Utjecaj dodatka mikroalgi u hranu kokoši nesilica na senzorna svojstva jaja

Mijač, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:856246

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

UTJECAJ DODATKA MIKROALGI U HRANU KOKOŠI NESILICA NA SENZORNA SVOJSTVA JAJA

DIPLOMSKI RAD

Ivana Mijač

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:
Proizvodnja i prerada mesa

UTJECAJ DODATKA MIKROALGI U HRANU KOKOŠI NESILICA NA SENZORNA SVOJSTVA JAJA

DIPLOMSKI RAD

Ivana Mijač

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Ivica Kos

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Ivana Mijač, JMBAG 0178092475, rođena 11. 02. 1994. u Čapljini (Bosna i Hercegovina) izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

UTJECAJ DODATKA MIKROALGI U HRANU KOKOŠI NESILICA NA SENZORNA SVOJSTVA JAJA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice Ivana Mijač, JMBAG 0178092475, naslova

UTJECAJ DODATKA MIKROALGI U HRANU KOKOŠI NESILICA NA SENZORNA SVOJSTVA JAJA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo: potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Ivica Kos, mentor _____
2. prof. dr. sc. Zlatko Janječić, član _____
3. doc. dr. sc. Dalibor Bedeković, član _____

Zahvala

Prije svega, želim se zahvaliti svojoj obitelji koja je kroz sve ove godine bila uz mene. Uz svaki položeni i nepoloženi ispit, uz svaku neprospavanu noć, svaku suzu i svaki smijeh. Hvala mom tati, bratu i mojoj Mariji što su bez obzira na sve prepreke i dalje vjerovali da ću uspjeti i kada sam bila na krivom putu.

Hvala mom Marku što je moja najveća potpora, oslonac i motivacija.

Hvala mojim kolegama sa fakulteta bez kojih danas ne bih bila ovdje gdje jesam, neki od vas su prijatelji za cijeli život. Hvala mojim curama iz studentskog doma Stjepan Radić, koje su 6 godina bile moje druga obitelj, vaše jutarnje kave i druženja su nešto što ću nositi u sjećanju do kraja života.

Veliko i neizmjerno hvala mom mentoru izv. prof. dr. sc. Ivici Kosu, koji osim što je izvrstan i kvalitetan profesor, pokazao i da je veliki prijatelj. Hvala na strpljenju, hvala na pomoći koja je omogućila ovaj diplomski rad i hvala na znanju koje ste prenijeli.

HVALA SVIMA!

Sadržaj

1. Uvod **1**

2. Pregled literature **3**

2.1. Mikroalge 3

2.1.1. Schizochytrium limacinum 5

2.2. Kemijski sastav mikroalgi 6

2.2.1. Proteini 6

2.2.2. Masne kiseline 8

2.2.3. Ugljikohidrati 9

2.2.4. Vitamini i minerali 9

2.2.5. Pigmenti 10

2.2.6. Antioksidativna i antikancerogena svojstva mikroalgi 12

2.3. Upotreba mikroalgi u ljudskoj prehrani 13

2.4. Upotreba mikroalgi u hranidbi životinja 15

2.5. Utjecaj dodatka mikroalgi u hranidbu kokoši nesilica na kakvoću jaja 17

3. Materijali i metode **19**

4. Rezultati i rasprava **21**

5. Zaključak **31**

6. Literatura **32**

7. Životopis **38**

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Ivana Mijač**, naslova:

UTJECAJ DODATKA MIKROALGI U HRANU KOKOŠI NESILICA NA SENZORNA SVOJSTVA JAJA

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj dodatka 0,5 i 1 % mikroalgi (*Schyzochytrium limacinum*) u hranu kokoši nesilica na senzorna svojstva jaja. U istraživanju je korišteno 36 TETRA-SL brown nesilica u dobi od 35 do 43 tjedna koje su bile podijeljene slučajnim odabirom u tri hranidbena tretmana. Svaki tretman proveden je na četiri kokoši u tri ponavljanja držanih pojedinačno u kavezima na podu od žičane mreže. Tijekom pokusa kokoši kontrolnog tretmana (A) hranjene su komercijalnom smjesom, dok su kokoši u pokusnim tretmanima hranjene istom smjesom uz dodatak 0,5 (tretman B) i 1 % mikroalgi (tretman C). Senzorna analiza provedena je nakon 8 tjedana hranidbe kokoši primjenom triangl i hedonističkog testa na žumanjcima kuhanih jaja. Senzorni analitičari (n=19) bili su prethodno educirani te upućeni izvedbu triangl testa i hedonističkog testa. Dobiveni podaci triangl testa obrađeni su izračunom statističke značajnosti bazirane na broju točnih odgovora u odnosu na ukupan broj odgovora, dok su podaci hedonističkih testova obrađeni pomoću analize varijance s LSD testom za usporedbu tretmana. Uočljivu razliku između tretmana A i C iskazalo je 12 od 19 ocjenjivača (63,2 %) što predstavlja i statistički značajnu razliku ($P<0,01$). Analitičari su naveli uočljive razlike u okusu žumanjka u 57,9 % slučajeva, u boji žutanjka u 26,3 % slučajeva, i u teksturi žutanjka u 15,8 % slučajeva, dok razlike u mirisu žutanjka nisu iskazane. Ukupna dopadljivost i prihvatljivost mirisa nisu bili značajno različiti između tretmana ($P>0,05$). Izraženost boje žutanjka tretmana A iznosila je 3,05, tretmana B 3,63, a tretmana C 3,74, pri čemu je utvrđena statistički značajna razlika između tretmana A i C ($P<0,05$). Ovim istraživanjem utvrđen je pozitivan učinak dodatka 1 % mikroalgi na izraženost boje žutanjka bez značajnog utjecaja na ostala svojstva što upućuje na opravdanost dodavanja mikroalgi u hranu za kokoši nesilice.

Ključne riječi: kokoši nesilice, senzorna analiza, žumanjak, mikroalge, triangl test, dopadljivost, *Schyzochytrium*

Summary

Of the master's thesis – student **Ivana Mijač,** entitled:

EFFECT OF MICROALGAE SUPPLEMENT IN LAYING HEN DIET ON EGG SENSORY TRAITS

The aim of this paper was to determine the influence of supplementing 0.5 and 1% microalgae (*Schyzochytrium limacinum*) in laying hen feed on egg sensory traits. In this study, 36 TETRA-SL brown hens in the age of 35 to 43 weeks were used and divided randomly in three feed treatments. Each treatment was performed on four hens in three replications which were individually caged on wire-mesh floor. During the experiment, hens in control treatment (A) were fed with a commercial mixture, while hens in experimental treatments were fed with the same mixture supplemented with 0.5 (treatment B) and 1% microalgae (treatment C). Sensory analysis was performed after 8 weeks of chicken feeding by triangle and hedonic tests on cooked egg's yolks. Assessors (n=19) have been trained previously and were instructed in the triangle test and hedonic test. The obtained data from triangle test were further evaluated by computing statistical significance based on the number of correct responses in relation to the total number of responses, while hedonic test data were evaluated by the analysis of variance with the LSD test for treatment comparison. The perceptible difference between treatments A and C was found by 12 out of 19 evaluators (63.2%), which also represents a statistically significant difference ($P<0.01$). Assessors indicated that there were noticeable differences in yolk taste in 57.9% of cases, in yolk color in 26.3% cases, and in yolk texture in 15.8% cases, while differences in yolk odor were not reported. Overall likeability and odor acceptability were not significantly different between treatments ($P>0.05$). The yolk color expression of treatment A was 3.05, of treatment B 3.63 and of treatment C 3.74, with a statistically significant difference between treatment A and C ($P<0.05$). With this research a positive effect of the addition of 1% microalgae on the yolk color expression was determined without any significant influence on other traits indicating the justification of supplementing microalgae to the feed for the laying hens.

Keywords: laying hens, sensory analysis, yolk, microalgae, triangle test, likability, *Schyzochytrium*

1. Uvod

Uravnotežena prehrana i moderan način fizičke aktivnosti doprinose održavanju zdravog načina života. U današnje vrijeme kada je svjetska populacija sve brojnija, povećana je i potražnja za hranom, a zbog povećanja financijskih mogućnosti i potražnja za hranom animalnog podrijetla. Mnogi su stručnjaci i proizvođači hrane u potrazi za kvalitetnim i nutritivno bogatim namirnicama koje će zamijeniti umjetne prehrambene dodatke. Povećana potražnja za mesom biti će posebno dramatična za stočarstvo (FAO 2011.) budući da su kukuruz i soja dva glavna konvencionalna izvora hrane za životinje. Današnja potražnja za navedenim kulturama je neodrživa s obzirom na proizvodnju, stoga je potrebno pronaći alternativu za ove sastojke u korist održavanja potrebne ravnoteže između proizvodnje hrane za ljudsku upotrebu, proizvodnje hrane za životinje i biogoriva (Madeira i sur. 2017.). Europska komisija za poljoprivredu i ruralni razvoj 2001. godine zabranila je upotrebu animalnih derivata u hranidbi kokoši nesilica. Iz ovog je razloga potrebno provesti istraživanja i pronaći nove izvore biljnog podrijetla bogate nutritivnim vrijednostima koji će zamijeniti do sada korištene tradicionalne sastojke (Parpinello i sur. 2004.). Degradacija zemljišta, deprivacija vode i drastične klimatske promjene također su veliki izazovi za poljoprivredu i stočarstvo (Madeira i sur. 2017.).

Sve više istraživanja dovodi do otkrića novih kvalitetnih namirnica, a jedne od tih namirnica upravo su mikroalge. Mikroalge su pretežno morski autotrofni organizmi velike biološke raznolikosti i nutritivno bogatog kemijskog sastava. Snažan potencijal mikroalgi proizlazi iz činjenice da nisu proučavane u mjeri kao najpoznatije poljoprivredne biljne kulture. Mogu se uzgajati na područjima koja su neprikladna za uzgoj biljnih kultura te u usporedbi s biljkama, neke vrste mikroalgi imaju duplo veću proizvodnu vrijednost. Budući da energiju sunčeve svjetlosti učinkovitije iskorištavaju, njihov potencijal za proizvodnju vrijednih spojeva ili biomase je široko prihvaćen i može se koristiti za poboljšanje prehrambene vrijednosti hrane i hrane za životinje (Kovač i sur. 2013.). Uzimajući u obzir ogromnu biološku raznolikost i razvoj u genetskom inženjerstvu, mikroalge predstavljaju jedan od najperspektivnijih bioloških resursa za nove proizvode i upotrebu u raznolikim poljoprivrednim i prehrambenim industrijama (Pulz i Gross 2004.).

Mikroalge su proizvođači koji predstavljaju izvanredan i kvalitetan izvor različitih vrsta hranjivih tvari. Osim što su bogate proteinima, bjelančevinama, vitaminima, mineralima i različitim pigmentima, posjeduju antioksidativna i antikancerogena svojstva. Korištenjem mikroalgi kao dodatka u tradicionalnu hranu predstavlja inovativan način dobivanja novih, atraktivnih i zdravih prehrambenih proizvoda. Uključivanje mikroalgi u hranu i hranu za životinje doprinosi dobivanju poželjnih boja, povećanju nutritivne vrijednosti i poboljšanju teksture ili otpornosti na oksidaciju. Čak i kada se koriste u malim količinama u prehrani različitih životinja, algama se pripisuje poboljšanje imunološkog sustava, povećanje težine, broj jaja, reproduktivni učinak ili smanjenje razine kolesterola što ukazuje na mogućnost novih načina uzgoja kako bi se poboljšati kvalitetu mesa i jaja. Njihova značajnost u akvakulturi nije iznenađujuća budući da su prirodna hrana za ove organizme (Kovač i sur. 2013.).

Mikroalga *Spirulina* je vrlo istraživana i predstavljena kao najbogatiji i najkompletniji izvor organskih spojeva u prirodi pa postaje poznata zbog visokog sadržaja proteina i raznih bioaktivnih spojeva (Kovač i sur. 2013.).

