima. No, ako su im ljuštore oštećene, osobito na rubovima, brzo gube tekućinu, pa ih je najbolje plasirati na tržište unutar tri dana od vađenja iz mora. Prilikom transporta važno je izbjegavati mehanička oštećenja i održavati temperaturu između 1 i 10 °C. Ovisno o vrijednosti proizvoda, vremenu transporta

i ciljnom tržištu, način pakiranja varira od jednostavnih plastičnih i kartonskih kutija i vrećica do posebno dizajniranih kutija s pregradama za pojedinačne kamenice. Kamenice se također mogu skladištiti u posudama napunjenim vodom u trgovinama i restoranima, ali je bitno svakodnevna kontrola (Llobrera i sur., 1986; Pećarević i Bratoš, 2004).

Jedan od načina obrade kamenica je dimljenje. Kamenice se dime na 80 °C otprilike 20 do 30 minuta, a zatim se pažljivo odstrane ljuštore. Nakon toga meso se ohladi i ispere prije namakanja u salamuri na temperaturi od 50 °C, 4 do 5 minuta. Meso se ponovno osuši prije nego što se izloži gustom dimu na temperaturi od 80 °C otprilike 30 do 45 minuta, ovisno o veličini kamenica. Meso se okreće svakih 15 minuta kako bi svi dijelovi bili ravnomjerno izloženi dimu. Dimljene kamenice na tržištu su dostupne u metalnim ili staklenim posudama i premazane su jestivim uljem (Seung-Gil i sur., 2006).

Zamrzavanje kamenica još je jedan od načina očuvanja kamenica. Mogu se zamrzavati sa ili bez jedne ili obje ljuske, a ako su obje ljuske prisutne, moraju se zalediti dok su još žive kako bi ljuske ostale zatvorene. Proces zamrzavanja odvija se u zračnom hladnjaku (Otwell i Garrido, 1995). Konzerviraju se u vakumirane vrećice ili u čvrstu metalnu ambalažu. Zamrznute kamenice ne bi se trebale konzumirati sirove nakon odmrzavanja već se takve kamenice kuhaju (Pećarević i Bratoš, 2004).

Osim što se koriste u prehrani, kamenice se koriste i u druge svrhe. Na primjer, ljuštore kamenica značajan su izvor kalcijevog karbonata koji je ključan za proizvodnju vapna u poljoprivredi i građevinskog materijala. Preostale zdrobljene ljuske služe i kao koristan dodatak hrani za perad. Nadalje, ljuštore kamenica se koriste za izradu gumba, nakita i drugih ukrasnih predmeta (Da Silva i sur., 2023).

2.5. Nutritivni sastav i promjene prilikom zamrzavanja u kamenica te ostalih školjkaša

Meso školjkaša vrlo je hranjivo, sadrži bitne sastojke poput proteina koji su vitalni za ljudsku prehranu. Osim toga, lako je probavljivo i ima prikladan aminokiselinski sastav. Također, obiluje i raznim vitaminima kao što su A, C, D, E i vitaminima B-kompleksa te sadrži optimalnu ravnotežu mineralnih tvari u prirodnim omjerima (Šoša, 1989). Kako bi se naglasila kalorijska vrijednost ove namirnice, Mašić (2004) iznosi kako 100 grama mesa kamenica ima 80 kalorija, što odgovara jednom jajetu.

Meso kamenica sadrži i esencijalne aminokiseline poput lizina, histidina i tirozina. Osim toga, meso kamenica vrijedan je izvor minerala, a 100 grama sadrži 50-70 mg Ca, 24-48 mg Mg i 5-9,5 mg Fe (Zelić, 2015). Sastav tkiva varira ovisno o čimbenicima kao što su vrsta kamenice, mjesto uzgoja, sezona ribolova, uvjeti prehrane tijekom uzgoja, sezona mrijesta i

veličina primjeraka. Prema Mašiću (2004) kamenice s većim udjelom masti imaju više glikogena.

Tablica 4. Kemijski sastav sušenog mesa kamenica

(Izvor: Šoša,1989)

Kemijski sastav	Kamenica (%)
Voda	12,00
Masti	2,30
Proteini	67,00-71,00
Soli	4,80
Glukoza	8-13

Količina glikogena prisutna u kamenicama podložna je promjenama tijekom godine, što također utječe na njihovu ukupnu kvalitetu, posebno u sezoni mrijesta. Senzorna svojstva kamenice, uključujući njenu aromu, izgled i okus, ovise o njezinom fiziološkom stanju kao i o sezoni u kojoj se konzumira. Kada je kamenica na vrhuncu konzumacije, tijekom zimskih mjeseci, klasificira se kao sezonska kamenica. U to vrijeme kamenice proizvode obilne količine glikogena i tada je meso svijetle boje i slatkog okusa. Međutim, tijekom kasnog proljeća i ljeta, meso kamenice postaje žilavo i tamnije boje (Mašić, 2004).

Kvaliteta smrznute hrane ovisi o mnogim čimbenicima, uključujući temperaturu i vrijeme skladištenja, pakiranje, stopu zamrzavanja i odmrzavanja i temperaturne fluktuacije (Srinivasan i sur., 1997).

Promjene u senzorskim, mikrobiološkim, kemijskim i fizičkim karakteristikama mesa kamenica *Crassostrea belcheri* ispitali su Songsaeng i sur. (2010). Meso kamenica podvrgnuto je dvjema različitim metodama zamrzavanja: pojedinačnom brzom zamrzavanju (IQF) i zamrzavanju pomoću kontaktne ploče (CPF). Prije smrzavanja, jedan dio mesa kamenica tretiran je 0,02% suspenzijom butiliranog hidroksianizola (BHA), dok je drugi dio netretiran. Tijekom cijelog razdoblja skladištenja kamenice su analizirane svaka tri mjeseca, kroz ukupno 12 mjeseci. Rezultati ovog istraživanja otkrili su da su kamenice podvrgnute IQF metodi zamrzavanja pokazale smanjenu stopu otpuštanja tekućine u usporedbi s kamenicama zamrznutim metodom CPF. To se može pripisati činjenici da brzo IQF zamrzavanje uzrokuje manju štetu tkivu kamenice u usporedbi sa sporijom CPF metodom zamrzavanja. Također, nije bilo vidljivih promjena u mikrobiološkoj kakvoći kamenica (Songsaeng i sur., 2010).

Utvrđeno je da su se senzorske osobine kamenica mijenjale ovisno o periodu zamrzavanja. Miris je ostao nepromijenjen dok su boja i tekstura bile podložne promjenama. Tekstura kamenica sporom metodom zamrzavanja bila je znatno mekša od onih kamenica zamrznutih IQF tehnologijom, a razlika u teksturi tkiva proizlazi iz mikrostrukture kristala leda (Songsaeng i sur., 2010).

2.6. Dosadašnja istraživanja kemijskog sastava školjkaša

Posljednjih godina istraživanja u Malostonskom zaljevu prvenstveno su bila usmjerena na prirodne populacije i razmnožavanje školjkaša. Kad je riječ o školjkašima namijenjenih tržištu, kvalitetu određuju količina suhe tvari u mesu i minimalna količina vode. Takve karakteristike omogućuju mesu da popuni maksimalni prostor između ljuski, što rezultira visokim indeksom kondicije jedinke (Gavrilović i Petrinc, 2003). Unatoč brojnim istraživanjima posvećenih europskoj kamenici, postoji značajan nedostatak informacija o biokemijskom i masnokiselinskom sastavu ove vrste (Gavrilović, 2011).

U istraživanju Zrnčića i sur. (2007) analiziran je utjecaj dubine vodenog stupca na rast i preživljavanje kamenica. Istraživanje je pokazalo da su kamenice koje su se uzgajale u sredini vodenog stupca imale najveći ukupni prirast težine i prirast težine mekog tkiva među ispitivanim skupinama, u usporedbi s onima koje su bile smještene na vrhu ili dnu. Unatoč tome što su bili smješteni na različitim dubinama u oba eksperimentalna mjesta, stope preživljavanja bile su slične za sve skupine, a nije bilo značajnih razlika u vršnoj smrtnosti tijekom ljetnih mjeseci. Kljaković-Gašpić i suradnici (2007) proveli su istraživanje koje se bavilo koncentracijama teških metala prisutnih u tkivima dagnji i kamenica. Kroz procjenu prostorne distribucije ovih kontaminanata, otkriveno je da nema značajnih odstupanja između mjesta uzorkovanja u Malostonskom zaljevu u pogledu količina detektiranih metala u tragovima. Tijekom jesensko-zimskih mjeseci došlo je do značajnog porasta koncentracija Cd, Cu, Cr i Hg, dok su koncentracije Pb i Zn ostale konstantne kroz sva godišnja doba. Od šest ispitivanih metala samo su koncentracije Cd i Hg pokazale značajnu negativnu korelaciju s indeksom kondicije dagnji.

Radetić (2010) je u svojoj studiji istraživao rast kamenica u raznim uvalama i dubinama Malostonskog zaljeva tijekom deset mjeseci. Rezultati ovog istraživanja upućuju na to da je optimalni mjesečni porast rasta kamenica zabilježen na dubini od četiri metra. Istraživanja kemijskog sastava mesa kamenica iz Malostonskog zaljeva prethodno su tijekom godine dana proveli Carić i sur. (2000) godine. Tijekom ove studije analizirani su sadržaj vode, anorganski (suha tvar) i organski sastav (uključujući proteine, ugljikohidrate i glikogen). Rezultati

istraživanja su pokazali da se kemijski sastav tkiva kamenica mijenja s promjenom godišnjih doba, s tim da izmjerene vrijednosti variraju. Uočeno je da su razine glikogena i proteina varirale prije, tijekom i nakon mrijesta. Nakon mrijesta, razine glikogena i lipida su se smanjile, dok su se razine proteina povećale.

Gavrilović i suradnici (2008) godine proveli su istraživanje o utjecaju indeksa kondicije kamenice i infestiranosti ljuštore mnogočetinašem *Polydora* spp. na kvalitetu mesa kamenica. Otkrili su da je utjecaj mnogočetinaša na kvalitetu ljuštore zanemariv.

U razdoblju od šesnaest mjeseci, Abad i suradnici (1995) ispitivali su kategoriju lipida i sastav masnih kiselina triacilglicerola i fosfolipida u divljoj populaciji *O. edulis*. Utvrđeno je da su fosfolipidi najzastupljeniji tip. Minimalne razine triacilglicerola ukazuju na nedostatak hrane. Sezonska fluktuacija fosfolipida, triacilglicerola i slobodnih sterola bila je usporediva s onom ukupnih lipida. Blizu dvije trećine masnih kiselina triacilglicerola bile su polinezasićene ($61,8 \pm 6,45\%$). I triacilgliceroli i fosfolipidi imali su visok postotak nezasićenosti zbog visoke koncentracije n-3 polinezasićenih masnih kiselina (PUFA). Udio n-3 PUFA bio je dosljedno veći od onog n-6 i n-3n-6. Potencijalni nedostatak ključnih masnih kiselina može se uravnotežiti relativno povišenom koncentracijom 20:3n-9 masne kiseline i metilenom neprekinutih masnih kiselina (Abad i sur., 1995).

Vrijeme i intenzitet reprodukcije, aktivnost filtriranja i brzina rasta školjkaša izravno su pod utjecajem temperature mora koje ih okružuje. Kada temperatura padne, propusnost membrane se obično smanjuje, što može dovesti do smanjenja funkcionalnosti membrane. Međutim, školjkaši imaju sposobnost prilagodbe tim promjenama modificiranjem sastava membranskih lipida. Točnije, oni ugrađuju više nezasićenih masnih kiselina u svoje membrane kako bi održali funkcionalnost membrane mijenjanjem fosfolipidnog sloja, uključujući promjene u sadržaju masnih kiselina i kolesterola (Hazel, 1995). Na fiziologiju i rast školjkaša, kao i na njihov sastav masnih kiselina, utječu slanost oceana i količina kisika koja je u njemu otopljena. Ovaj zaključak izveli su Dridi i sur. (2007).

Na rast i sazrijevanje pojedinih vrsta fitoplanktona utječu promjene u molarnom omjeru otopljenih hranjivih soli. Prekomjerno povećanje koncentracije ovih soli može uzrokovati promjene zasićenosti morske vode kisikom i rezultirati porastom količine i mase fitoplanktona, što onda može dovesti do štetnog cvjetanja toksičnih fitoplanktonskih vrsta. Nasuprot tome, smanjenje koncentracije hranjivih soli može uzrokovati smanjenje količine fitoplanktona, što može imati negativne posljedice na kvalitetu i mrijest školjkaša. Kada se koncentracija amonijaka u uzgojnom okruženju poveća, to znači lošu kvalitetu i može imati toksični učinak na kamenice. Unatoč tome, utjecaj sezonskih promjena i čimbenika okoliša na kiselinski sastav školjkaša Jadrana tek treba temeljito istražiti. Prethodne studije i analize

mesa kamenica uglavnom su bile usmjerene na osnovne biokemijske parametre i indeks kondicije (Gavrilović, 2011).

Provedena su brojna istraživanja antioksidativnih sposobnosti enzima koji se nalaze u vodenim organizmima, s posebnim naglaskom na školjkaše. Svrha ovih istraživanja bila je prikupiti podatke za komparativnu analizu, točnije istražiti utjecaj okolišnih čimbenika na te enzime (Matačić, 2020).

3.CILJ I SVRHA RADA

Cilj rada ovog rada je istražiti utjecaj tehnologije brzog zamrzavanja (IQF) na kvalitetu kamenica iz 2 uzgojna područja (Malostonski zaljev i ušće rijeke Krke). Dodatni cilj rada je utvrditi razlike u kvaliteti nakon vremenskog odmaka od 3 mjeseca i skladištenja na dvije temperature (-18 °C i -60 °C). Svrha rada je da se dobiveni podatci iskoriste u promociji kamenice kao kvalitetnog proizvoda hrvatske akvakulture, te da se ispituju mogućnosti za njeni lakši plasman na tržište tijekom cijele godine, s obzirom da je zamrznuta u periodu najbolje kvalitete.

4. MATERIJALI I METODE

Kamenice za provođenje istraživanja prvotno su se izuzele sa dvije lokacije: Krka i Malostonski zaljev te su u istom danu u roku od 6 sati od vađenja zamrznute. Zamrzavanje se provelo u suradnji sa tvrtkom „Marikomerc“, u kojoj su kamenice zamrznute jednom od najmodernijih tehnologija zamrzavanja, pojedinačnim brzim zamrzavanjem tekućim dušikom na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (IQF tunel, MECCRIOS, Italija). Temperatura na početku tunela za zamrzavanje iznosi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ dok je finalna stabilna temperatura tunela u središtu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jedan dan nakon zamrzavanja kamenice sa svake lokacije su prebačene u frižidere s dvije različite temperature. Temperature uzoraka mjereno u središtu proizvoda bile su $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 3. Tunel za brzo zamrzavanje (Izvor: Autor)

Sve analize odrađene su u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe Zavoda za prehrambeno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Četiri početna homogenizirana uzorka za daljnje analize (Ston $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, Krka $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) dobivena su na način da su kamenice prvotno odmrznute pri sobnoj temperaturi, svaka kamenica po skupinama je otvorena te je zasebno izvagana masa ljuštura i masa mišića odnosno mesa. Odnos mase mesa i mase ljuštura kasnije se koristi pri izračunu indeksa kondicije. Zasebno izvagani mišići po skupinama su stavljeni u posude te su potom štapnim mikserom (model HR1611, Philips, Kina) napravljene emulzije odnosno početni uzorci. Uzorci su prebačeni u četiri zasebne vrećice, označeni po skupinama te zamrznuti.

4.1. Određivanje ukupnog hlapivog baznog dušika (TVB-N)

Materijali: aparatura za destilaciju vodenom parom (Kjeltec™ 2100, Foss, Danska)

alumijska folija

destilirana voda

magnezijev oksid (MgO)

Erlenmeyerova tikvica

4 % otopina borne kiseline

0,1 M HCl

Ukupni hlapivi bazni dušik određuje se destilacijom vodenom parom iz uzorka pomoću aparature za destilaciju vodenom parom (Kjeltec™ 2100, Foss, Danska). Na komadić alumijske folije se izvaže 10 g uzorka (2x za svaku skupinu kamenica) te se prenese u tubu za destilaciju nakon čega se u tubu doda 50 mL destilirane vode, 1 g magnezijevog oksida (MgO) te jedna kap sredstva protiv stvaranja pjene. Sadržaj se promiješa i tube se stave u aparat za destilaciju.

Potom se u Erlenmeyerovu tikvicu stavi između 25 i 30 mL 4 % otopine borne kiseline i stavi se u aparat za destilaciju na način da cijev destilata bude potpuno uronjena u otopinu.

Pripremljeni uzorak se destilira 4 minute do volumena destilata od 200 mL (slika 5.).



Slika 4. Aparat za destilaciju (Izvor: Autor)

Nakon toga se destilat titrira 0,1 M otopinom klorovodične kiseline (HCl) do promjene boje. Prije destilacije uzoraka destilirana se i slijepa proba koja se priprema na isti način samo bez dodavanja uzorka.

Udio ukupnog hlapivog baznog dušika naposljetku se računa prema formuli:

$$m(\text{TVBN}) = \frac{(T-B) \cdot N \cdot 14,007 \cdot 100}{m(\text{uzorak})g} \quad (\text{mg}/100\text{g}) \quad (1)$$

gdje je:

T= volumen 0,1 M HCl utrošen za titraciju uzorka,

B= volumen 0,1 M HCl utrošen za titraciju slijepa probe te

N= normalitet titranta ($N(\text{HCl})=0,1$).

4.2. Određivanje pH vrijednosti

Materijali: kivete (50 mL)

destilirana voda

pH metar (pH7110, InoLab, Njemačka)

U svaku kivetu od 50 mL odvaži se po 2 g početnog homogeniziranog uzorka po skupinama te se u svaku kivetu doda 20 mL destilirane vode. Uzorci se promućkaju te se u svakoj pojedinoj kiveti izmjeri pH vrijednost digitalnim pH metrom (pH7110, InoLab, Njemačka).

4.3. Određivanje stupnja oksidacije masti (TBA test)

Materijali: kivete

BHT (butilhidroksitoluen)

TCA (trikloroetena kiselina)

ultraturax (T18 basic, IKA, Njemačka)

centrifuga (Rotina 380R, Hettich, Njemačka)

filter papir (No. 54, Whatman, Velika Britanija)

TBA (tiobarbiturna kiselina)

spektrofotometar (Specord 50 PLUS UV/VIS, Analytik Jena, Njemačka)

U kivete se izvaži po 5 g uzorka te u svaku doda 10 mg BHT (butilhidroksitoluen) i 20 mL 5 % TCA (trikloroetena kiselina). Potom je potrebno sadržaj svake kivete homogenizirati tri puta

po 20 sekundi na ultraturax-u (ultraturax T18 basic, IKA, Njemačka) i odmah staviti u led. Kivete se po parovima vade iz leda, ekvilibriraju te se stavljaju u centrifugu (Rotina 380R, Hettich, Njemačka) 10 min na 12000 rpm na 4 °C.

Nakon centrifugiranja sadržaj kiveta se filtrira preko filter papira (No. 54, Whatman, Velika Britanija) u zasebne kivete i to u svaku po 4 mL sadržaja. Zatim se u svaku filtriranu kivetu dodaje 4 mL TBA (tiobarbiturna kiselina).

Slijepa proba se napravi u jednoj epruveti sa 4 mL TCA i 4 mL TBA. Sve epruvete, uključujući i slijepu probu ostave se da reagiraju 1 h na 100 °C nakon čega se ohlade te im se apsorbancije očitaju na spektrofotometru (Specord 50 PLUS UV/VIS, Analytik Jena, Njemačka) na 532 nm (A_{532}).