Jedno od najvažnijih svojstava mikroalgi je njihov bogat sadržaj esencijalnim amino kiselinama, ali i dugolančanim polinezasićenim n-3 masnim kiselinama od kojih su u prehrambenom smislu najznačajnije dokosaheksaenoična kiselina (DHA; C22:6 n-3) i eikosapentaenoična kiselina (EPA; C20:5 n-3). Trenutno glavni komercijalni izvor DHA je ulje morskih riba, čija je široka primjena otežana djelovanjem sezonskih varijacija, onečišćenjem mora i visokih troškova obrade. Poteškoće stoga nastaju u osiguravanju pouzdanog i zdravog izvora polinezasićenih masnih kiselina. Mnogo je truda uloženo u razvoj ekonomične i industrijski izvedive tehnologije za proizvodnju DHA iz mikrobnih izvora (Jiang i sur. 2004.). Iako je morska riba kvalitetan izvor hranjivih tvari, dodatak ribljeg ulja ima negativne posljedice na prehrambene proizvode u obliku nepoželjnog mirisa i okusa na ribu te upravo iz tog razloga mikroalge predstavljaju savršen zamjenski dodatak. Uz sve navedene prednosti mikroalgi, veliku poteškoću u primjeni predstavlja visoka cijena proizvodne tehnologije te je potrebno u skoroj budućnosti pronaći racionalna i ekonomski prihvatljivija rješenja.

S obzirom na vrstu masti koje čovjek unosi u organizam, sve je više znanstvenih dokaza kako povećana potrošnja dugolančanih n-3 masnih kiselina značajno doprinosi održavanju kardiovaskularnog zdravlja, održavanju normalne razine seruma triacilglicerida i normalnu reaktivnost krvnih pločica (Abril i Barclay 1998.). Klinička i epidemiološka istraživanja pokazala su kako DHA igra važnu ulogu u razvoju i funkciji mozga, retine i reproduktivnog tkiva za odrasle i dojenčad (Gill i sur. 1997.).

Schizochytrium sp. pripada kraljevstvu *Chromista* i porodici *Thraustochytrids* koja je najprije izolirana iz koraljnog grebena Yap, otoka u Federativnim Državama Mikronezije. To je morska mikroalga s jednostaničnom strukturom i okruglog oblika stanice (Findlay i sur. 1980.; Bremer 1995.). *Schizochytrium* je zanimljiva mikroalga zbog svoje heterotrofne prirode, male veličine, sposobnosti korištenja širokog raspona spojeva ugljika i dušika, sposobnosti rasta pri niskim salinitetima i povećana razina proizvodnje lipida pri niskim salinitetima te visok sadržaj DHA u lipidima čak i prilikom povišenih temperatura (Barclay i sur. 1994.).

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi utjecaj dodatka 0,5 i 1 % mikroalge *Schizochytrium limacinum* (Honda i Yokochi) u hranu kokoši nesilica na senzorne karakteristike jaja.

2. Pregled literature

2.1. Mikroalge

Mikroalge su u posljednje vrijeme probudile zanimanje širom svijeta zbog njihovog potencijala za primjenu u industriji obnovljivih izvora energije, biofarmaceutskih proizvoda i prehrambenih proizvoda. Mikroalge su obnovljiv, održiv i ekonomičan izvor biogoriva, bioaktivnih lijekova i hranjivih tvari (Khan i sur. 2018.).

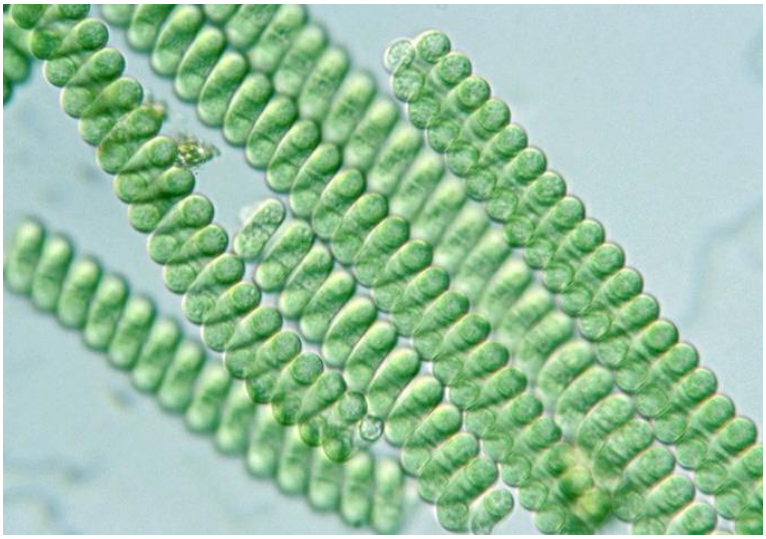
Mikroalge su fotosintetski organizmi koji imaju sposobnost rasta i razvoja u različitim vodenih staništima uključujući jezera, rijeke, oceane čak i otpadne vode. Većina mikroalgi su autotrofni organizmi, no postoje i oblici koji su heterotrofni organizmi. Autotrofne mikroalge koriste ugljikov dioksid (CO_2) kao izvor ugljika i sunčevu svjetlost kao izvor energije čime doprinose fiksaciji ugljika u biomasi. Međutim, heterotrofni oblici mikroalgi koriste organski ugljik umjesto sunčeve svjetlosti kao izvor energije. Neke od tih mikroalgi mogu koristiti ekonomski povoljne izvore ugljika za proizvodnju biomase (Han i sur. 2006.). Osim toga, heterotrofne mikroalge se lako uzgajaju i kontroliraju u tipičnim bioreaktorima.

Mikroalge posjeduju mogućnost toleriranja širokog raspona temperatura, saliniteta, pH vrijednosti i različitog intenziteta svjetlosti. Mogu se prilagoditi uvjetima akumulacije ili čak pustinjskim uvjetima te mogu rasti same ili u simbiozi s drugih organizama (Barsanti i sur. 2008.). Alge su organizmi uglavnom klasificirani kao *Rhodophyta* (crvene alge), *Phaeophyta* (smeđe alge) i *Chlorophyta* (zelene alge) te razvrstane po veličini kao makroalge ili mikroalge. Makroalge (morske alge) su višestanične, velike alge, vidljive golim okom dok su mikroalge mikroskopske pojedinačne stanice i mogu biti prokariotski organizmi slični cijanobakterijama (*Chloroxybacteria*) ili eukariotski slični zelenim algama (*Chlorophyta*) (Khan i sur. 2018.). Iako su mikroalge genetski vrlo heterogena skupina organizama sa širokom raznolikošću fizioloških i biokemijskih karakteristika, najvažnije fototrofne vrste su *Arthrospira* (nekada *Spirulina,* plavo-zelene alge), *Chlorella, Dunaliella i Haematocussus*. Osim navedenih mikroalgi, za proizvodnju n-3 masnih kiselina koriste se heterotrofni morski organizmi kao što su mikroalge iz roda *Crypthecodinium, Schizochytrium i Ulkenia* (Madeira i sur. 2017.).

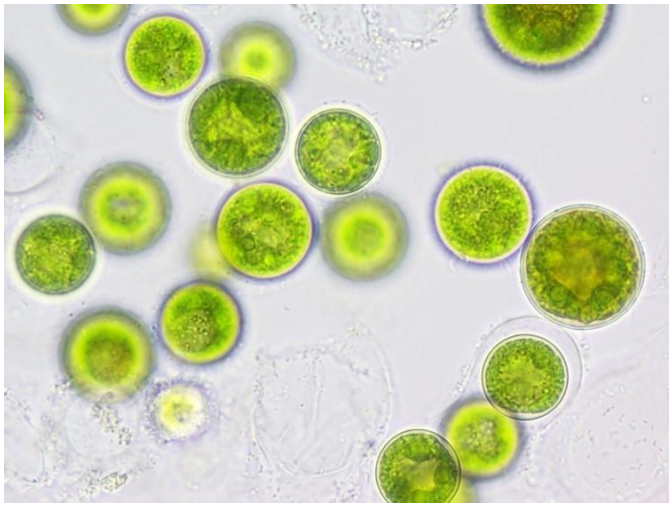
Mikroalge se uglavnom sastoje od proteina, ugljikohidrata, lipida, vitamina, minerala i bioaktivnih spojeva kao što su karotenoidi. Ovaj promjenjivi sastav hranjivih tvari ovisi o uvjetima uzgoja i vrsti mikroalge. Istraživanja su do sada pokazala kako bi uključivanje mikroalgi u životinjsku prehranu moglo poboljšati rast i kvalitetu mesa preživača, svinja, peradi i kunića. Rezultati ovise o kemijskom sastavu mikroalgi i njihovoj količini koja je uključena u prehranu. Dodavanje mikroalge *Arthrospira platensis* u prehranu svinja i peradi povećava prosječan dnevni prirast, ali negativno utječe na omjer konverzije hrane. Što se tiče *Schizochytrium sp*., ova mikroalga poboljšava sastav masnih kiselina u svinjskom i peradarskom mesu zbog visokog sadržaja dokosaheksaenoične kiseline (DHA). *Chlorella* uz vrlo niske udjele u hrani poboljšava parametre rasta peradi.

Upotreba mikroalgi kao prehrambeni sastojak vrlo je obećavajuća alternativa kukuruzu i soji, time ublažavajući sadašnju konkurenciju između industrije hrane za životinje i biogoriva. Povrh svega, mikroalge doprinose zaštiti okoliša i prirodnih resursa te sprječavaju degradaciju zemljišta i zagađenje vode (Madeira i sur. 2017.).

Prije nego se novi hranidbeni proizvod proglasi sigurnim za konzumaciju, mora proći niz detaljnih toksikoloških ispitivanja za dokazivanje neškodljivosti proizvoda. To se posebno odnosi na nekonvencionalne izvore proteina kao što su mikroalge. S obzirom na dostupne informacije o mogućim toksičnim svojstvima ili bilo kojim drugim štetnim učincima, testiranjem do sada različitih vrsta mikroalgi može se reći kako nijedna od njih nije pokazala nikakvu negativnu posljedicu za čovjeka. Niti jedna ozbiljna anomalija nije pronađena kratkoročnim ili dugoročnim pokusima niti u proučavanju akutne ili kronične toksičnosti. Svi testovi, uključujući one obavljene na ljudima, nisu otkrili nikakve dokaze koji bi ograničili korištenje ispravno obrađenih materijala mikroalgi (Chamorro 1980.). Komercijalno najpoznatijie mikroalge su *Arthrospira plantesis* i *Chlorella vulgaris* prikazane na slikama 2.1.1. i 2.1.2.



Slika 2.1.1. *Arthrospira plantesis*
Izvor: Fayzunnessa i sur. (2011.).



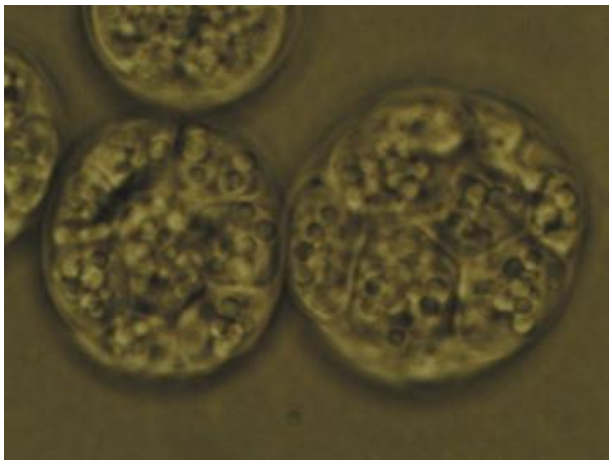
Slika 2.1.2. *Chlorella vulgaris*
Izvor: Algal omega-3 suppliers say while growth may have lagged, future still bright https://www.nutraingredients-usa.com/Article/2016/04/21/Algal-omega-3-future-still-bright by Hank Schultz

2.1.1. Schizochytrium limacinum

Schizochytrium sp. pripada kraljevstvu *Chromista* što uključuje zlatne alge, dijatomeje, žuto-zelene alge, *Haptophyte* i C*ryptophyte*, O*omycetes* i *Thraustochytrids*. *Thraustochytrids* se nalaze diljem svijeta u uščima morskih područja. To je morska mikroalga s jednostaničnom strukturom i okruglog oblika stanice. Njihov način prehrane prvenstveno je saprotrofan (dobivaju hranu apsorbiranjem otopljene organske tvari) i kao takvi su povezani s organskim detritusom, raspadanjem algi i biljnog materijala i u sedimentima (Findlay i sur. 1980.; Bremer 1995.). *Schizochytrium limacinum* pripada porodici *Thraustochytrids* i najprije je izolirana iz koraljnog grebena Yap, otoka u Federativnim Državama Mikronezije (Zhu i sur. 2007.). Mikroskopski snimak mikroalge *Schizochytrium sp.* prikazan je na slici 2.1.1.1. gdje se jasno razaznaje njezin okrugli oblik i struktura.