4.4. Određivanje sastava masnih kiselina

Materijali: epruvete sa staklenim čepom (10 mL)

izooktan

metanolna otopina KOH ($c= 2 \text{ mol L}^{-1}$)

natrijev hidrogen sulfat monohidrat

plinski kromatograf 6890N (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)

Prilikom određivanja sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom ponajprije je potrebno prevesti masne kiseline u njihove metilne estere. Metilni esteri pripremaju se metodom po Bannonu, ISO 5509:2000.

60 g uzorka masti se izvaže i otopi se u 4 mL izooktana u epruveti od 10 mL staklenog čepa. Potom se u epruvetu dodaje 200 μl metanolne otopine KOH ($c= 2 \text{ mol L}^{-1}$) te se snažno protrese oko 30 sekundi. Sadržaj epruveta se ostavi na sobnoj temperaturi da reagira.

Nakon što se smjesa razbistri i izdvoji se glicerolni sloj pri dnu epruvete, u nju se dodaje 1 g natrijeva hidrogen sulfata monohidrata kako bi došlo do neutralizacije smjese. Zatim se bistra otopina prebacuje u vijalicu.

Pripremljeni uzorci analizirani su na plinskom kromatografu 6890N (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) Network GC System, opremljenim plamenoionizacijskim detektorom (FID) koji je automatski spojen na računalo.

Uvjeti rada:

Kolona:	kapilarna DB-23 (Agilent)
60 m ×0,25 mm	0,25µm
stacionarna faza:	cijanopropil-silikon
Temperatura kolone:	programirana 60 °C do 220 °C zadržava se 17 °C min
Plin nosilac:	Helij
Protok plina nosioca:	1,5 mL/min
Temperatura injektora:	250 °C
Split:	1:30
Temperatura detektora:	280 °C
Količina injektiranog uzorka:	1 µL

Identifikacija masnih kiselina provedena je usporedbom vremena zadržavanja metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (F. A. M. E. C4-C24, Supelco) poznatog sustava.

4.5.Određivanja indeksa kondicije

Materijali: digitalna vaga (KB 200-2N, KERN, Njemača)

Zaprimljene zamrznute kamenice (IQF tehnologija) odmrznute su na sobnoj temperaturi do trenutka otvaranja ljuštura. Svaka kamenica je otvorena, izvađen je mišić odnosno meso te se kod svake kamenice posebno vagala masa ljušture i masa mesa.

Za izračun indeksa kondicije u travnju za svaku lokaciju (Ston i Krka) provedeno je vaganje mokrog mesa i ljušture kamenica 30 puta. U svibnju su mokro meso i ljuštura kamenica vagani 20 puta, a u srpnju 15 puta za pojedinu temperaturu skladištenja.

Procjena indeksa kondicije računa se prema formuli:

$$CI = \frac{\text{masa mokrog mesa}}{\text{masa ljušture}} \times 100. \quad (2)$$

4.6. Određivanja udjela proteina po KJELDAHL-u

Materijali: epruvete za spaljivanje

alumijska folija

tablete Kjeldahl katalizatora

sumporna kiselina H_2SO_4

vodikov peroksid H_2O_2

Erlenmeyerova tikvica

borna kiselina H_3BO_3

Kjeldahlova epruveta

40 % NaOH

0,2 M HCl

natrijev hidroksid NaOH

bakrov (I) sulfat (katalizator) Cu_2SO_4

natrijev sulfat Na_2SO_4

destilirana voda

Određivanje količine proteina po KJELDAHL-u sastoji se od tri faze vlažnog spaljivanja odnosno oksidacije, destilacije i titracije. Po ovoj metodi količina proteina u kamenicama određuje se indirektno iz količine dušika.

Uzorak se zagrije koncentriranom sumpornom kiselinom uz dodatak katalizatora ($CuSO_4$) i soli za povišenje vrelišta (Na_2SO_4) prilikom čega dolazi do oksidacije organske tvari (CO_2 , H_2O), a dušik se pri tome oslobađa u obliku NH_3 i sa H_2SO_4 daje $(NH_4)_2SO_4$. U drugoj fazi određivanja tj. destilaciji, djelovanjem natrijeve lužine sa amonijevim sulfatom oslobađa se amonijak koji se predestilira vodenom parom u tikvicu s kiselinom poznate koncentracije te se višak odredi titracijom.

Postupak:

Epruvete za spaljivanje se očiste i osuše, uzorak se izvaže na listiću alumijske folije (2 g uzorka), umota se i ubaci u epruvetu. U svaku se kivetu dodaju 2 tablete Kjeldahl katalizatora i 14 mL koncentrirane H_2SO_4 kiseline i 5 mL H_2O_2 te se lagano miješa dok se uzorak potpuno ne navlaži. Pri kraju reakcije, stalak s epruvetama se postavi u digestijsku jединicu za mineralizaciju te se uključi sistem za odvod para. Prvih 10 min spaljivanja odvija se uz maksimalni protok vode nakon čega se protok mora smanjiti na 50 %. Mineralizacija je

završena nakon što je tekućina bistra svijetlo zelene boje. Epruvete se potom stave hladiti do sobne temperature nakon čega se oprezno u svaku doda 80 mL destilirane vode.

Postupak destilacije se započinje na način da se na postolje u destilacijskoj jedinici stavi Erlenmeyerova tikvica sa 25 mL borne kiseline, podigne se u gornji položaj kako bi destilacijska cjevčica bila uronjena u otopinu. Kjeldahlova epruveta se postavi na odgovarajuće mjesto i zatvore se sigurnosna vrata. Dozira se 50 mL 40 % NaOH u Kjeldahlovu epruvetu te se destilacija obavlja 4 minute. Destilat je zelene boje što ukazuje na prisustvo amonijaka.

Titracija kloridnom kiselinom obavlja se na način da se bireta napuni sa 0,2 M HCl i titrira direktno u prihvatnu tikvicu. U završnoj fazi destilat titrira izravno u prihvatnoj tikvici do prelaska iz zelene u blijedo ružičastu boju.

Po završetku postupka radi se izračun po formuli:

$$\% N = \frac{(T-B) \cdot c(\text{HCl}) \cdot 14,007 \cdot 100}{m(\text{uzorak})} \quad (3)$$

gdje je:

T - V (HCl) utrošene za titraciju uzorka (mL)

B - V(HCl) utrošene za titraciju slijepe probe (mL)

c (HCl) = 0,2 mol/l.

Postotak proteina se iz toga računa po formuli:

$$\% \text{ proteina} = \% N \times 6,25 \quad (4)$$

4.7. Određivanje udjela vode

Materijali: sušionik (LLG-uniOVEN 24, LLG, Njemačka)

aluminijske zdjelice sa staklenim štapićem

kvarcni pijesak

eksikator

digitalna vaga (KB 200-2N, KERN, Njemačka)

Količina vode u kamenici podrazumijeva gubitak na težini uzorka sušenjem do konstantne mase pri temperaturi od od 103 °C ± 2 °C. U označene aluminijske zdjelice stavi se 5 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić te se stavi u sušionik na pola sata (poklopac sastrane). Posudice se

potom hlade u eksikatoru do sobne temperature otprilike pola sata te se potom važu skupa sa štapićem i pijeskom (m_0).

U svaku označenu posudicu dodaje se 3 g početnog homogeniziranog uzorka, uzorak se pomiješa štapićem s pijeskom, poklopi se te se ponovno važe (m_1). Nakon vaganja posudice se otklope i stave u sušionik na 2,5 s poklopcem prislonjenim na posudu. Nakon toga se poklapaju i stavljaju u eksikator na hlađenje otprilike 30 minuta. Posudice se zatim iznova važu (m_2). Postupak se ponavlja sve dok se dva uzastopna mjerenja (nakon 1 h sušenja) ne razlikuju više od 0,1 %.

Udio vode se prema tome računa po formuli:

$$w \text{ (vode, \%)} = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_0)} \times 100 \quad (5)$$

4.8. Određivanje količine mineralnih tvari (pepela)

Materijali:

lončići za spaljivanje

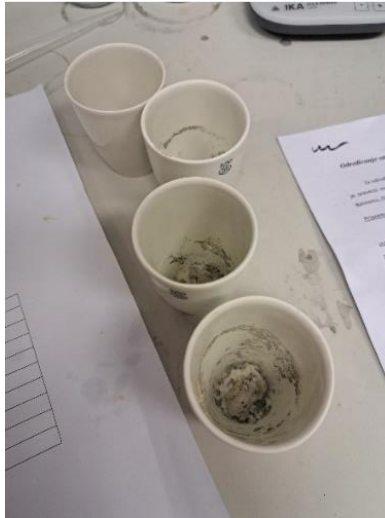
Mufolna peć (Heraew, Njemačka)

Bunsenov plamenik (SEKURFLAM – Poligas, O.M.M. Laboratory Equipment, Italija)

Eksikator

Ukupni sadržaj mineralnih tvari određene namirnice se može odrediti na osnovu količine pepela, odnosno anorganskog ostatka koji zaostaje nakon spaljivanja organskog dijela namirnice. Lončići za spaljivanje se prije početka metode pripreme na način da se zažare u mufolnoj peći na 550 °C do konstantne mase (15 minuta), ohlade se 1 h u eksikatoru te se izvažu.

U svaki prethodno izvagani lončić doda se 5 g početnog homogeniziranog uzorka te se lončići potom zagrijavaju na Bunsenovom plameniku sve dok uzorci ne karboniziraju. Nakon toga se stavljaju u mufolnu peć i ostave žariti dok se ne stvori blijedo zeleni pepeo. Na kraju spaljivanja lončići se stave u eksikator do potpunog hlađenja (1 h) nakon čega se važu.



Slika 5. Lončići sa pepelom (Izvor: Autor)

Iz poznatih varijabli navedenom formulom dobivamo konačni postotak pepela:

$$\% \text{ pepeo} = \frac{(m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1)} \times 100, \quad (6)$$

gdje je

m_1 masa prazne posudice,

m_2 masa posudice s uzorkom prije sušenja,

m_3 masa posudice s pepelom.

4.9. Određivanje ukupnog udjela masti

Materijali i otopine korišteni u metodi:

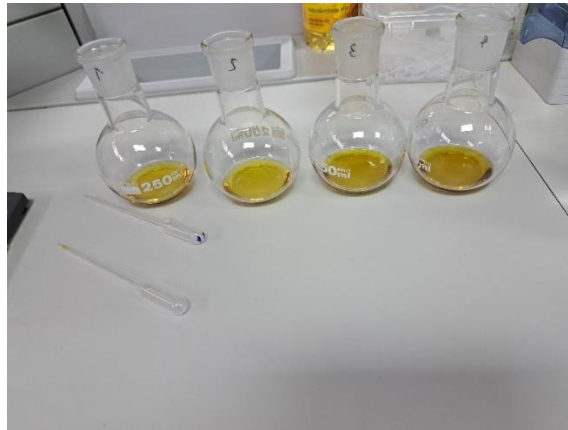
deionizirana voda, propan-2-ol (MediMon, Hrvatska), cikloheksan (ROTISOLV, Njemačka) otopina A (propan-2-ol-cikloheksan (w/w=16:20)), otopina B (13% (w/w) propan-2-ol u cikloheksanu); kivete (50 mL), ultraturax (T18 basic, IKA, Njemačka), automatska pipeta (10-100ul, MicroPette Plus, DLAB Scientific, Malezija), parafilm, centrifuga (Rotina 380R, Hettich, Njemačka), uređaj za otparavanje (Heating bath B-490, BUCHI, Švicarska).

Ekstrakcija masti se obavlja cikloheksanom i propan-2-ol-om. U cikloheksan prelaze dodatkom vode, a odvajanje faza postiže se centrifugiranjem. Masti se potom određuju gravimetrijski nakon razdvajanja cikloheksanskog sloja i otparavanja (Smedes, 1999).

Kivete (50 mL) su tarirane i u svaku je dodano 15 g početnog homogeniziranog uzorka (2x-svaka skupina uzorka po dvije kivete). Potom se u svaku kivetu dodaje 18 mL otopine A te se sadržaj kiveta homogenizira na ultraturax-u (ultraturax T18 basic, IKA, Njemačka) otprilike 2

minute (11000-13000 rpm). Potom je u svaku kivetu automatskom pipetom dodano 10 mL vode i homogenizirano na ultraturax-u oko 1 minute.

Nakon toga kivete je po parovima bilo potrebno ekvilibrirati parafilmom kako bi im se izjednačile težine prije stavljanja na centrifugu. Kivete jednakih težina stave se u centrifugu jedna nasuprot druge na 10 minuta (Rotina 380R, Hettich, Njemačka). Po završetku rada centrifuge u kivetama se izdvoji sloj masti odnosno organska faza (Slika 4) koja se kvantitativno pipetom odvaja u prethodno osušenu i izvaganu tikvicu za otparavanje.



Slika 6. Organska faza sa otapalom prije otparavanja (Izvor: Autor)

Preostaloj količini uzorka u kivetama potom se dodaje 10 mL otopine B te ponovno homogenizira na ultraturax-u 1 minutu. Nakon ekvilibriranja, kivete se ponovno stave u centrifugu 10 minuta nakon koje se opet pipetom odvaja gornja organska faza u tikvicu za otparavanje u kojoj smo već izdvojili prvi organski sloj.

Po završetku postupka tikvice se stave na otparavanje (Heating bath B-490, BUCHI, Švicarska) otapala na 51 °C na 235 mbar te potom na sušenje 1h na 105 °C. Na kraju se prema zadanoj formuli izračunava postotak masti:

$$\% \text{ masti} = \frac{m(\text{masti nakon vaganja})}{m(\text{masa uzorka})} \times 100. \quad (7)$$

5.REZULTATI

5.1. Ukupni hlapivi bazni dušik (TVB-N)

Razina TVB-N izmjerena u kamenicama u ovom istraživanju mijenjala se tijekom vremenskog perioda skladištenja. Tako je vidljivo da je nakon 3 mjeseca skladištenja došlo do porasta razine TVB-N kod svih uzoraka i na obje temperature skladištenja. Rezultati su vidljivi u tablici 6.

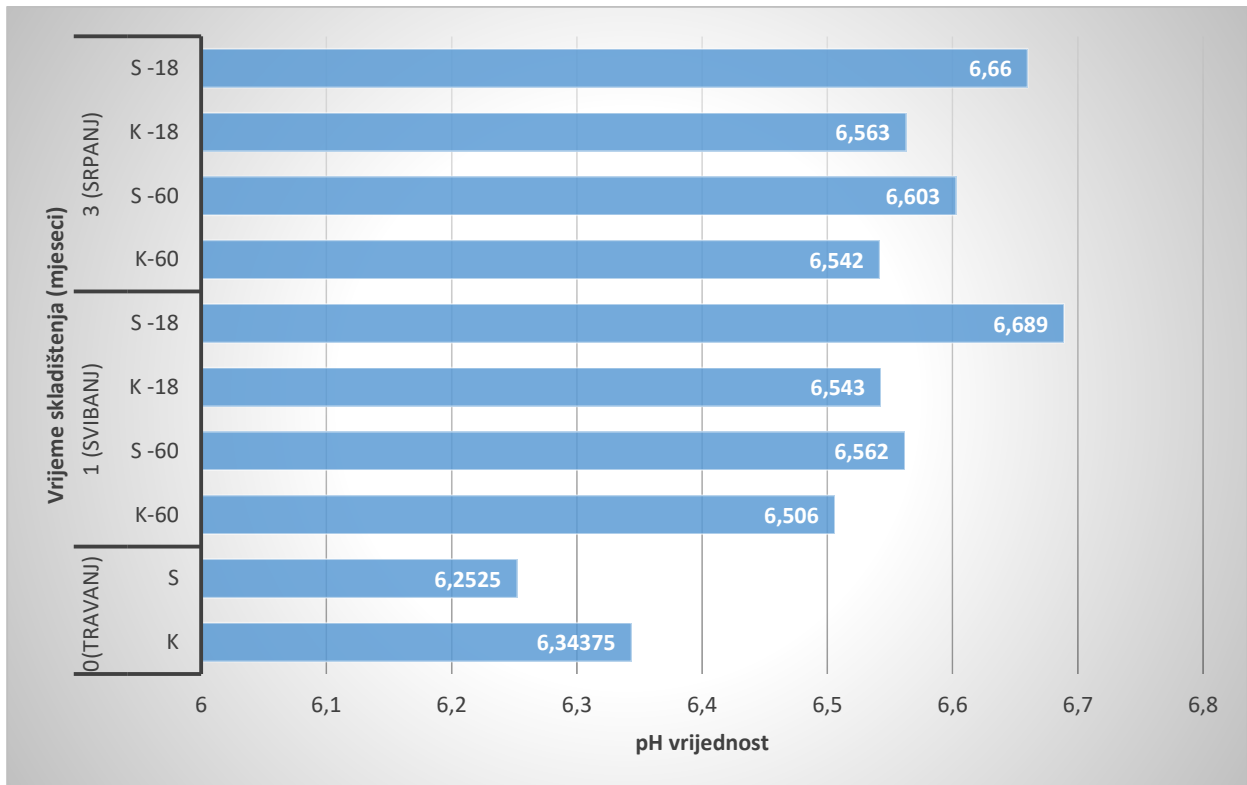
Tablica 5. Razina TVB-N pri različitim temperaturama zamrzavanja i periodima čuvanja u zamrzivaču

Vrijeme čuvanja kamenica (mjeseci)	TVB-N (mg N/100 g)			
	K-18	K-60	S-18	S-60
0	4,7	4,7	4,92	4,92
1	5,54	5,66	5,6	5,62
3	8,41	8,38	8,38	8,41

Iz podataka za TVB-N vidljivo je kako ne postoje značajne razlike u povećanju TVB-N vrijednosti s obzirom na različite temperature zamrzavanja (-18 °C i -60 °C), odnosno TVB-N vrijednost nešto je više porasla nakon 1 i 3 mjeseca čuvanja u zamrzivaču kod kamenica sa ušća Krke u odnosu na početnu TVB-N. Dokazano je da su kamenice i dalje prihvatljive za potrošače s obzirom da dobivene TVB-N vrijednosti nakon 3 mjeseca čuvanja iznose $\approx 8,4$ mg N/100 g, što ukazuje na to da je njihova svježina dobre kvalitete.

5.2. pH

Rezultati određivanja pH vrijednosti u kamenicama su pokazali da je pH vrijednost kamenica lagano porasla tijekom skladištenja, s tim da je malo veći porast bio nakon prvih mjesec dana čuvanja pri temperaturama od -18°C i -60°C , gdje su pH vrijednosti porasle u rasponu od 0,2 do 0,4. U naredna dva mjeseca čuvanja nije bilo nekih značajnijih promjena, odnosno promjene su bile unutra 0,1.



Grafikon 1. Promjene pH vrijednosti pri različitim temperaturama zamrzavanja i periodima čuvanja u zamrzivaču (S, K – oznaka podrijetla kamenica; -60°C , -18°C – oznake temperature skladištenja)

5.3. Stupanj oksidacije masti (TBA)

Kao i kod TVB-N-a i pH-a i stupanj oksidacije masti (TBA) je tijekom skladištenja rastao i pri obje temperature skladištenja, s tim da je ukupni porast bio manji tijekom skladištenja kod temperature od -60 °C. Porast TBA je kao i kod pH bio značajniji nakon prvog mjeseca skladištenja za sve kamenice osim za kamenice iz Krke koje su čuvane na temperaturi od -18 °C gdje je je TBA vrijednost više porasla u periodu od 1. do 3. mjeseca skladištenja.