Thraustochytrids, posebice sojevi iz roda *Schizochytrium* privlačne su za razvoj fermentacijskih procesa iz više razloga: 1) heterotrofne su prirode; 2) male veličine; 3) sposobnost korištenja širokog raspona spojeva ugljika i dušika; 4) sposobnost rasta pri niskim salinitetima i povećana razina proizvodnje lipida pri niskim salinitetima i 5) visok sadržaj DHA u lipidima čak i prilikom povišenih temperatura npr. 30°C (Barclay i sur. 1994.). Istraživanja su pokazala da *Schizochytrium limacinum* može proizvesti velike količine DHA u usporedbi s biomasom dobivenom od drugih mikroorganizma koji koriste glicerol kao primarni izvor ugljika čime je proces dobivanja DHA ekonomski učinkovitiji (Chin i sur. 2006.). Poznato je da *Schizochytrium* sadrži velike količine DHA u njihovoj citoplazmi te su korišteni kao alternativni izvori za komercijalnu proizvodnju DHA. U svom istraživanju, Park i sur. (2015.) potvrdili su da *Schizochytrium* sadrži visoku DHA koncentraciju od oko 37,6 % ukupnih masnih kiselina (Tablica 2.1.1.1.).

Jedan od problema koji ograničava upotrebu mikroalgi u prehrambenim proizvodima pripisuje se slaboj probavljivosti zbog celuloznih staničnih stijenki (Becker 1994.). Stanični zidovi mikroalge *Schizochytrium* uglavnom se sastoje od hemiceluloznog materijala, stoga treba prevladati ograničenja kako bi se povećala probavljivosti i dostupnost DHA pri hranidbi životinja.



Slika 2.1.1.1. *Schizochytrium sp.*
Izvor: Winwood R.J. (2015.).

Tablica 2.1.1.1. Sastav masnih kiselina mikroalge *Schizochytrium*

Masna kiselina	% ukupne masne kiseline
Laurinska kiselina (C12: 0)	0.20
Miristinska kiselina (C14: 0)	8.95
Pentadekanska kiselina (C15: 0)	2.19
Palmitinska kiselina (C16: 0)	38.01
Heptadekanska kiselina (C17: 0)	0.85
Stearinska kiselina (C18: 0)	1.47
Linolna kiselina (C18: 2n-6)	0.23
a-Linolenska kiselina (C18: 3n-3)	0.59
y-Linolenska kiselina (C18: 3n-6)	0.23
Arahidna kiselina (C20: 0)	0.52
Heneikozanska kiselina (C21: 0)	0.33
Dihomo-y-linolenska kiselina (C20: 3n-6)	0.33
Arahidonska kiselina (C20: 4n-6)	0.49
Behanska kiselina (C22: 0)	0.39
Eikosapentaenoična kiselina (C20: 5n-3)	0.72
Dokosapentaenska kiselina (C22: 5n-6)	6.74
Dokosaheksaenoična kiselina (C22: 6n-3)	37.63
Zasićne masne kiseline	52.91
Nezasićene masne kiseline	46.96
n-3 / n-6 masne kiseline	5.58

Izvor: Park i sur. 2015.

2.2. Kemijski sastav mikroalgi

2.2.1. Proteini

Prije otprilike pedeset godina, masovna proizvodnja određenih mikroalgi bogatih proteinima smatrana je mogućnošću zatvaranja predviđenog "proteinskog jaza". Sveobuhvatne analize i istraživanja hrane pokazale su da su ovi proteini daleko kvalitetniji u usporedbi s konvencionalnim biljnim proteinima. Međutim, zbog visokih troškova proizvodnje kao i zbog tehničkih poteškoća, upotreba mikroalgi u prehrani kao i razvijanje proteina mikroalgi još

uvijek je u povojima. Većina do sada objavljenih podataka o koncentraciji proteina u mikroalgama, posebno enzimskih proteina, temelje se na procjenama sirovog proteina koji se obično koriste u ocjenjivanju hrane i hrane za životinje. Ta se brojka dobiva hidrolizom biomase mikroalgi i procjenom ukupnog dušika. Budući da osim proteina i drugi sastojci mikroalgi kao što su nukleinske kiseline, amini, glukozamidi i materijal stanične stijenke sadrže dušik, ovaj izračun rezultira u precjenjivanju pravog sadržaja proteina. Proteini se sastoje od različitih aminokiselina i stoga se nutritivna kvaliteta proteina u osnovi određuje prema sadržaju, proporciji i dostupnosti njegovih aminokiselina (Becker 2007.). U tablici 2.2.1.1. prikazan je kemijski sastav različitih vrsta mikroalgi iz kojeg je vidljivo kako je upravo protein najzastupljeniji nutrijent.

Visok sadržaj proteina različitih vrsta mikroalgi jedan je od glavnih razloga što ih smatramo nekonvencionalnim izvorom proteina budući da su mikroalge sposobne sintetizirati sve vrste aminokiselina, ali također mogu biti i izvor esencijalnih amino kiselina. Na primjer, sušena biomasa *Spirulina* sadrži potpuno sve esencijalne amino kiselina, posebno leucin, valin i izoleucin (da Silva Vaz i sur. 2015.) te oko 68 % prisutne biomase je protein. *Chlorella* sadrži oko 50 % proteina, čija je kvaliteta usporediva sa proteinom kvasca, sojinog brašna i mlijeka u prahu (Blaženčić 2007.).

Tablica 1.2.1.1. Kemijski sastav različitih vrsta mikroalgi izražen udjelom u suhoj tvari

Mikroalga	Proteini	Ugljikohidrati	Lipidi
Spirulina platensis	46-63	8-14	4-9
Chlorella vulgaris	51-58	12-17	14-22
Schizochytrium sp.	/	/	50-77
Arthrospira maxima	60-71	13-16	6-7

Izvor: Becker 2007.

Proteini iz mikroalgi ili biljaka mogu smanjiti razinu kolesterola aktiviranjem kolecistokinina i imaju snažno enzimsko djelovanje (Smee i sur. 2008.). *Nostoc* je cijanobakterija koja proizvodi protein Cyanovirin za kojeg se smatra da posjeduje antivirusna svojstva u borbi protiv virusa HIV-a (Zappe i sur. 2008.).

Celulozna stanična stijenka koja ima udio od oko 10 % suhe tvari mikroalgi, predstavlja ozbiljan problem probavljanja i korištenja biomase mikroalgi budući da nije probavljiva za ljude i druge nepreživače. Stoga, potrebno je učinkovito tretiranje stanične stijenke kako bi proteini i druge nutritivne tvari bile dostupne probavnim enzimima (Becker 2007.). Drugo istraživanje navodi kako nedostatak polisaharida u staničnoj stijeni cijanobakterija čini ih lakše probavljivima i samim time prihvatljivijima za upotrebu u ljudskoj prehrani (Richmond i Preiss 1980.).

2.2.2. Masne kiseline

Mikroalge prirodno su bogate omega-3 masnim kiselinama koje pravilnim tretiranjem postaju dodatak prehrani visoke vrijednosti. Funkcionalni izvori omega-3 u mikroalgama obično su eikosapentaenoična kiselina (EPA) i dokosaheksaenoična kiselina (DHA). Omega-3 masne kiseline široko se dobivaju iz ribljeg ulja, ali posljednjih godina problem predstavljaju neugodan okus i slaba oksidacijska stabilnost ribljeg ulja čineći ga nepovoljnijim za upotrebu (Luiten i sur. 2003.). Također, neadekvatne zalihe ribljeg ulja ograničile su njegovu upotrebu. U usporedbi s ribom, mikroalge samoproizvode omega-3 što čini proces jednostavnijim i ekonomski isplativijim (Belarbi i sur. 2000.). EPA se koristi u kliničke svrhe kao što je za liječenje srčanih i upalnih bolesti; astme, artritisa, migrene i psorijaze.

Slično tome, DHA također je od velike značajnosti za zdravlje; pomaže u borbi protiv raka, AIDS-a, bolesti srca, snižava kolesterol, jača imunološki sustav i pomaže pri detoksikaciji tijela. Količina proizvedene DHA značajno ovisi o vrsti mikroalgi. Dokazano je da morske mikroalge imaju značajno više sadržaja DHA u usporedbi sa slatkovodnim mikroalgama koje se uglavnom sastoje od zasićenih ili mononezasićenih masnih kiselina (Patil i sur. 2007.).

Budući da mikroalge mogu dosegnuti mnogo veći sadržaj i produktivnost u usporedbi s drugim mogućim izvorima, masne kiseline dobivene iz mikroalgi imaju vrlo perspektivno biotehnološko tržište hrane, hrane za životinje te industrija koja proizvodi hranu za dojenčad je posebno prikladna. DHA je apsolutno neophodna hranjiva tvar za razvoj mozga fetusa i također je ključna za optimalnu funkciju mrežnice u dojenčadi (McCann i Ames 2005.). Dodavanjem morskih mikroalgi u hranu za kokoši nesilice povećana je količina sadržaja DHA u žumanjku jaja. Međutim, proizvodnja jaja i težina jaja bila je negativno pogođena dodavanjem visokog sadržaja mikroalgi u prehranu. Masti koje sadrže većinom polinezasićene masne kiseline podložnije su oksidaciji. Dakle, potrebno je utvrditi utjecaj obogaćivanja s DHA na oksidacijsku stabilnost žumanjaka jaja (Herber i Elswyk 1996.).

Za razliku od kopnenih usjeva, mikroalge izravno proizvode visoko nezasićene masne kiseline poput arahidonske kiseline (AA, 20: 4n-6), eikosapentaenoične kiseline (EPA, 20: 5n-3) i dokosaheksaenoične kiseline (DHA, 22: 6n-3). Iako većina tih mikroalgi nije pogodna za izravnu ljudsku upotrebu, indirektno povećavaju prehrambenu vrijednost za ljude ako se dodaju hrani za životinje (Shields i Lupatsch 2012.).

Mikroalge se mogu izravno upotrijebiti kao sastojak hrane za životinje. Dodavanjem mikroalgi u hranu kokoši nesilica za proizvodnju obogaćenih DHA jaja i proizvoda od jaja, dodavanjem u hranu brojlerima, svinjama i govedu za proizvodnju mesnih proizvoda koji su prirodno obogaćeni DHA te na posljetku dodavanjem mikroalgi u hranu mliječnih krava za proizvodnju obogaćenog DHA mlijeka i mliječnih proizvoda. Osušene mikroalge se također mogu koristiti kao sastojak za hranjenje akvakulture kako bi se prirodno poboljšao sadržaj DHA u ribama i rakovima. Osim toga, ulje se može ekstrahirati iz cjelovitih mikroalgi i dalje obraditi kako bi se proizveli rafinirani sastojci (čisti triacilgliceroli, etil esteri ili soli masne kiseline DHA) za uporabu kao prehrambeni suplementi u hrani i hrani za životinje. Lipidi žumanjka jaja, osušeni prah žumanjaka i odmašćeni proizvodi od žumanjka u prahu dobiveni iz DHA obogaćenih jaja samo su još neki od proizvoda koji se mogu dobiti ukoliko se kokošima nesilicama u prehranu dodaju cjelovite mikroalge. Ovi proizvodi bogati DHA mogu se koristiti izravno ili dodati kao sastojak u razne prehrambene proizvode kako bi se potrošačima pružio

širok raspon mogućnosti uključivanja DHA u njihovu prehranu čime bi poslužili kao alternativa za ribu i riblje ulje. Na ovaj način potrošači održavaju kardiovaskularno zdravlje uključujući omega-3 masne kiseline dugog lanca u njihovu svakodnevnu prehranu (Zeller i sur. 2001.).