Tablica 6. TBA vrijednosti pri različitim temperaturama zamrzavanja i periodima čuvanja u zamrzivaču

Vrijeme čuvanja kamenica (mjeseci)	TBA vrijednost			
	K-18	K-60	S-18	S-60
0	3,222	3,222	3,306	3,306
1	3,83	4,013	4,399	4,279
3	4,79	4,399	4,781	4,439

5.4. Masne kiseline

Analizom masnih kiselina u uzorcima kamenica uzetih s obje lokacije primjenom plinske kromatografije s plameno-ionizacijskim detektorom identificirano je 14 različitih masnih kiselina, od kojih je 6 zasićenih, 6 polinezasićenih i 2 mononezasićene masne kiseline čiji je sastav prikazan u tablici 8.

Kako je vidljivo iz udjela za pojedinu masnu kiselinu jasno je da su i kod stonskih i kod kamenica iz Krke kako tijekom prvog ispitivanja u travnju tako i tijekom naknadnih ispitivanja u svibnju, srpnju i studenom nakon skladištenja pri temperaturama od -18 °C i -60 °C, najzastupljenije polinezasićene masne kiseline (PUFA), potom zasićene masne kiseline (SFA) i sa najmanjim udjelom mononezasićene masne kiseline (MUFA). Palmitinska (C16:0) i stearinska (C18:0) su najzastupljenije zasićene masne kiseline, dok su od polinezasićenih masnih kiselina najzastupljenije dokosaheksaenoična kiselina (C22:6n3, DHA) i eikosapentaenoična kiselina (C20:5n3, EPA), a od mononezasićenih, oleinska kiselina (C18:1 *cis*) za koju je utvrđeno da je bila zastupljena u većem udjelu u uzorcima iz Krke u odnosu na stonske izuzetim u travnju.

S obzirom na visok udio dokosaheksaenoične (DHA) i eikosapentaenoične (EPA) kiseline može se reći da su i stonske i kamenice iz Krke dobar izvor ω -3 masnih kiselina.

Udjeli zasićenih masnih kiselina su kod obje vrste kamenica u većini slučajeva tijekom skladištenja neznatno rasli ili imali vrijednosti približne onim početnima i pri temperaturi od -18 °C i pri temperaturi od -60 °C. U kamenicama iz Krke iznimka je stearinska kiselina čiji se udio neznatno smanjio tijekom skladištenja pri -60 °C, dok je smanjenje udjela bilo nešto značajnije pri -18 °C.

Tablica 7. Udio masnih kiselina u svježim(travanj) i zamrznutim kamenicama iz Stona

Uzorak		Ston (travanj)	S-18 (svibanj)	S-60 (svibanj)	S-18 (srpanj)	S-60 (srpanj)
Masna kiselina	Naziv masne kiseline	Udio (%)	Udio (%)	Udio (%)	Udio (%)	Udio (%)
C14:0	Miristinska kiselina	4,39	4,63	4,57	4,66	4,58
C15:0	Pentadekanska kiselina	0,81	0,87	0,85	0,99	0,91
C16:0	Palmitinska kiselina	16,95	17,32	17,76	17,03	17,63
C16:1	Palmitoleinska kiselina	2,58	2,72	2,73	2,8	2,77
C17:0	Heptadekanoična kiselina	1,41	1,47	1,49	1,58	1,54
C18:0	Stearinska kiselina	5,25	5,92	5,72	5,92	5,72
C18:1 <i>cis</i>	Oleinska kiselina	6,95	6,66	6,41	6,64	6,41
C18:2 <i>cis</i>	Linolna kiselina	4,39	2,34	2,32	2,43	2,36
C18:3n3	Linolenska kiselina	2,58	2,49	2,7	2,57	2,73
C20:0	Arahidinska kiselina	1,84	1,95	1,85	2,05	1,89
C20:4n6	Arahidonska kiselina	2,26	2,31	2,28	2,4	2,32
C20:5n3 EPA	Eikosapentaenoična kiselina EPA	15,99	15,71	15,56	15,47	15,45
C22:2	Dokozadienska kiselina	3,29	3,8	3,56	3,85	3,59
C22:6n3 DHA	Dokosaheksaenoična kiselina (DHA)	22,96	22,46	22,72	22,04	22,53
neidentificirano		8,35	9,36	9,48	9,57	9,57

Kod obje vrste kamenica pri obje temperature skladištenja (-18 °C i -60 °C) udjeli polinezasićene linolne masne kiseline (C18:2 *cis*) su se smanjivali, dok su udjeli linolenske (C18:3n3) i dokozadienske kiseline (C22:2) tijekom skladištenja rasli. Udjeli arahidonske (C20:4n6), dokosaheksaenoične (DHA) i eikosapentaenoična (EPA) kiseline u kamenicama iz Krke su pri temperaturi skladištenja od -18 °C rasli, a pri temperaturi od -60 °C su se udjeli smanjivali. Slična situacija je bila i sa stonskim kamenicama no za razliku od kamenica iz Krke ovdje se udio eikosapentaenoične (EPA) kiseline smanjivao pri obje temperature skladištenja (-18 °C i -60 °C) .

Tablica 8. Udio masnih kiselina u svježim(travanj) i zamrznutim kamenicama sa ušća Krke

Uzorak		Krka (travanj)	K-18 (svibanj)	K-60 (svibanj)	K-18 (srpanj)	K-60 (srpanj)
Masna kiselina		Udio (%)	Udio (%)	Udio (%)	Udio (%)	Udio (%)
C14:0	Miristinska kiselina	4,51	5,06	4,92	5,09	4,94
C15:0	Pentadekanska kiselina	0,79	0,87	0,89	1,05	0,82
C16:0	Palmitinska kiselina	16,04	16,02	16,44	15,65	16,31
C16:1	Palmitoleinska kiselina	3,14	3,61	3,48	3,69	3,53
C17:0	Heptadekanoična kiselina	1,28	1,31	1,42	1,48	1,49
C18:0	Stearinska kiselina	5,43	5,1	5,16	5,12	5,18
C18:1 <i>cis</i>	Oleinska kiselina	8,84	7,04	6,51	7	6,51
C18:2 <i>cis</i>	Linolna kiselina	3,38	2,24	2,17	2,37	2,23
C18:3n3	Linolenska kiselina	1,55	1,76	1,75	1,91	1,81
C20:0	Arahidinska kiselina	1,33	1,58	1,48	1,74	1,55
C20:4n6	Arahidonska kiselina	2,95	3,06	3,19	3,16	3,24
C20:5n3 EPA	Eikosapentaenoična kiselina EPA	16,06	16,5	16,81	16,12	16,68
C22:2	Dokozadienska kiselina	4,48	4,88	4,87	4,92	4,9
C22:6n3 DHA	Dokosaheksaenoična kiselina (DHA)	22,44	21,87	22,1	21,29	21,9
Neidentificirano		7,78	9,1	8,78	9,41	8,93

Do najveće promjene u udjelima polinezasićenih masnih kiselina došlo je smanjivanjem udjela linolne kiseline u stonskim kamenicama pri obje temperature skladištenja pri čemu se najveće smanjenje dogodilo tijekom prvog mjeseca skladištenja. Kod mononezasićenih masnih kiselina rasli su udjeli palmitoleinske kiseline (C16:1) a smanjivali se udjeli oleinske kiseline i kod stonskih i kod kamenica iz Krke pri temperaturama skladištenja od -18 °C i -60 °C. Do najveće promjene u udjelima mononezasićenih masnih kiselina došlo je tijekom smanjivanja udjela oleinske kiseline u kamenicama iz Krke pri temperaturi od -18 °C nakon prvog mjeseca skladištenja.

Zaključak je da skladištenje kamenica pri temperaturama od -18 °C i -60 °C nije značajno utjecalo na sastav masnih kiselina jer se nisu značajno mijenjali udjeli istih.

5.5. Indeks kondicije

Tablica 9. Indeks kondicije kamenica pri različitim temperaturama zamrzavanja i periodima čuvanja u zamrzivaču

Vrijeme čuvanja kamenica (mjeseci)	Indeks kondicije kamenica (%)			
	k-18	k-60	s-18	s-60
0	24,58	24,58	28,41	28,41
1	24,21	22,44	24,39	25,28
3	20,38	22,14	23,86	18,96

Za izračun indeksa kondicije u travnju za svaku lokaciju (Ston i Krka) provedeno je vaganje mokrog mesa i ljuštore kamenica za 30 jedinki. Budući su kamenice skladištene na temperaturama od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, u svibnju su mokro meso i ljuštura kamenica vagani 20 puta, a u srpnju 15 puta za pojedinu temperaturu skladištenja.

Iz dobivenih podataka za indekse kondicije vidljivo je da je indeks kondicije na početku istraživanja u travnju bio većih kod stonskih kamenica (28,41 %), no pri temperaturi skladištenja na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ nakon tri mjeseca čuvanja došlo je do značajnog smanjenja indeksa kondicije (18,96 %), dok je smanjenje pri temperaturi skladištenja od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ nakon tri mjeseca čuvanja bilo gotovo dvostruko manje (23,86 %).

Kod kamenica iz Krke koje su imale početno nižu vrijednost indeksa kondicije (24,58 %) došlo je do značajno manjeg smanjenja nakon tri mjeseca čuvanja na temperaturi $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (22,14 %), dok je smanjenje indeksa kondicije bilo nešto značajnije za temperaturu čuvanja od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (20,38 %).

5.6. Proteini, voda, pepeo i masti

U velikom broju istraživanja o utjecaju zamrzavanja na kemijski sastav kamenica navodi se da se tijekom zamrzavanja u kamenicama ili nekim drugim vrstama školjaka smanjuje udio vode, ali da se smanjuju i udjeli proteina, masti i pepela, no u ovom istraživanju iako se smanjio sadržaj vode, povećali su se udjeli masti, proteina i pepela.