2.2.3. Ugljikohidrati

U većini slučajeva kompletna biomasa mikroalgi koristi se kao hrana ili dodatak hrani što znači da osim proteina postoje i drugi nutritivni sastojci kao što su ugljikohidrati, vlakna, vitamini i minerali koji će utjecati ukupnu vrijednost i probavljivost proizvoda od mikroalgi. Ugljikohidrati mikroalgi mogu se naći u obliku škroba, celuloze, šećera i drugih polisaharida. Budući da je ukupna probavljivost ugljikohidrata ispitivanih mikroalgi dobra, čini se da nema ograničenja u korištenju osušenih mikroalgi kao cjeline. Uzrokuju li ugljikohidrati probleme poput gastrointestinalnog poremećaja, nadutosti ili zadržavanja tekućine može se jedino ustanoviti u *in vivo* pokusima (Becker 2004.).

Ugljikohidrati čine najveći udio u stočnoj hrani i glavni su za doprinos energije za životinje i mikrobe u buragu, pokazujući važnu ulogu u održavanju zdravog gastrointestinalnog trakta. Ugljikohidrati mikroalgi obično čine veliki dio prehrambenih vlakana (Gutiérrez-Salmeán i sur. 2015.) što može biti korisno za crijeva životinja. U slučaju *Arthrospira* primijećena je učinkovita probava ugljikohidrata kod preživača kada se koristi u razinama do 20 % ukupnog unosa hrane što nije slučaj u usporedbi s drugim vrstama mikroalgi kao što je *Chlorella* ili *Scenedesmus obliquus* (Gouveia i sur. 2008b.). Štoviše, vrijedi napomenuti da koncentracija ugljikohidrata u mikroalgama ovisi o uvjetima uzgoja (Ogbonna i Tanaka 1998.).

Najznačajnija skupina polisaharida mikroalgi su sulfatni esteri koji se nazivaju sulfatiranim polisaharidima od kojih su najpoznatiji karagenan, ulvan i fucoidan. Karagenani posjeduju antivirusna i antioksidativna svojstva i široko su zastupljeni kao dodatak hrani. Ulvan posjeduje antitumorna svojstva kao i fizikalno-kemijska svojstva i biološke karakteristike potencijalnog interesa za primjenu u hrani i farmaceutskoj industriji. U posljednjih nekoliko godina, fucoidan je istražen u razvoju novih lijekova i funkcionalne hrane (Wijesekara i sur. 2011.; Yen i sur. 2013.). Sulfatiran polisaharid izoliran iz mikroalge *Spirulina platensis* (kalcij Spirulan) pokazuje antivirusnu aktivnost jer inhibira *in vitro* replikaciju raznih virusa (Raposo i sur. 2013.).

2.2.4. Vitamini i minerali

Po mišljenju potrošača koncept održivog "kemijski čistog" i organskog uzgoja postao je vrlo privlačan uključujući korištenje prirodnih oblika vitamina i minerala umjesto onih sintetički proizvedenih. I mikro- i makroalge imaju potencijal kao mineralni aditivi za zamjenu anorganskih mineralnih soli koje se najčešće koriste u industriji hrane za životinje (Doucha i sur. 2009.). Mikroalge predstavljaju vrijedan izvor gotovo svih važnih vitamina koji poboljšavaju nutritivnu vrijednost biomase. Osim prirodnih fluktuacija udjela vitamina zbog okolišnih čimbenika, tretmani i metode sušenja biomase mikroalgi imaju znatan učinak na sadržaj vitamina. To se posebno odnosi na toplinski nestabilne vitamine poput B1, B2, C i

nikotinske kiseline čija koncentracija drastično opada tijekom procesa sušenja (Becker 2004.). Osim navedenih vitamina, mikroalge su bogate i ostalim vitaminima poput A, B3 B6, B9, B12. Mikroalge su također vrijedan i bogat izvor tokoferola, askorbinske kiseline, folne kiseline, pantotenske kiseline, inozitola i biotina (Fabregas i Herrero 1990.). Mikroalge roda *Spirulina* sadrže do deset puta više β-karotena od bilo koje druge hrane, uključujući mrkvu (Mohammed i Mohd 2011.) i više vitamina B12 u usporedbi sa svježim biljnim ili životinjskim izvorima hrane. U usporedbi sa zelenim algama, špinatom i jetrom, ovaj rod predstavlja najbogatiji izvor vitamina E, tiamina, kobalamina, biotina i inozitola (Gantar i Svirčev 2008.).

Mikroalge također imaju potencijal kao mineralni dodatak u industriji hrane za životinje budući da su bogat izvor minerala. Neke jestive makroalge sadržavale su veće količine makrominerala (8.083–17.875 mg / 100 g; Na, K, Ca, Mg) i elemenata u tragovima (5,1–15,2 mg / 100 g; Fe, Zn, Mn, Cu) od jestivih biljaka. Iz ovog razloga mogu se koristiti kao dodatak prehrani kako bi se zadovoljio preporučeni dnevni unos nekih esencijalnih minerala i elemenata u tragovima (Ruperez 2002.).

2.2.5. Pigmenti

Jedna od najznačajnijih karakteristika mikroalgi je njihova boja. Svaki red mikroalgi ima svoju posebnu kombinaciju pigmenata i unikatnih boja. S obzirom na njihovu filogenetsku dob, razumljivo je da su se razvili pigmenti koji su specifični za svaku mikroalgu pojedinačno. Smatra se da su više biljke evoluirale iz *Chlorophyte* te samim time njihova je pigmentacija najsličnija (Becker 2004.). Prirodni pigmenti važni su za fotosintetski metabolizam mikroalgi i doprinose nekoliko korisnih bioloških aktivnosti kao što su antioksidativne, antikancerogene, protuupalne, anti-gojazne, anti-angiogene i neuroprotektivne aktivnosti (Guedes i sur. 2011.; Pangestuti i Kim 2011.). Glavne skupine pigmenata u mikroalgama su karotenoidi, fikobiliproteini i klorofili. Karotenoidi se uglavnom koriste za dodatke prehrani, obogaćivanje hrane, bojila, stočnu hranu te farmaceutske i kozmetičke proizvodi (Vílchez i sur. 2011.). Sintetičke boje korištene u prehrambenoj industriji uglavnom su derivati katrana i iako su u mnogim zemljama zabranjeni zbog zdravstvenih rizika, te boje su preferirane zbog niskog prinosa prirodnih boja iz biljnih izvora (Mohammed i sur. 2011.). Budući da je trenutni svjetski trend zamjena umjetnih za prirodna bojila, a dobivanje bojila iz biljaka zahtijeva veću količinu biomase, mikroalge predstavljaju dobru alternativu.

Klorofil -a je primarni fotosintetski pigment u svim mikroalgama i jedini je klorofil cijanobakterija i *Rhodophyta.* Kao i sve više biljke, *Chlorophyta* i *Euglenophyta* sadrže i klorofil -b, dodatni klorofili oblika -c, -d i -e mogu se naći u nekoliko morskih mikroalgi i slatkovodnih dijatomeja. Ukupna količina klorofila u mikroalgama je u rasponu od 0,5-1,5 % suhe mase. Prava nutritivna vrijednost klorofila u mikroalgama vrlo je kontroverzna. Nasuprot tome, produkti razgradnje klorofila identificirani su kao uzrok iritacija kože (Becker 2004.). U Brazilu, klorofil se koristi kao prirodno bojilo dobiveno iz špinata sa sadržajem od približno 0,06 mg/g dok biomasa *Spirulina sp*. sadrži 1,15 mg/g (Godoy Danesi i sur. 2002.). Uključivanje *Spirulina sp*. biomase u hranu posebno je zanimljivo iz razloga što daje zelenu boju i povećava nutritivnu vrijednost.

Karotenoidi su skupina žutih, narančastih ili crvenih prirodno prisutnih pigmenata koji su prisutni posvuda u živom svijetu. Samo mikroorganizmi, gljive, alge i više biljke imaju sposobnost sintetizirati karotenoide *de novo*, stoga se životinje oslanjaju na pigmente ili blisko srodne tvari koji se nalaze u njihovoj prehrani, koji bi se u prirodi prenijeli kroz prehrambeni lanac (Shields i Lupatsch 2012.). Najvažniji karotenoid je β-karoten jer je najaktivniji kao provitamin A, a koristi se kao bojilo, provitamin, dodatak multivitaminskim pripravcima i proizvodima zdrave hrane sa antioksidativnim djelovanjem. Prirodni oblik ovog pigmenta ima jači učinak od sintetičkog budući da ga tijelo lakše apsorbira. Iako je najbogatiji poznati izvor ovog karotenoida *Spirulina*, najznačajnija mikroalga za prirodnu proizvodnju visoke razine je *Dunaliella salina* s akumulacijom do 16 % /suhe mase (Del Campo i sur. 2007.).

Karotenoidi su poznati po svom antioksidativnom potencijalu (Bendich 1989.) ali i po mogućnosti dodatnog pigmentiranja prehrambenih proizvoda. Od karotenoida prisutnih u mikroalgama, β-karoten i kantaksantin prisutni su u koncentracijama od 13 do 25 mg / kg i 0,6 mg /kg mikroalgi (Herber i Elswyk 1998.).

Dodavanjem karotenoida koji se nalaze unutar mikroalgi u hranidbu kokoši nesilica, pridonosi razvoju karakteristično crveno-narančaste boje i učinkovitije odlaganje karotenoida čime se poboljšava pigmentacija žumanjaka. β-karoten štiti lipide membrane od peroksidacije koja je povezana s mnogim teškim i smrtonosnim bolestima kao što su rak, kardiovaskularne bolesti, Parkinsonova bolest i ateroskleroza (Lobo i sur. 2010.; Uttara i sur. 2009.; Pham-Huy i sur. 2008.).

Osim lipofilnih pigmenata, cijanobakterije *Rhodophyta* i *Cryptophyta* sadrže fikobiliproteine. Fikobiliproteini su topljivi u vodi, visoko fluorescentni fotoreceptorski pigmenti mikroalgi s linearnom tetraprolom kao protetskom skupinom, sve više su prepoznati kao vrijedni sastojci. Sastoje se od žučnog pigmenta ili fikobilina i apoproteina. Fikobiliproteini su razvrstani kao fikocijanini (plavi pigment), fikoeritrini (crveni pigment) i alofikocijanini (blijedo plavi pigment). Iako je primarni potencijal fikobiliproteina za komercijalnu upotrebu kao prirodno bojilo, sve je veći broj istraživanja o svojstvima koja promiču zdravlje i širokom rasponu farmaceutske primjene (Becker 2004.). Fikobiliproteini su skupina pigmenata čija se komercijalna vrijednost nalazi samo u mikroalgama, ali ne i u svim dijelovima mikroalgi. Iako se koriste kao prirodne boje, postoje i dokazi o mnogim drugim pozitivnim zdravstvenim učincima. Fikocijanin je jedna od najperspektivnijih komercijalnih supstanci u *Spirulini* koja se proizvodi u Japanu kao prirodna boja za hranu te se prodaje pod imenom Lina-blue. Koristi se u Japanu i Kini u prehrambenim proizvodima kao što su žvakaće gume, bomboni, mliječni proizvodi, želei, bezalkoholna pića itd. (Gouveia i sur. 2008b.). Pokazalo se da fikocijanin posjeduje antioksidacijsku, protuupalnu, neuroprotektivnu i hepatoprotektivnu aktivnost, ali se čini i da je potencijalno kemoterapijsko sredstvo kao i hipokolesterolemičko sredstvo (Gantar i Svirčev 2008.).

2.2.6. Antioksidativna i antikancerogena svojstva mikroalgi

Antioksidansi su vrlo važne tvari koje ljudsko tijelo koristi kako bi se zaštitilo od opasnih učinaka slobodnih radikala. RVK (reaktivne vrste kisika) i RVD (reaktivne vrste dušika) napadaju biomolekule poput DNA, proteina i membranskih lipida što dovodi do mnogih teških bolesti uključujući rak, bolest koronarnih arterija, pretilost, dijabetes, ishemijski moždani udar i Alzheimerovu bolest (Ngo i sur. 2006.). Biomasa mikroalgi se može smatrati višekomponentnim antioksidacijskim sustavom koji je učinkovitiji zbog interakcija između različitih antioksidacijskih komponenti (Gouveia i sur. 2008b.). Najmoćniji vodotopljivi antioksidansi u mikroalgama su polifenoli, fikobiliproteini i vitamini (Plaza i sur. 2008.). Budući da su fotosintetski organizmi, mikroalge su izložene svjetlu i visokim koncentracijama kisika te u kulturama visoke gustoće stanica u zatvorenim fotobioreaktorima koncentracije kisika mogu biti vrlo visoke. Takvi uvjeti potiču nakupljanje visoko učinkovitih antioksidativnih kompleksa za zaštitu stanica (Pulz i Gross 2004.).

Slobodni radikali uzrokuju peroksidaciju lipida u hrani i biološkim membranama. Rezultati peroksidacije su različite bolesti i komplikacije. U prehrambenim materijalima, lipidna peroksidacija smanjuje vijek trajanja i prehrambenu vrijednost. Antioksidansi mogu spriječiti oksidativno oštećenje stanica i tkiva uklanjanjem slobodnih radikala.

Ljudsko tijelo ima svoj vlastiti enzimski antioksidativni sustav koji sprječava oksidativni stres i štiti tijelo od opasnog djelovanja slobodnih radikala. Međutim, kada slobodni radikali prevladaju prirodne antioksidanse u tijelu dolazi do oksidativnog stresa što je jedan od glavnih uzroka raznih po život opasnih bolesti. U takvim slučajevima, prihvaćanje vanjskih antioksidansa je od presudne važnosti. Otkriveni su mnogi prirodni antioksidativni spojevi kao što su flavonoidi, karotenoidi, a vitamini poput askorbinske kiseline i tokoferola posjeduju jaku antioksidativnu aktivnost (Khan i sur. 2018.).

Mnoga istraživanja posvećena su potrazi za antioksidansima iz prirodnih izvora kao što su ljekovita bilja. Zbog njihovog ogromnog potencijala proizvodnje biološki aktivnih prirodnih proizvoda, mikroalge su jedan od najbogatijih i najekonomičnijih izvora prirodnih spojeva s jakim antioksidativnim učincima (Cornish i Garbary 2010.).

Angiogeneza je fiziološki proces razvoja novih krvnih žila od već postojećih krvnih žila. Angiogeneza se brzo razvija tijekom razvoja maternice, embriogeneze i zacjeljivanja rana, prekida kontakt od stanice do stanice i razgrađuje endotel i izvanstanični matriks. Proces uključuje proliferaciju i migraciju endotelnih stanica i formiranje kapilarne cijevi (Carmeliet 2003.). Iako je angiogeneza normalan proces, može postati patološki pod određenim uvjetima i dovesti do bolesti kao što su rak, ateroskleroza, artritis, dijabetes retinopatija i ishemijski moždani udar (Armstrong i sur. 2011.). Budući da patološka angiogeneza potiče tumore i pomaže im u rastu, angiogeneza se smatra uzrokom tih smrtonosnih bolesti (Cherrington i sur. 2000.).

Mnoga istraživanja ukazuju na potencijal prirodnih proizvoda uključujući one proizvedene mikroalgama za liječenje raka i tumora inhibicijom angiogeneze. Fukoksantin u mnogim vrstama mikroalgi značajno inhibira proliferaciju ljudskih stanica i stvaranje HUVECs cijevi (endotelne stanice ljudske umbilikalne vene). Pokazalo se da fukoksantin i fukoksantinol inhibiraju proces angiogeneze u aortnom prstenu štakora suzbijanjem rasta mikrožila (Sugawara i sur. 2006.).

Mikroalge, osobito plavo-zelene mikroalge posjeduju potencijalan izvor aktivnih sastojaka koji se koriste u liječenju raka. Mnoga istraživanja pokazala su antikancerogenu aktivnost ovih aktivnih produkata. Način djelovanja i mehanizam aktivnosti se mogu razlikovati. Neki stanični agenti izvedeni iz mikroalgi pokazali su se kao sredstvo protiv raka izazivajući apoptozu u tumorskim stanicama uništavajući mreže kromatina što dovodi do stanične smrti (Martins i sur. 2008.).

Mikroalge pokazuju širok raspon bioaktivnih prirodnih tvari koje su učinkovite, bilo u sirovom ili pročišćenom obliku kao antioksidativni, antikancerogeni i antimikrobni agenti. Prvi poznati antibakterijski proizvodi dobiveni iz mikroalgi nalazili su se u zelenoj mikroalgi *Chlorella* koja značajno inhibira rast i Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Washida i sur. 2006.).

2.3. Upotreba mikroalgi u ljudskoj prehrani

U razvijenim zemljama prehrana je visoko kalorična i u kombinaciji s modernim načinom života vodi do zdravstvenih problema kao što su pretilost, bolesti srca, dijabetes itd. Stoga, postoji potreba za prehrambenim proizvodima koji mogu unaprijediti zdravlje, obogatiti prehranu vitaminima, mineralima, polinezasićenim masnim kiselinama i ostalim hranjivim tvarima. Prema mišljenju potrošača, korištenje prirodnih oblika sastojaka hrane umjesto onih sintetičkih postaje sve važnije i privlačnije. Uključivanje mikroalgi u hranu i hranu za životinje doprinosi dobivanju poželjnih boja, povećanju nutritivne vrijednosti i poboljšanju teksture ili otpornosti na oksidaciju. Čak i kada se koriste u malim količinama u prehrani različitih životinja, mikroalgama se pripisuje poboljšanje imunološkog sustava, povećanje težine i broja jaja, reproduktivni učinak ili smanjenje razine kolesterola što ukazuje na mogućnost novih načina uzgoja kako bi se poboljšati kvalitetu mesa i jaja. Čovjek unosom takvih namirnica doprinosi poboljšanju vlastitog zdravlja (Kovač i sur. 2013.).

Mikroalge predstavljaju izvanredan, ali slabo istražen prirodni izvor spojeva s biološkom aktivnošću. Najvažnija supstanca u *Chlorella* je beta-1,3-glukan koji je aktivni imunostimulator, odnosno čistač slobodnih radikala i reducira lipide u krvi (Spolaore i sur. 2006.). Istraživanja provedena na brojlerima kojima se u hranu dodala mikroalga *Porphyridium sp.* u količini od 10 % pokazala su smanjenu razinu kolesterola u serumu za 28 %, dok se u žumanjku jaja razina kolesterola smanjila za 10 % i povećala razinu linoleinske i arahidonske kiseline za 29 %, odnosno 24 %. Osim toga, boja žumanjka postala je tamnija zbog viših razina karotenoida (2,4 puta viša za piletinu hranjenu s 5 % dodatka) (Ginzberg i sur. 2000.).

U obalnim područjima svih kontinenata, morske trave se koriste u ljudskoj i životinjskoj prehrani te su alge široko uzgojeni usjevi. Vrste kao što su *Porphyra* sp., *Chondrus crispus*, *Himanthalia elongata* i *Undaria pinnatifida* vrlo su zanimljive potrošačima i prehrambenoj industriji zbog niskog udjela kalorija i visokog sadržaja vitamina, minerala i dijetetskih vlakana (Plaza i sur. 2008.). S druge strane, biomasa mikroalgi je obično dostupna u obliku praha, tableta, kapsula, tekućina i također se može proizvesti u različitim prehrambenim proizvodima. Međutim, potrošnja biomase mikroalgi je ograničena na mali broj vrsta mikroalgi, a najvažnije u prehrani ljudi su rodovi *Spirulina* i *Chlorella*.

Spirulina je najbogatiji i najkompletniji izvor organske ishrane u prirodi zbog velikog sadržaja bjelančevina i raznih bioaktivnih spojeva. Lokalne populacije u Meksiku i Africi *Spirulinu* koriste kao hranu još od davnina, a trenutno se koristi kao prehrambeni dodatak ljudskoj, kao i dodatak hrani u akvakulturi, akvarijima i peradarskim industrijama (Hasan i Chakrabarti 2009.). Vrste roda *Chlorella* poznate su kao tradicionalna hrana na Orijentu. Ovaj se rod koristi na tržištu zdrave hrane, kao i za hranu u akvakulturi. Osim toga, *Spirulina* ima različite moguće učinke na promicanje zdravlja, dok je *Chlorella* važna kao čimbenik promicanja zdravlja za mnoge vrste poremećaja (Gouveia i sur. 2008b.).

Budući da celulozna stanična stijenka predstavlja ozbiljan problem probavi odnosno korištenju biomase mikroalgi, nekoliko je autora pokazalo važnu ulogu njegove obrade (Becker 2007.). Nedostatak polisaharida prisutnih u staničnoj stijenki eukariotskih mikroalgi, odnosno stijenki cijanobakterija čini njihovu biomasu lakše probavljivom i stoga prihvatljivijom za ljudsku potrošnju (Richmond i Preiss 1980.). Prije komercijalne upotrebe materijal mikroalgi se mora analizirati na prisutnost toksičnih spojeva.

Različite međunarodne organizacije objavile su preporuke i često postoje dodatne nacionalne regulative. One se odnose na nukleinske kiseline, toksine i spojeve teških metala (Spolaore i sur. 2006.). Propisi o sigurnosti hrane za ljudsku potrošnju glavna su prepreka biotehnološkoj eksploataciji resursa mikroalgi. U tablici 2.3.1. navedene su najpoznatije mikroalge komercijalizirane za prehranu ljudi.

Tablica 2.3.1. Najvažnije komercijalizirane vrste mikroalgi za ljudsku prehranu

Mikroalga	Godišnja proizvodnja (t/god.)	Zemlja proizvodnje	Primjena i proizvodi
Spirulina (Arthrospira)	3000	Kina, Indija, SAD, Myanmar, Japan	Hrana za ljude i životinje, kozmetika (fikobiliproteini, prašci, ekstrakti, tablete, napitci, čips, tjestenina)
Chlorella sp.	2000	Tajvan, Njemačka, Japan	Hrana za ljude, akvakultura, kozmetika (tablete, prašci, nektar, rezanci)
Dunaliella salina	1200	Australija, Izrael, SAD, Kina	Ljudska prehrana, kozmetika (ß-karoten, prašci)
Aphanizomenon flos-aquae	500	SAD	Ljudska prehrana (kapsule, kristali, prah)
Haematococcus pluvialis	300	SAD, Indija, Izrael	Akvakultura, astaksantin
Crypthecodinium cohnii	240	SAD	DHA ulje
Shizochytrium sp.	10	SAD	DHA ulje

Izvor: Prilagođeno od Spolaore i sur. (2006.) i Gouveia i sur. (2008b.)

Prehrambene industrije započele su sa ozbiljnim aktivnostima na tržištu funkcionalnih namirnica obogaćenih mikroalgama i cijanobakterijama kao što su tjestenina, kruh, peciva, salatni umaci, sladoled, puding, jogurt i drugi mliječni proizvodi te bezalkoholna pića (Pulz i Gross 2004.; Svirčev 2005.). Posebno ekonomična je proizvodnja piva na bazi biomase *Spirulina* koja se prodaje pod nazivom "Spirulina pivo" i "Anti-age pivo" (Svirčev 2005.). Jedno od zanimljivih istraživanja proveli su Abril i Barclay (1998.) u kojem su analizirali rezance sa jajima koja su bila obogaćena sa DHA. Sirovi suhi rezanci proizvedeni od komercijalne proizvodnje DHA obogaćenih jaja (ciljana DHA vrijednost od 150 mg/jajetu) pokazali su prosječan DHA sadržaj od 49,3 mg/100 g što je značajno više od razine DHA u komercijalno neobrađenim rezancima sa jajima. Prosječna razina DHA u rezancima nakon kuhanja (kipuća voda, 15 min) iznosila je 46,7 mg/100g što predstavlja gubitak od samo 5,3 % čime su rezanci zadržali visoku nutritivnu vrijednost.

Morais i sur. (2006.) proizveli su čokoladne kolače obogaćene *Spirulina platensis* te su određivali fizikalne, kemijske i senzorne karakteristike proizvoda uključujući i probavljivost. Kolači sa 5,0 % dodane biomase pokazali su sadržaj proteina za 7,7 % veći od kontrolne skupine. Kolači u koje je dodano 1,0 % *S. platensis* pokazali su 86,9 % probavljivosti i bolju prihvaćenost od strane sudaca (u usporedbi s drugim kolačima u koje su dodali mikroalge).