Tablica 10. Udio proteina u kamenicama

Vrijeme čuvanja kamenica (mjeseci)	Udio proteina u kamenicama (%)			
	k-18	k-60	s-18	s-60
0	7,35	7,35	7,76	7,76
1	7,82	8,41	8,00	8,51
3	8,95	8,83	8,84	8,89

Udio vode u kamenicama sa ušća Krke se smanjio za manje od 2 %, dok je smanjenje udjela vode kod stonskih kamenica bilo manje od 1 % pri obje temperature zamrzavanja (-18 °C i -60 °C)

Tablica 11. Udio vode u kamenicama

Vrijeme čuvanja kamenica (mjeseci)	Udio vode u kamenicama (%)			
	k-18	k-60	s-18	s-60
0	85,98	85,98	85,14	85,14
1	85,74	84,88	85,04	84,35
3	84,89	84,32	84,31	84,37

Povećanja udjela proteina, masti i pepela su također bila minimalna, odnosno udio proteina je porastao za manje od 2 %, udio masti za manje od 1 % i udio pepela za manje od 0,3 % kod obje vrste kamenica, pri obje temperature skladištenja (-18 °C i -60 °C).

Tablica 12. Udio pepela u kamenicama

Vrijeme čuvanja kamenica (mjeseci)	Udio pepela u kamenicama (%)			
	k-18	k-60	s-18	s-60
0	2,95	2,95	2,78	2,78
1	2,73	2,89	2,99	3,00
3	3,01	3,08	3,07	2,97

Tablica 13. Udio masti u kamenicama

Vrijeme čuvanja kamenica (mjeseci)	Udio masti u kamenicama (%)			
	k-18	k-60	s-18	s-60
0	1,42	1,42	1,55	1,55
1	1,25	1,51	1,63	1,57
3	1,76	1,95	1,92	1,98

Iako je tijekom zamrzavanja došlo do rasta TBA koji je rezultat oksidacije lipida, a pogotovo oksidacije polinezasićenih masnih kiselina, taj proces nije značajno utjecao na sadržaj masti u ispitivanim kamenicama. Za udio pepela se može reći da je ostao gotovo nepromijenjen s obzirom da je porastao za manje od 0,3 %, što se može dovesti u vezu sa, također, malim smanjenjem udjela vode u kamenicama.

6.RASPRAVA

Cilj ovoga rada bio je utvrditi kemijski sastav i promjene istog prilikom konzerviranja zamrzavanjem na niskim temperaturama i čuvanju pri različitim temperaturama i vremenu skladištenja kod kamenica prikupljenih na dva različita uzgojna područja.

Ukupni hlapivi bazni dušik (TVB-N) značajan je pokazatelj svježine, sigurnosti i kvalitete plodova mora. Stoga, ako kemijska ispitivanja pokažu da su razine TVB-N iznad propisanih granica, zaključuje se da proizvodi više nisu prikladni za ljudsku prehranu. Kamenice su jedna od najraširenijih školjkaša na tržištu zbog svoje nutritivne vrijednosti i okusa, no vrlo su podložne propadanju zbog velikog udjela vode te krhkog mišićnog tkiva. Najveća dozvoljena razina TVB-N u ribi i ribljim proizvodima iznosi 35 mg N/100 g dok je dozvoljena granica kod dagnje 3 mg N/100 g (Castro i sur., 2012). Na temelju dobivenih rezultata određivanja TVB-N može se zaključiti da nema značajnih odstupanja u porastu vrijednosti TVB-N pri izlaganju različitim temperaturama zamrzavanja (-18 °C i -60 °C), no uočen je blagi porast vrijednosti TVB-N nakon 1 i 3 mjeseca skladištenja u zamrzivaču kod kamenica sa ušća Krke u usporedbi s početnom vrijednošću TVB-N kod Stonskih kamenica. Moguće je da na dobivene rezultate utjecalo podrijetlo dviju skupina kamenica i njihova početna svježina, koja je dobre kvalitete. Ovi su rezultati u skladu sa studijama, poput one koju su proveli Lee i suradnici (2017), koji su istraživali kako početna svježina sirovih kamenica i trajanje skladištenja u zamrzivaču utječu na njihovu ukupnu kvalitetu. Rezultati su pokazali da su vrijednosti TVB-N blago porasle tijekom 12-mjesečnog perioda skladištenja za kamenice s vrlo dobrom kvalitetom svježine, te blago porasle za kamenice s dobrom kvalitetom svježine. Nasuprot tome, vrijednosti TVB-N značajno su porasle za kamenice srednje i loše kvalitete svježine.

pH je koristan alat za određivanje kvalitete morskih plodova, uključujući mekušce. Kada se kamenice skladište, pH vrijednost se smanjuje zbog enzimskih reakcija koje pretvaraju glikogen u mliječnu kiselinu. Ovaj pad pH vrijednosti pokreće djelovanje proteolitičkih enzima poput katepsina, a također omogućuje mikroorganizmima kvarenja da metaboliziraju aminokiseline iz tkiva kamenica, što rezultira proizvodnjom raznih hlapljivih spojeva koji mogu dovesti do neugodnog okusa i mirisa. Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti da se pH u uzrocima kamenica povećao tijekom perioda skladištenja. Ovo povećanje bilo je izraženije nakon prvog mjeseca skladištenja na temperaturama od -18 °C i -60 °C, gdje su pH vrijednosti porasle za približno 0,2 do 0,4. Međutim, nisu primijećene značajne promjene tijekom sljedeća dva mjeseca skladištenja, s

pH fluktuacijom unutar raspona od 0,1. Iz navedenog proizlazi da se kvaliteta kamenica ovog istraživanja nije značajno promijenila s obzirom na pH vrijednost jer problem nastaje kada pH kamenica padne ispod 5 i za takve kamenice se onda smatra da imaju lošu kvalitetu, dok se za one kamenice čija je pH vrijednost jednaka ili iznad 6 smatra da imaju dobru kvalitetu. Ovi rezultati su u suprotnosti s prijašnjim istraživanjima drugih autora, koja su ukazala na blagi pad pH razine tijekom skladištenja kamenica, bilo na temperaturama zamrzavanja ili hlađenja. Prema istraživanju koje je proveo Zhang (2014) o utjecaju suhog i hladnog skladištenja na 4 °C na istočnjačke kamenice (*Crassostrea virginica*). Izmjereni početni pH svježih kamenica bio je 6,6, koji se smanjio za 0,2 nakon skladištenja od 25 dana. U svojoj studiji, Songsaeng i suradnici (2010) istraživali su modifikacije fizičkih, kemijskih, mikrobioloških i senzorskih svojstava mesa kamenica *Crassostrea belcheri* kada se zamrzavaju pomoću dvije različite metode: IQF pristupom i tehnikom zamrznute kontaktne ploče (CPF). Razina pH kamenica ostala je relativno stabilna, u rasponu od 6,2 do 6,4 tijekom cijelog 12-mjesečnog razdoblja skladištenja u zamrzivaču, bez obzira na korištenu tehniku zamrzavanja.

Tijekom skladištenja na temperaturama od -18 °C i -60 °C, razine TVB-N, pH i TBA pokazale su uzlazni trend, iako je povećanje bilo nešto manje izraženo na -60 °C. Nakon prvih mjesec dana skladištenja porast TBA i pH postao je zamjetniji kod većine kamenica, osim kod onih s ušća rijeke Krke koje su čuvane na -18 °C. Zanimljivo je da se vrijednost TBA za uzorke uzete na Krki povećala između 1. i 3. mjeseca skladištenja. Dobiveni rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima Jeong (1990) i suradnika u čijem istraživanju također dolazi do laganog porasta TBA tijekom skladištenja. Bitno je naglasiti da su kamenice sa TBA vrijednostima između 7 mg MDA/kg i 8 mg MDA/kg prihvatljive za potrošače i zadovoljavajuće kvalitete, dok se za one sa TBA vrijednostima ispod 3 mg MDA/kg smatra da imaju izvrsnu kvalitetu. Iz navedenog se može zaključiti da su analizirane kamenice nakon skladištenja s obzirom na TBA vrijednosti unutar granica prihvatljivosti, dok su svježije kamenice s obzirom na TBA vrijednost imale gotovo izvrsnu kvalitetu. Tijekom svoje studije iz 1990., Koizumi i sur. ispitivali su razgradnju lipida i potencijalnu inhibiciju ovog procesa kod japanskih kamenica (*Magallana gigas*) kada su skladištene u zamrzivaču. Kako bi se istražio utjecaj antioksidansa, serija oljuštenih kamenica tretirana je butiliranim hidroksitoluenom i prirodnim vitaminom E, a zatim stavljena na skladištenje pri -20 °C tijekom 12 mjeseci. Vrijednosti TBA blago su porasle u svim uzorcima, no među uzorcima nisu identificirane značajne razlike u stopama povećanja TBA vrijednosti nakon 12 mjeseci. Istraživanje koje su proveli Schwartz i Watts (1959) uključivao je kamenice kako bi istražili učinke 0,1% otopine askorbinske kiseline na njihovu kvalitetu tijekom skladištenja na -20 °C u razdoblju od 8 mjeseci. Uspoređivali su kamenice koje su tretirane askorbinskom kiselinom

s netretiranim. Rezultati su pokazali da su kamenice tretirane askorbinskom kiselinom pokazale minimalne promjene vrijednosti TBA, te su čak i nakon 6 mjeseci skladištenja zadržale svoju izraženu aromu "kamenice". S druge strane, netretirane kamenice nakon samo 2 mjeseca skladištenja razvile su blagi miris "pokvarene ribe", koji se s vremenom pojačao zajedno s povećanjem vrijednosti TBA.

Tijekom analize masnih kiselina i u stonskim kamenicama i u kamenicama iz Krke, identificirano je 14 različitih masnih kiselina od kojih 6 zasićenih, 6 polinezasićenih i 2 mononezasićene masne kiseline. I kod stonskih i kod kamenica iz Krke nakon skladištenja pri temperaturama od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, najzastupljenije su bile polinezasićene masne kiseline (PUFA). Manjim dijelom bile su zastupljene zasićene masne kiseline (SFA) i sa najmanjim udjelom mononezasićene masne kiseline (MUFA). Palmitinska i stearinska su najzastupljenije zasićene masne kiseline, dok su od polinezasićenih masnih kiselina najzastupljenije dokosaheksaenoična i eikosapentaenoična kiselina. Od mononezasićenih kiselina najzastupljenija je bila oleinska kiselina koja je tijekom prvog ispitivanja u travnju imala nešto veći udio kod kamenica iz Krke. Udjeli zasićenih masnih kiselina su kod obje vrste kamenica u većini slučajeva tijekom skladištenja neznatno rasli ili imali vrijednosti približne onim početnima i pri temperaturi od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i pri temperaturi od $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kod obje vrste kamenica i pri obje temperature skladištenja udjeli polinezasićene linolne masne kiseline su se smanjivali, dok su udjeli linolenske i dokozadienske kiseline tijekom skladištenja rasli. Udjeli arahidonske, dokosaheksaenoične (DHA) i eikosapentaenoične (EPA) kiseline u kamenicama iz Krke su pri temperaturi skladištenja od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ su rasli, a pri temperaturi od $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ se smanjivali. Slična situacija je bila i sa stonskim kamenicama, no kod stonskih kamenica se udio eikosapentaenoične (EPA) kiseline smanjivao pri obje temperature skladištenja. Ersoy i Şereflişan (2010) su uspoređivali približni sastav i profil masnih kiselina kod dviju vrsta slatkovodnih dagnji *Unio terminalis* i *Potamida littoralis*. Glavne masne kiseline identificirane u obje vrste dagnji bile su palmitinska kiselina (C16:0), palmitoleinska kiselina (C16:1), stearinska kiselina (C18:0), oleinska kiselina (C18:1), C18:3n6; C22:2n6; C18:3n3; EPA (C20:5n3) i DHA (C22:6n3). Također je kod obje vrste bila veća razina ω -3 od ω -6 masnih kiselina, pri čemu je najzastupljenija ω -3 masna kiselina bila EPA (C20:5n3). Moniruzzaman i sur. (2021) su procjenjivali 7 ekonomski važnih vrsta mekušaca u smislu određivanja njihovog približnog sastava, profila aminokiselina, profila masnih kiselina, kolesterola i sadržaja teških metala. Istraživanje su provodili na školjkašima (dagnje, kamenice) i gastropodama (puževi) koji su prikupljeni iz slatkovodnih i morskih okoliša Bangladeša. Tom prilikom je identificirana 21 masna kiselina od kojih se 5 odnosilo na zasićene masne kiseline, 5 na polinezasićene i 4 na mononezasićene masne kiseline.

Indeks kondicije kod školjkaša odnosi se na postotak količine mišića unutar ljuštura. Praćenjem razine ovog parametra utvrđuje se dinamika promjene količine mesa u školjkaša koja se kroz godinu mijenja ovisno o brojnim biotičkim i abiotičkim čimbenicima kao što su: razdoblje spolne aktivnosti, zdravstveno stanje školjkaša, dostupnost hrane, temperatura, salinitet, pH, koncentracija otopljenog kisika i onečišćenje okoliša. Na temelju dobivenih rezultata razvidno je da je indeks kondicije stonske kamenice bio veći (28,41 %) na početku istraživanja u travnju. Međutim, nakon tri mjeseca skladištenja na temperaturi od -60 °C, došlo je do značajnog smanjenja indeksa kondicije (18,96 %). S druge strane, smanjenje indeksa kondicije bilo znatno manje pri skladištenju na temperaturi od -18 °C u istom trajanju (23,86 %). Kod uzoraka kamenice iz Krke, koje su inicijalno imale nižu vrijednost indeksa kondicije (24,58 %), manji je pad nakon tri mjeseca skladištenja na -60 °C (22,14 %), dok je pad bio nešto značajniji u uzorcima skladištenim na -18 °C (20,38 %). Prema dobivenim rezultatima, viša početna vrijednost indeksa kondicije kod stonskih kamenica može ukazivati na bolje uvjete rasta i bolju opskrbljenost hranom, no naknadno smanjenje indeksa kondicije kod stonskih kamenica ukazuju na to da su podložnije degradaciji mišića brzim zamrzavanjem od kamenica prikupljenih na ušću Krke.

Brojne studije istraživale su utjecaj zamrzavanja na kemijski sastav kamenica, dosljedno izvješćujući o smanjenju udjela vode uz smanjenje udjela proteina, masti i pepela. Međutim, ovim istraživanjem dobili smo nešto drugačije rezultate. Iako se udio vode smanjio, zapravo je došlo do povećanja udjela masti, proteina i pepela. Kamenicama s Krke zabilježen je pad udjela vode za manje od 2 %, a kamenicama iz Stona za manje od 1 % na obje temperature zamrzavanja. Povećanja sadržaja bjelančevina, masti i pepela također su bila minimalna, s povećanjem sadržaja bjelančevina za manje od 2 %, udjela masti za manje od 1 %, a udjela pepela za manje od 0,3 %. Ove male promjene u kemijskom sastavu kamenica mogu se pripisati njihovoj početnoj svježini i kvaliteti prije zamrzavanja. Ovakvi rezultati se mogu pripisati IQF metodi konzerviranja stonskih kamenica i kamenica iz Krke, a koja podrazumijeva proces brzog zamrzavanja. Slično se ovako male promjene u kemijskom sastavu kamenica mogu pripisati dobroj početnoj svježini odnosno kvaliteti kamenica koje su podvrgnute zamrzavanju. Očito je tijekom brzog zamrzavanja došlo samo do stvaranja sitnih kristala leda koji nisu izazvali promjene u mišićnim stanicama odnosno nije došlo do denaturacije proteina ali i degradacije pojedinih staničnih struktura (Songsaeng i sur., 2010; Nakazawa i Okazaki, 2020). Budući su udjeli proteina tijekom skladištenja rasli, može se zaključiti da je rast TVBN-a i u stonskim i u kamenicama iz Krke, pri obje temperature zamrzavanja (-18 °C i -60 °C) rezultat razgradnje neproteinskog dušika u kamenicama (Hong Hee i sur., 2017).

7.ZAKLJUČAK

- I. Na osnovu svih dobivenih rezultata za stonske kamenice i kamenice iz Krke može se zaključiti da se IQF metoda pokazala dobrim načinom konzerviranja kamenica koje su skladištene kroz 3 mjeseca pri temperaturama od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kvaliteta kamenica nakon zamrzavanja po svim kemijskim parametrima i dalje je ostala prihvatljiva za potrošače.
- II. Nakon obrađenih podataka, može se zaključiti da niti kod jednog kemijskog parametra nije došlo do drastičnih promjena, odnosno vrijednosti naposljetku pokusa i dalje su bile u okviru dozvoljenih granica bez narušavanja kemijske ispravnosti i jedne skupine kamenica.
- III. Razina TVB-N nije varirala ovisno o temperaturama skladištenja, no zamijećen je blagi porast nakon 3 mjeseca skladištenja kod kamenica sa ušća Krke. Na razliku u dobivenim rezultatima prvenstveno je moglo utjecati različito podrijetlo skupina kamenica. Porast kod pH bio je najveći u prvom mjesecu skladištenja, no bez obzira na to vrijednost niti u jednom trenu nije pala ispod 5 pH jedinica, kada se smatra da je kvaliteta kamenica znatno narušena. TBA vrijednosti porasle su tijekom tri mjeseca skladištenja, a povećanje je bilo izraženije pri $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, no vrijednosti su ostale unutar dozvoljenih okvira. Udjeli masnih kiselina su neznatno rasli neovisno o periodima i temperaturama skladištenja. Udio vode se smanjio, dok su udjeli masti, pepela i proteina minimalno porasli.
- IV. Ove male promjene u kemijskom sastavu kamenica mogu se pripisati njihovoj početnoj svježini i kvaliteti prije zamrzavanja, ali i IQF metodi konzerviranja pri kojoj je došlo samo do stvaranja sitnih kristala leda koji nisu izazvali promjene u mišićnim stanicama odnosno nije došlo do denaturacije proteina i degradacije pojedinih staničnih struktura.
- V. U ovom istraživanju analizirane vrste prikupljene su u ožujku, samim time se otvara mogućnost provođenja istraživanja u kojima bi se utvrdio njihov kemijski sastav kroz cijelu godinu tj. promjene kod kamenica prikupljenih kroz preostale mjesece u godini. Mjesec prikupljanja kamenica igra veliku ulogu s obzirom na to da postoji utjecaj

sezonskih varijacija u temperaturi, salinitetu i koncentraciji fitoplanktona na konačne rezultate. Također je bitno naglasiti da se ovakav tip konzerviranja odnosio samo na kraće periode zamrzavanja, odnosno kemijski sastav ostao je relativno stabilan kroz 3 mjeseca zamrzavanja.