2.4. Upotreba mikroalgi u hranidbi životinja

Budući da sve poznate mikroalge s izuzetkom cijanobakterije *Spirulina* i *Aphanizomenon* sadrže materijal celulozne stanične stijenke koja može uzrokovati probleme u probavljivosti, učinci dodavanja mikroalgi moraju se vrjednovati s obzirom na dvije različite skupine životinja: preživači i nepreživači (monogastrični kralježnjaci). Preživači (goveda, ovce) imaju sposobnost probavljanja celuloznog materijala, čime se stvara barem jedna teoretska mogućnost izravnog hranjenja tih životinja autohtonim mikroalgama što do sada nije popularna opcija. Za monogastrične životinje, uključujući ljude, biomasa mikroalgi mora biti pravilno obrađena prije nego što postane prikladna kao hrana (Becker 2004.).

Gledajući sa nutricionističkog stajališta, mikroalge nude širok spektar izvrsnih bioloških spojeva od proteina, lipida i ugljikohidrata do vitamina, minerala i antioksidansa što opravdava njihovu korisnost kao sastojak u stočnoj hrani. Brojni hranidbeni pokusi jasno ukazuju na visoku nutritivnu vrijednost mikroalgi u prehrani svinja, krava, ovaca, pilića i drugih domaćih životinja, kao i mnogih vodenih organizama u akvakulturi (Svirčev 2005.). Uključivanjem različitih vrsta mikroalgi u stočnu prehranu, uspješno se može poboljšati produktivnost životinja povećavajući njihove parametre učinkovitosti rasta. Osim toga, mikroalge pozitivno utječu na kvalitetu i sigurnost hrane na način da obogaćuju nutritivna svojstva mesa, posebice onog koje se u svijetu najviše proizvodi i koristi, a to je meso peradi i svinjetina. Ipak, javlja se doza opreza koja proizlazi iz činjenice da mikroalge mogu lako akumulirati teške metale poput arsena i olova koji su potencijalno štetni za zdravlje životinja i ljudi. Stoga, potrebno je pažljivo nadzirati dodatak mikroalgi kako bi se izbjegli toksični učinci (Madeira i sur. 2017.).

U većini istraživanja do danas, mikroalge se ne smatraju esencijalnim izvorom hrane zbog potrebe za velikim količinama biomase. No, čak i kada se koriste u malim količinama, mikroalgama se pripisuju poboljšanja imunološkog sustava, poboljšanje metabolizma lipida,

crijevne funkcije, otpornost na stres (Shields i Lupatsch 2012.) kao i povećanje apetita, težine, broja jaja, reproduktivnih svojstava i smanjenje razine kolesterola (Svirčev 2005.). Veliki broj nutricionističkih i toksikoloških analiza prikazali su mikroalge kao vrijedan dodatak hrani ili zamjenu za konvencionalne izvore proteina poput sojinog brašna ili ribljeg brašna (Kovač i sur. 2013.).

Količina mikroalgi uključena u stočnu hranu ovisi i o vrsti mikroalge i vrsti životinje. Na primjer, postotak udjela *Arthrospira platensis* u prehrani za preživače bio je podosta visok (<20 %), perad (<21 %) i kuniće (<15 %) te je poboljšana produktivnost životinja s manjim učinkom na kvalitetu mesa. Kada je u pitanju *Schizochytrium sp*., primijenjen je veći postotak u prehrani kod peradi (7,4 %) u usporedbi sa svinjama, preživačima i kunićima.

Najpozitivniji učinak dodatka ove mikroalge je poboljšanje sastava masnih kiselina u mesu te povećanje razine n-3 masnih kiselina, posebno EPA i DHA (Madeira i sur. 2017.). Iako dodatak mikroalgi u prehranu peradi ima širok spektar pozitivnih učinaka, postoji mogućnost negativnog utjecaja na senzorne karakteristike proizvoda. Mikroalga *Schizochytrium sp.* testirana je kao dodatak u hranu brojlera u rasponu od 3,7 % do 7,4 %, čime je ukupna prihvatljivost mesa bila negativno ocjenjena kada je dodatak prehrani iznosio 7,4 %, za razliku od dodatka prehrani u iznosu od 3,7 % što je pokazalo pozitivne učinke u povećanju polinezasićenih masnih kiselina u mesu bez negativnog utjecaja na senzorna svojstva (Ribeiro i sur. 2013.). Gouveia i sur. (2008b.) navode kako mikroalge mogu poslužiti gotovo kao jedini izvor proteina u hranidbi kokoši nesilica te su u nekoliko zemalja i službeno odobrene kao kokošja hrana.

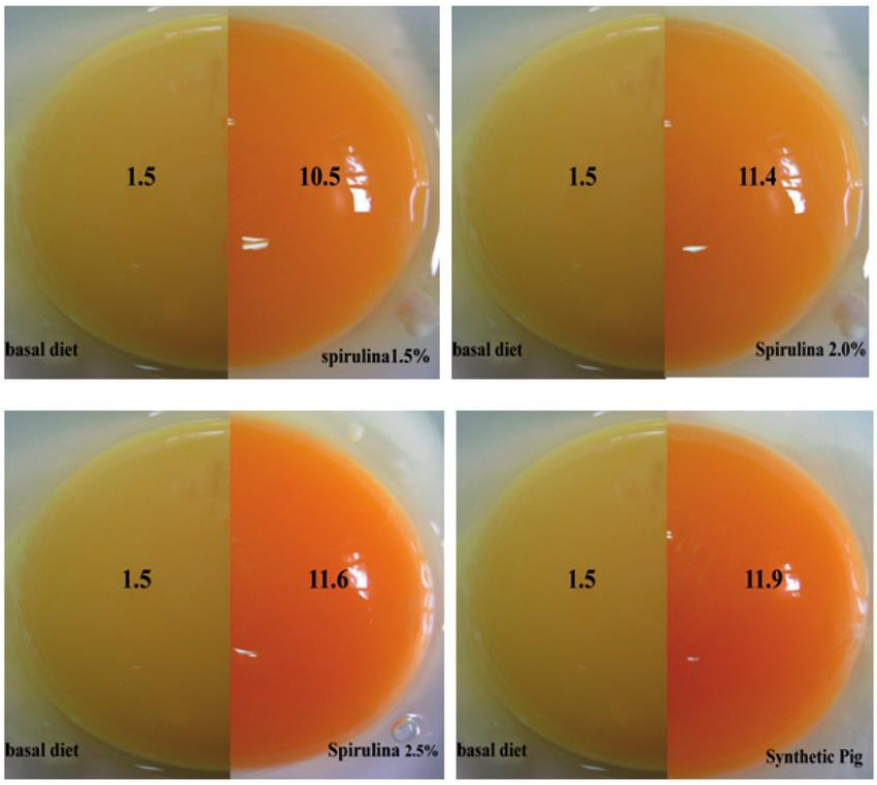
Hoće li biomasa algi biti prihvaćena u budućnosti kao sirovina za opskrbu bjelančevinama i energijom u stočnoj hrani ili će ostati samo kao dodatak, ovisit će o dostupnosti, sastavu i troškovima proizvodnje biomase mikroalgi. Shields i Lupatsch (2012.) navode da će se ukoliko ne dođe do povećanja zaliha mikroalgi i smanjenja troškova proizvodnje, mikroalge i njihovi ekstrakti i dalje nalaziti na tržištima u sektoru hrane za životinje, ali samo kao dodatak već postojećoj hrani. Pod pretpostavkom da dovoljne količine biomase mikroalgi postanu dostupne po odgovarajućoj cijeni, proizvođači mikroalgi i proizvođači hrane za životinje i dalje će morati uzeti u obzir potencijalno velike varijacije u nutritivnom sastavu (proteini, lipidi, masne kiseline, minerali, itd.) te probavljivost različitih sojeva mikroalgi i uvjete uzgoja. Kako bi se poboljšala njihova probavljivost, neke vrste mikroalgi zahtijevaju dodatne korake obrade (uz one koji se primjenjuju na konvencionalnu hranu) što dodatno povećava troškove proizvodnje. Iako postoje primjeri među vrstama makroalgi koje sadrže relativno visoke razine bjelančevina ili lipida, vrlo je vjerojatno da će mikroalge pružiti najprikladniju sirovinu za uporabu u hrani za ribe, dok makroalge mogu biti prikladnije za primjenu u stočnoj hrani.

2.5. Utjecaj dodatka mikroalgi u hranidbu kokoši nesilica na kakvoću jaja

Osim na senzorne karakteristike jaja, mikroalge značajno utječu na kemijski sastav i kakvoću jaja. Brojna su istraživanja pokazala kako određeni postotak dodatka mikroalgi u hranidbu kokoši nesilica može značajno poboljšati svojstva i povećati udio hranjivih tvari u jajima. Jedno od najvažnijih svojstava su omega-3 masne kiseline koje su prijeko potrebne za normalan i kvalitetan rad ljudskog organizma, no potrebno ih je unositi kroz kvalitetne i nutritivno bogate namirnice. Mikroalge su prirodno bogat izvor omega-3 masnih kiselina, te njihovim dodavanjem u hranidbu kokoši povećavamo udio omega-3 masnih kiselina u konačnom proizvodu, odnosno jajima.

Neke vrste mikroalgi, uključujući *Schizochytrium*, uglavnom su se koristile kao dodatak u hrani kokoši za proizvodnju jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama (Chin i sur., 2006; Lemahieu i sur., 2013.). Slično je prikazano u prethodnim istraživanjima, mikroalge pridonose povećanju ukupnog sadržaja DHA u jajima. Unos polinezasićenih masnih kiselina, uključujući masne kiseline n-3 i n-6, ima blagotvorne učinke na zdravlje životinja i ljudi. Međutim, određena istraživanja impliciraju da je pretjerani unos n-6 u odnosu na n-3 masne kiseline povezan s povećanjem kardiovaskularnih bolesti srca ili upalnih bolesti (Simopoulos 2003; Hibbeln i sur. 2006.). Budući da je konzumiranje veće količine n-6 masnih kiselina usko povezano s negativnim utjecajem na zdravlje, pokušava se manipulirati profilom masnih kiselina u prehrani ljudi koristeći nekoliko izvora masti (Huang i sur. 1990; Shin i sur. 2011.). Preporuča se smanjiti prehrambeni omjer n-6 masnih kiselina u odnosu na n-3 masne kiseline zbog idealne hranjive vrijednosti u prehrani ljudi (Gerster 1998.). Dodatak mikroalgi u hranidbu kokoši nesilica može smanjiti omjer n-6 do n-3 masnih kiselina u jajima. Zaključno, dodatak mikroalgi u hranidbu kokoši nesilica imao je blagotvoran učinak na proizvodnju jaja, masu jaja, boju žumanjka i profile lipida u krvi u usporedbi s kontrolnom skupinom koja u prehrani nije sadržavala dodatak mikroalgi. Pored toga, mikroalge mogu poboljšati koncentraciju DHA i EPA u jajima i smanjiti omjer n-6 / n-3 masnih kiselina (Park i sur. 2015.).

Osim na nutritivne vrijednosti, dodatak mikroalgi u hranidbu kokoši može značajno utjecati na senzorne karakteristike jaja, a jedno od najvažnijih senzornih svojstava je boja žumanjka. Dodatak mikroalge *Spirulina platensis* u iznosu od 1,5 %, 2,0 % i 2,5 % u hranidbu kokoši značajno je utjecao na poboljšanje boje žumanjka (Zahroojian i sur. 2011.). Autori navode kako dodatak *Spirulina* u hranidbu može u potpunosti zamijeniti sintetičke pigmente. Iako je primijećena značajna razlika u boji žumanjka između jaja kontrolne grupe i grupe koja je bila hranjena dodatkom mikroalge, nije bilo značajne razlike između žumanjaka grupe koja je bila hranjena dodatkom sintetičkog pigmenta i grupe koja je bila hranjena dodatkom mikroalge. Rezultati vidljivi na slici 2.5.1. ukazuju na to da mikroalge mogu u potpunosti zamijeniti sintetičke pigmente budući da su rezultati boje žumanjka jednaki, ali mikroalge nedvojbeno predstavljaju bolji izbor budući da su bojila prirodnog podrijetla.



Slika 1.5.1. Utjecaj dodatka 1,5 %, 2 %, 2,5 % mikroalge *Spirulina* i sintetičkog pigmenta na boju žumanjka u odnosu na kontrolnu skupinu

Izvor: Zahroojian i sur. (2011.).

U istraživanju provedenom na pilićima (Ginzberg i sur. 2000.) koji su konzumirali biomasu mikroalge *Porphyridium sp.* razina kolesterola u serumu je umanjena za 28 %, dok je u žumanjku jaja sadržaj kolesterola umanjen za 10% uz istovremeno povećanje sadržaja linolne i arahidonske kiseline za 29 % i 24 %. Također, boja žumanjaka jaja postala je tamnija kao posljedica povećanja koncentracije β-karotena (povećanje od 2,4 puta kod grupe pilića koji su konzumirali hranu sa 5 % dodatka biomase mikroalgi).

3. Materijali i metode

Pokus se provodio na pokusnom objektu Zavoda za hranidbu domaćih životinja Agronomskog fakulteta u Zagrebu koji je proveden na 36 TETRA-SL brown kokoši nesilica od 05.09.2017. do 31.10.2017. Kokoši u dobi od 35. do 43. tjedna su slučajnim blok planom raspodijeljene u tri hranidbena tretmana po tri kokoši s četiri ponavljanja, držanih pojedinačno u kavezima na podu od žičane mreže. Prije samog početka pokusa prostor je očišćen, dezinficiran i pripremljen, a napravljena je kemijska analiza sirovina korištenih u sastavljanju potpune krmne smjese za kokoši nesilice konzumnih jaja (tablica 3.1.). Krmna smjesa se stavljala u hranilice u obliku valova, limene konstrukcije te oblika „V" profila. Nesilice su tokom pokusa bile hranjene *ad libitum*. Tijekom pokusa nesilice su napajane preko nipl pojilica.

Tablica 3.1. Osnovni kemijski sastav krmiva korištenih za sastavljanje potpune krmne smjese za kokoši nesilice konzumnih jaja

Kemijski sastav (g/kg)	Vlaga	Pepeo	Sirovi protein	Lipidi	Sirova vlakna	Kalcij	Fosfor
Sojina sačma	124	70	443,10	21	48	/	/
Suncokretova sačma	97	66	331,60	74	130	/	/
Kukuruzna prekrupa	129	13	70,60	47	12	/	/
Kalcijev karbonat	35	/	/	/	/	370,30	/
Monokalcij fosfat	1	/	/	/	/	158,70	205,10

Istraživanje se sastojalo od tri hranidbena tretmana A, B i C. Kokoši kontrolnog tretmana (A) bile su hranjene komercijalnom smjesom, dok su kokoši u pokusnim tretmanima bile hranjene istom smjesom uz dodatak 0,5 % (tretman B) i 1 % (tretman C) pripravka mikroalgi *Schyzochytrium limacinum* (All-G-Rich^{TM}, Alltech Algae, USA) s 11 % proteina, 64 % masti i 16 % dokosaheksaenoične kiseline (DHA; 22:6). Nakon 8-tjednog hranidbenog tretmana jaja su skupljena za senzornu analizu.

Senzorna analiza je provedena primjenom triangl i hedonističkog testa (Lawless i Heymann, 2010.) na tvrdo kuhanim jajima (jaja stavljena u hladnu vodu, zagrijavana do vrenja i kuhana tijekom 10 minuta). Nakon kuhanja jaja su potopljena u hladnu vodu, očišćena od ljuske te čuvana na temperaturi 45 do 60 °C do konzumacije. U senzornoj analizi je sudjelovalo 19 polu-educiranih ocjenjivača (djelatnika Agronomskog fakulteta) s ujednačenim odnosom spolova (54 % muški : 46 % ženski).

Pri provedbi triangl testa ocjenjivačima su u jednom nizu predstavljena tri uzorka s troznamenkastom šifrom te su bili zamoljeni da kušaju sve uzorke počevši s lijeve strane i izaberu uzorak koji smatraju različitim od preostala dva. Ocjenjivači su usput zamoljeni odrediti u čemu percipiraju razliku (boji, mirisu, okusu ili teksturi) te je bilo moguće iskazati

više odgovora. Redoslijed uzoraka unutar niza određen je kao potpuno slučajni dizajn, a mogući redoslijedi bili su: ABA, AAB, BAA, BAB, BBA, ABB. Svakom ocjenjivaču su prezentirana tri triangl niza koji su predstavljali odnose kontrolnog tretmana A i pokusnih tretmana B i C, kao i između pokusnih tretmana B i C. Redoslijed nizova u triangl testu bio je određen potpuno slučajno. Ocjenjivači su zamoljeni da nakon uzimanja svakog pojedinačnog niza konzumiraju kruh i vodu radi neutralizacije usta i odmora osjetila.

U hedonističkom testu ocjenjivači su izražavali izražajnost boje i prihvatljivost mirisa na strukturiranoj skali od 1 do 5 te ukupnu dopadljivost na skali od 1 do 9 gdje je 1 označavalo neizraženost boje, neprihvatljiv miris ili potpuno nesviđanje, a 5 izrazito izraženu boju i izrazito prihvatljiv miris, odnosno 9 izrazitu dopadljivost. Ocjenjivači su bili upućeni u konzumaciju kruha i vode prije svakog uzorka za neutralizaciju usta, dok su uzorci prezentirani kao slučajni potpuno izbalansirani dizajn.

Dobiveni podaci obrađeni su pomoću statističkog programa SAS Studio University Edition 3.71 (SAS Institute, 2018). Grafička prezentacija i mjere varijabilnosti istraživanih svojstava utvrđene su korištenjem procedure BOXPLOT dok je u analizi podataka hedoničkih testova korištena procedura GLM uz primjenu Least Significant Difference (LSD) post-hoc testa za utvrđivanje značajnosti razlika između tretmana ($P<0,05$). Podaci dobiveni triangl testom obrađeni su izračunom statističke značajnosti bazirane na broju točnih odgovora, pri čemu je za odbacivanje H0 hipoteze uz razinu značajnosti $P<0,05$ od ukupno 19 ocjenjivanja trebalo točno odabrati različit uzorak u barem 11 slučaja (Lawless i Heymann, 2010.).

4. Rezultati i rasprava

Obradom podataka prikupljenih u istraživanju dobiveni su sljedeći rezultati. U tablici 4.1. prikazani su rezultati senzorne analize na kokošjim jajima pomoću metode triangl testa. U triangl paru kontrolnog tretmana A i pokusnog B dano je 9 točnih odgovora, u triangl paru tretmana kontrolnog A i pokusnog C dano je 12 točnih odgovora dok je u triangl paru pokusnih tretmana B i C dano 9 točnih odgovora. Iskazano u udjelima, 47,37 % točnih odgovora dano je u paru tretmana A : B, 63,63 % točnih odgovora dano je u paru tretmana A : C, te 47,37 % točnih odgovora dano je u paru tretmana B : C. S obzirom na broj ukupnih odgovora (19) bilo je potrebno dati 11 točnih odgovora u testiranju parova da bi razlika u triangl testu bila statistički značajna. Statistički gledano, senzorni analitičari nisu utvrdili značajnu razliku niti u paru tretmana A : B ni u paru tretmana B : C, dok je u paru tretmana A : C utvrđena statistički značajna razlika ($P<0,05$). Temeljem toga možemo zaključiti da dodatak 0,5 % mikroalge *Schyzochytrium limacinum* u hranidbu kokoši nesilica nije utjecao na senzorne karakteristike jaja, ali je dodatak 1 % mikroalge *Schyzochytrium limacinum* u hranidbu kokoši nesilica značajno utjecao na senzorne karakteristike jaja. U prilog dobivenim rezultatima je istraživanje Ao i sur. (2015.) koji su u hranidbu kokoši nesilica dodali komercijalnu smjesu All-G-Rich™ mikroalge *Schyzochytrium limacinum* u iznosu od 0, 1, 2 i 3 %. Vrijednost a* (crvena boja) žumanjka jaja bila je izraženija kod kokoši koje su hranjenje dodatkom od 2 % i 3 % ($P < 0,01$) dok kod kokoši hranjenih dodatkom od 1 % mikroalge nije bilo značajne razlike u boji žumanjka. Vrijednost L* (svjetlina) žumanjka jaja kod kokoši hranjenih sa dodatkom 2 i 3 % bila je značajno manja ($P < 0,01$) od žumanjka jaja kokoši koje su hranjene dodatkom od 1 % All-G-Rich™. Prema navedenom možemo uočiti da su Ao i sur. (2015.) utvrdili utjecaj dodatka mikroalgi na instrumentalno određenu boju žumanjka u koncentracijama jednakim ili većim od 2 %. Slično tome, Herber i Elswyk (1998.) navode kako su a* vrijednosti žumanjka jaja značajno povećane pri dodatku od 2,8 % i 4,8 % mikroalge *Schyzochytrium limacinum* u komercijalnu smjesu u usporedbi s kontrolnom grupom. Povećanje a* vrijednosti pripisuju taloženju karotenoida iz mikroalgi. Također, navode smanjenu L* vrijednosti žumanjka jaja, no to nije iznenađujuće s obzirom na značajno produbljivanje crvene/narančaste nijanse u žumanjku jaja.

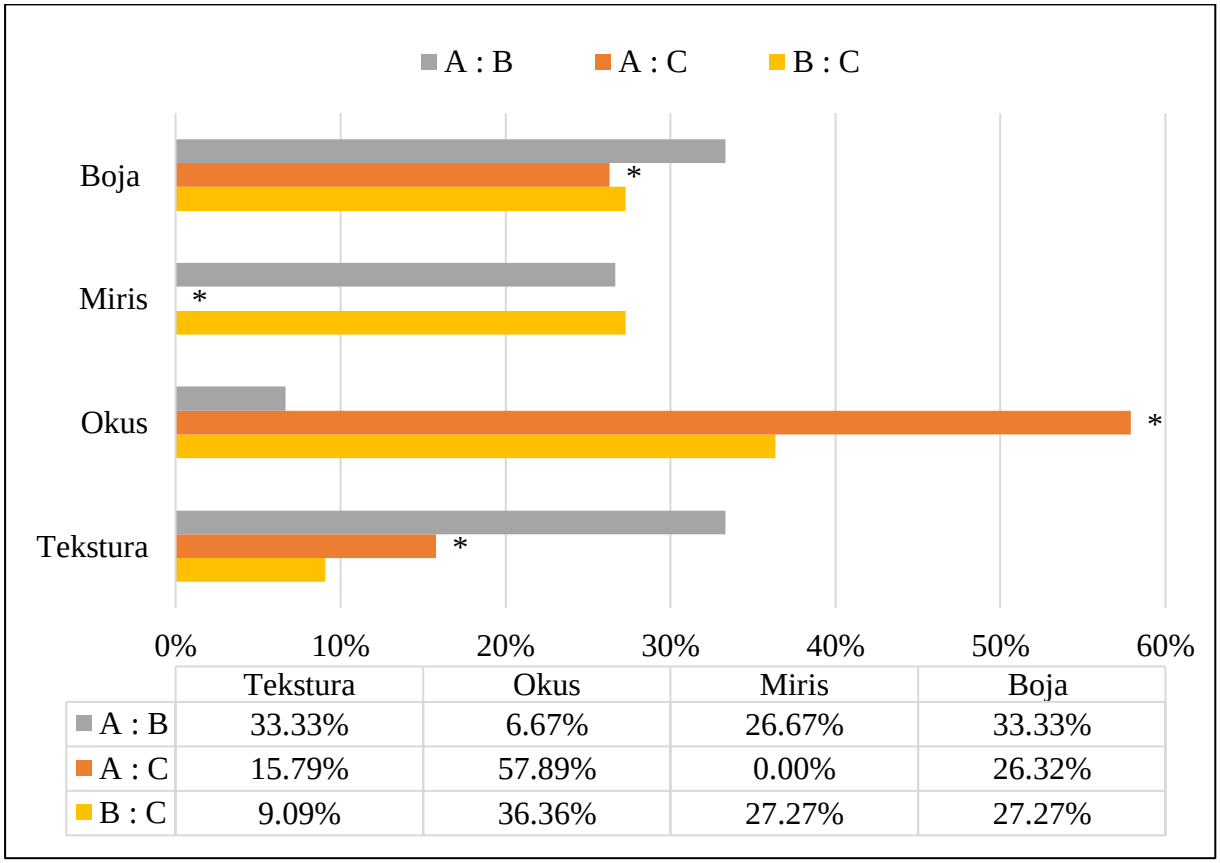
Tablica 4.1. Rezultati triangl testa na kokošjim jajima