8. POPIS LITERATURE

- 1) Abad, M., Ruiz, C., Martinez, D., Mosquera, G., & Sánchez, J. (1995). Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 110(2), 109-118.
- 2) Banovac, P. (2023). Primjena umjetnog mriješćenja u uzgoju kamenica. Završni rad, Fakultet prirodnih znanosti, Pula
- 3) Carić, M., Jasprica, N., & Kršinić, F. (2000). Kamenica u Malostonskom zaljevu. *Dubrovnik, časopis za književnost i znanost*, 1-2.
- 4) Castro, P., Millán, R., Penedo, J. C., Sanjuán, E., Santana, A., & Caballero, M. J. (2012). Effect of storage conditions on total volatile base nitrogen determinations in fish muscle extracts. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(5), 519-523.
- 5) Da Silva, B. A., de Fátima Henriques Lourenço, L., Silva Silva, N., de Jesus Costa Fernandes, G., Da Rocha, K. S., Joele, M. R. S. P., & Araújo, E. A. F. (2023). The Evaluation of Oyster Marinating (*Crassostrea Gasar*) and Pasteurization Process in Vacuum Packaging during Storage. *Journal of Culinary Science & Technology*, 21(5), 759-776.
- 6) Dridi, S., Romdhane, M. S., & Elcafsi, M. H. (2007). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizertlagoon, Tunisia. *Aquaculture*, 263(1-4), 238-248.
- 7) Ersoy, B., & Şereflişan, H. (2010). The proximate composition and fattyacid profiles of edible parts of two fresh water mussels. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10(1).
- 8) Frazier, J. M., & George, S. G. (1983). Cadmium kinetics in oysters—a comparative study of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 76, 55-61.
- 9) Gavrilović, A. (2011). Utjecaj planktona na morfohistokemijske i biokemijske osobine probavnog sustava kamenice, *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) Malostonskog zaljeva. Završni rad, Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- 10) Gavrilović, A. i Petrincec, Z. (2003). Proizvodnja i tehnologija uzgoja kamenica *O. edulis* u Malostonskom zaljevu – perspektive razvoja. *Vet. stn.* 34(1): 5-11.
- 11) Gavrilović, A., Dujaković, J. Jug., Gjurčević, E., Ljubičić, A. (2008). Utjecaj indeksa kondicije i stupnja infestacije ljuštore polihetom *Polydora* spp. na kvalitetu europske plosnate kamenice *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758) iz Malostonskog zaljeva. 2 Zbornik

- radova,43 Hrvatski i 3 Međunarodni simpozij agronoma, Zagreb : Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska, str. 742-746
- 12) Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Ljubičić, A., Strunjak-Perović, I., Čož-Rakovac, R., Topić Popović, N., & Jadan, M. (2011). Utjecaj uzgojne tehnologije na kvalitetu mesa i preživljavanje kamenice *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) u Malostonskom zaljevu. 46th Croatian&6th International Symposium on Agriculture. Section 6. Fisheries, Game Management and Beekeeping, 159-160.
 - 13) Hajder, M. (2020). Uzgoj školjkaša uz istočnu obalu Jadrana. Završni rad. Sveučilišni odjel za studije mora, Sveučilište u Splitu
 - 14) Hazel, J. R. (1995). Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation?. *Annual review of physiology*, 57(1), 19-42.
 - 15) Héral, M., & Deslous-Paoli, J. M. (1991). Oyster culture in European countries. *Estuarine and marine bivalve mollusk culture*, 154-190.
 - 16) Hong Hee, L. E. E., Jung, W. Y., Lee, W. K., & Min, J. G. (2017). Initial freshness of pacific oyster (*Crassostea gigas*) effects its quality and self-life during freezing storage. *Journal of Food and Nutrition Research*, 5(9), 629-635.
 - 17) Kljaković-Gašpić, Z., Ujević, I., Zvonarić, T., & Barić, A. (2007). Biomonitoring of trace metals (Cu, Cd, Cr, Hg, Pb, Zn) in Mali Ston Bay (eastern Adriatic) using the Mediterranean blue mussel (1998-2005). *Acta Adriatica*, 48(1), 73-88.
 - 18) Koizumi, C., Jeong, B. Y., & Ohshima, T. (1990). Fatty chain composition of ether and ester glycerophospholipids in the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Lipids*, 25(7), 363-370.
 - 19) Labudović, K. (2023). Onečišćenje mora mikroplastikom . Časopis za pravna i društvena pitanja Pravnog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 7(1), 59-79.
 - 20) Llobrera, A. T., Bulalacao, M. L., & Suñaz, N. (1986). Effects of storage on the microbial quality of slipper oysters, *Crassostrea iredalei*. In *The First Asian Fisheries Forum. Proceedings of the First Asian Fisheries Forum, 26-31 May 1986, Manila, Philippines* (pp. 437-442).
 - 21) Mašić, M. (2004). Higijena i tehnologija prerade školjaka. *Meso: Prvi hrvatski časopis o mesu*, 6(4), 40-45.
 - 22) Matačić, S. (2020). Kemijski sastav kamenice *Ostrea edulis* i dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzgojenih u Novigradskom moru. Diplomski rad. Sveučilište u Zadru, Zadar. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:162:927035>

- 23) Moniruzzaman, M., Sku, S., Chowdhury, P., Tanu, M. B., Yeasmine, S., Hossen, M. N., & Mahmud, Y. (2021). Nutritional evaluation of some economically important marine and freshwater mollusc species of Bangladesh. *Heliyon*, 7(5).
- 24) Nakazawa, N., & Okazaki, E. (2020). Recent research on factors influencing the quality of frozen sea food. *Fisheries Science*, 86, 231-244.
- 25) Otwell, W. S., & Garrido, V. M. (1995). Total quality assurance (TQA) and hazard analysis critical control point (HACCP): manual for clam production and processing.
- 26) Pećarević, M., & Bratoš, A. (2004). Standardi kakvoće, prerada i pakiranje kamenica. *Naše more: znanstveni časopis za more i pomorstvo*, 51(1-2), 69-73.
- 27) Pušić, I. (1962): Nešto o školjkama, o njihovoj valjanosti, odnosno o škodljivosti. *Veterinarski glasnik* br.16,781.
- 28) Radetić A. (2010) Utjecaj nekih ekoloških čimbenika na sezonske promjene indeksa kondicije uzgojnih populacija europske plosnate kamenice *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) u Malostonskom zaljevu. Diplomski rad, Sveučilište u Dubrovniku, Dubrovnik, Odjel za akvakulturu, str. 14-15.
- 29) Schwartz, M. G., & Watts, B. M. (1959). Ascorbic acid as an antioxidant for frozen oysters and effect of copper-chelating ability of oyster tissue on ascorbic acid oxidation. *Com. Fisheries Rev*, 21(3), 1.
- 30) Segarić, R. (2020). Poslovanje tvrtke Cromaris dd Zadar. Završni rad, Veleučilište s pravom javnosti Baltazar Zaprešić, Biograd na Moru
- 31) Seung-Gil, J., Jeong-Goo, K., Tae-Hyun, R., & Kwang-Soo, O. (2006). Processing and shelf-life stabilities of flavoring substances of the smoke-dried oysters. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(2), 85-93
- 32) Skaramuca, B., Teskeredžić, E., & Teskeredžić, Z. (1997). Mariculture in Croatia, history and perspectives. *Croatian Journal of Fisheries*, 55(1), 19-26.
- 33) Skitarelić, N. (2020). Otrovanja riba. Završni rad, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 34) Smedes, F. (1999). Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst*, 124(11), 1711-1718.
- 35) Songsaeng, S., Sophanodora, P., Kaewsrithong, J., & Ohshima, T. (2010). Quality changes in oyster (*Crassostrea belcheri*) during frozen storage as affected by freezing and antioxidant. *Food chemistry*, 123(2), 286-290.
- 36) Srinivasan, S., Xiong, Y. L., & Blanchard, S. P. (1997). Effects of freezing and thawing methods and storage time on thermal properties of freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(1), 37-44.

- 37) Stagličić, N., Šegvić-Bubić, T., Ezgeta-Balić, D., Varezić, D. B., Grubišić, L., Žuvić, L. & Briski, E. (2020). Distribution patterns of two co-existing oyster species in the northern Adriatic Sea: The native European flat oyster *Ostrea edulis* and the non-native Pacific oyster *Magallana gigas*. *Ecological Indicators*, 113, 106233.
- 38) Šarušić, G. (2000). Marikultura na hrvatskim otocima. *Croatian Journal of Fisheries: Ribarstvo*, 58(3), 111-118.
- 39) Šoša, B. (1989): Higijena i tehnologija prerade morske ribe. Školska knjiga. Zagreb: 184pp.
- 40) Tomšić, S., i Lovrić, J. (2004). Povijesni pregled uzgoja kamenica u Malostonskom zaljevu. *Naše more: znanstveni časopis za more i pomorstvo*, 51(1-2), 17-23.
- 41) Treer, T., Safner, R., Aničić, I., & Lovrinov, M. (1995). *Ribarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, 453 str
- 42) Yonge, C. M. (1926). Structure and physiology of the organs of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 14(2), 295-386.
- 43) Zelić, I. (2015). Uzgoj školjkaša. Završni rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Splitu.
- 44) Zhang, J. (2014). Studies on methods and standards for evaluating quality of fresh post-harvest oyster (*Crassostrea virginica*) . Auburn University
- 45) Zrnčić, S., Oraić, D., Mihaljević, Ž., Zanella, D. (2007). Impact of varying cultivation depths on growth rate and survival of the European flat oyster *Ostrea Edulis*, L., *Aquaculture research*, 38(12), 1305-1310.
- 46) Zrnčić, S., Salajster, M., & Oraić, D. (2001). Preventiva, kontrola bolesti i ocjena higijenske kakvoće riba i školjkaša. Projekt: Razvitak službi za potporu obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. Hrvatski veterinarski institut. Zagreb.
- 47) Živković, J. i Hađiosmanović M. (1996): Bakterijska trovanja hranom. Veterinarski priručnik 5 izdanje. Medicinska naklada Zagreb.

Internetski izvori

- 48) https://ribarstvo.mps.hr/UserDocsImages/NSP/NSP_OP_06112013/Nacionalni%20strate%C5%A1ki%20plan%20razvoja%20ribarstva%20Republike%20Hrvatske.pdf
- 49) <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/hr/sheet/120/akvakulturna-proizvodnja-u-europskoj-uniji>
- 50) Direktiva 91/492/EEC ; preuzeto sa <https://www.fao.org/faolex/results/details/en/c/LEX-FAOC005679/>
- 51) <https://www.vliz.be/niet-inheemse-soorten/en/bonamia-ostreae>
- 52) <https://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=10254>
- 53) <https://faolex.fao.org/docs/pdf/cro158202.pdf>
- 54) <https://www.malistonoster.com/en/>
- 55) <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=CELEX%3A31991L0492>
- 56) <https://ribarstvo.mps.hr/default.aspx?id=228>
- 57) <https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/datastore/filestore/82/Specifikacija-Malostonska-kamenica-11.pdf>