Parovi tretmana[1]	Broj ukupnih odgovora	Broj točnih odgovora	Postotak točnih odgovora	Značajnost[2]
A : B	19	9	47,37 %	ns
A : C	19	12	63,63 %	*
B : C	19	9	47,37 %	ns

[1] A: kontrolna skupina – komercijalna krmna smjesa; B: dodatak 0,5 % pripravka mikroalge *Schyzochytrium limacinum*; C: dodatak 1 % pripravka mikroalge *Schyzochytrium limacinum*

[2] ns: nije statistički značajno; *: statistički značajno uz razinu $P<0,05$

Na slici 4.1. prikazane su učestalosti (frekvencije) primijećenih razlika između uzoraka triangl parova po svojstvima kada je odgovor bio točan. Iz slike možemo iščitati da su ocjenjivači najčešće iskazali razliku između uzoraka tretmana A : B u svojstvu boje i teksture (33,33 % odgovora), a nešto manje mirisa (26,67 % odgovora), dok je razlika u okusu bila vrlo mala (6,67 % odgovora). Razlike između uzoraka pokusnih tretmana B : C bile su najviše pripisane okusu (36,36 % odgovora), boji i mirisu (27,07 % odgovora), dok je najrjeđe iskazana razlika u teksturi (9,09 % odgovora). Usprkos indikativnim promjenama svojstava pri dodatku mikroalgi, jedino je u triangl paru kontrolnog tretmana A i pokusnog C utvrđena statistička značajnost (Tablica 4.1.) pa je potrebno promjene u tom triangl paru potrebno tumačiti kao bitne. Između uzoraka tretmana A : C najčešće je bila iskazana razlika u okusu (57,89 % odgovora), zatim u boji (26,32 % odgovora), teksturi (15,79 % odgovora), dok razlika u mirisu nije zamijećena. Prijašnja istraživanja Ao i sur. (2015.) kao i Herber i Elswyk (1998.) ukazuju na promjene boje jaja kod udjela dodatka mikroalgi koji su jednaki ili veći od 2 %. U predmetnom istraživanju su korišteni manji udjeli mikroalgi, pa je očekivani manji utjecaj na boju kako je potvrđeno istraživanjem. Uočljiv je učinak na okus jaja, što je bilo očekivano, ali je izostao utjecaj na miris jaja. Navedeno bi mogli pripisati djelovanju topline, usitnjavanja i mastikacije uzorka u ustima, što je moglo pojačati intenzitet i percepciju osjeta okusa u ustima, umanjujući pritom intenzitet promjene u mirisu.



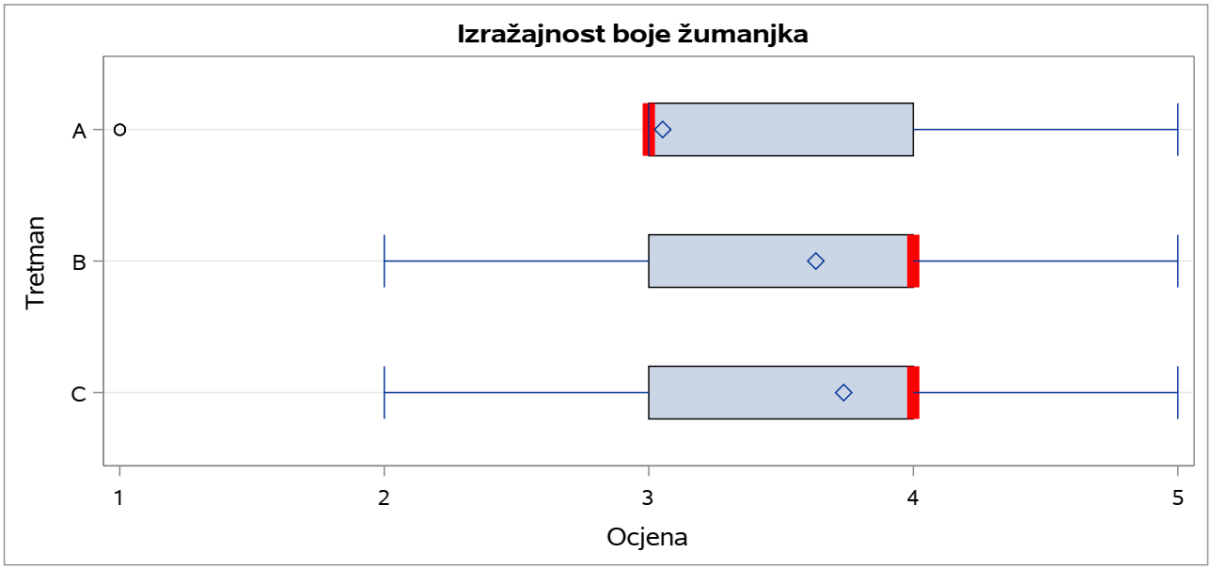
	Tekstura	Okus	Miris	Boja
A : B	33.33%	6.67%	26.67%	33.33%
A : C	15.79%	57.89%	0.00%	26.32%
B : C	9.09%	36.36%	27.27%	27.27%

Slika 4.1. Učestalost primijećenih razlika po svojstvima između uzoraka triangl parova kada je odgovor bio točan

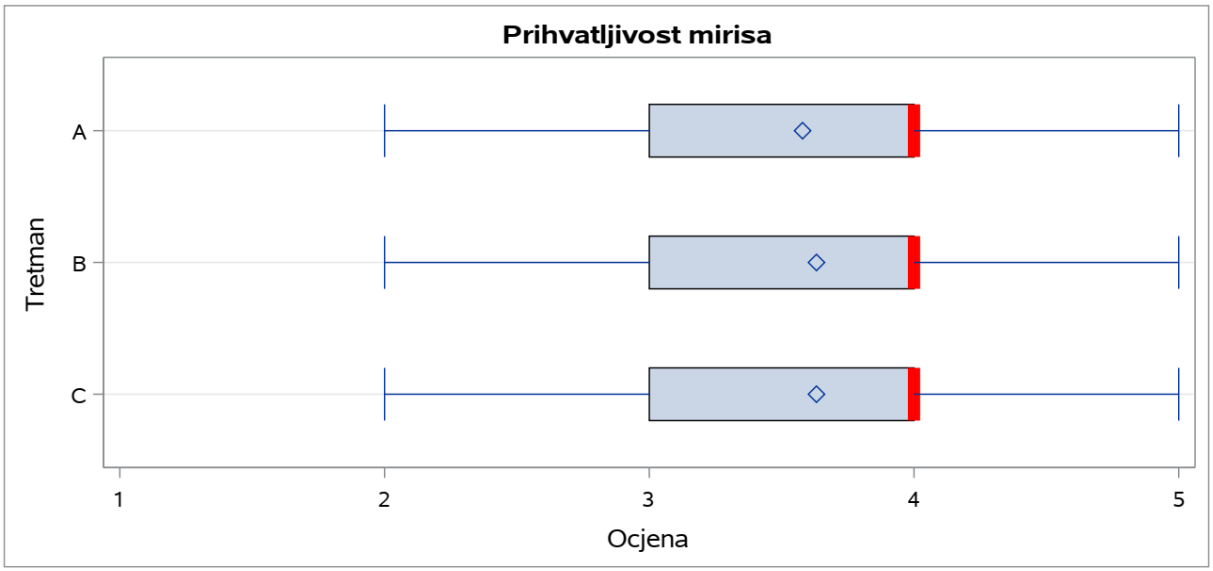
*: Triangl par kod kojeg je između uzoraka tretman utvrđena statistički značajna (P<0,05)
(A: kontrolna skupina; B: skupina s dodatkom 0,5 % pripravka mikroalge *Schyzochytrium limacinum*; C: skupina s dodatkom 1 % pripravka mikroalge *Schyzochytrium limacinum*)

Grafikoni u nastavku prikazuju box-plot dijagrame senzornih svojstava jaja po tretmanima s prikazom prosjeka (romb), medijana (crvena crta), gornjeg i donjeg kvartila (iz kojeg je vidljiv interkvartilni raspon), korigiranog maksimuma i minimuma (whisker) te stvarni minimum prikazan kao kružić kod svojstva izražajnost boje žumanjka kod tretmana A. Pritom slika 4.2. prikazuje box-plot dijagram svojstva izražajnosti boje žumanjka, slika 4.3. prikazuje box-plot dijagram svojstva prihvatljivosti mirisa, a slika 4.4. prikazuje box-plot dijagram svojstva ukupne dopadljivosti.

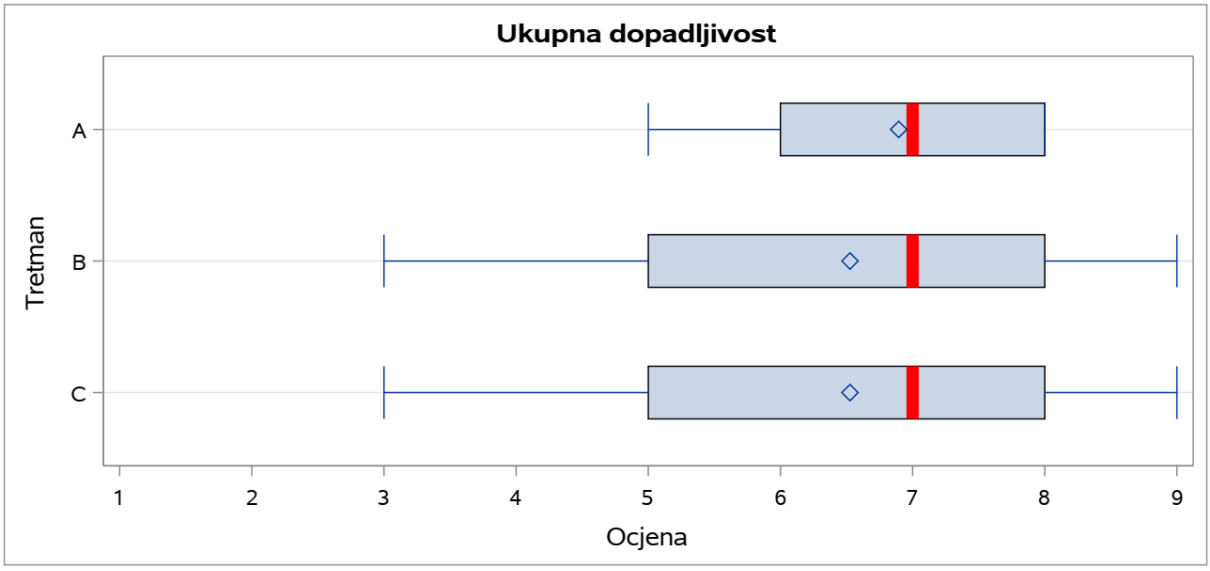
Medijani, donji i gornji kvartili, korigirani minimumi i maksimumi kod svojstava izražajnosti boje žumanjka, prihvatljivosti mirisa i ukupne dopadljivosti kod pokusnih tretmana B i C su bili jednakih vrijednosti. Interkvartilni raspon u kojem se nalazi 50 % središnjih opažanja te je vizualno uočljiv pokazatelj varijabilnosti svojstva je bio vrlo ujednačen između tretmana unutar svojstva, jedino je uočeni manji interkvartilni raspon kod svojstva ukupne dopadljivosti tretmana A. Slično tome, medijani svih tretmana unutar svojstva su bili jednakih vrijednosti, osim kod tretmana A kod svojstva izražajnosti boje žumanjka koji je bio manji. Vrijedno je uočiti da jedino kod tretmana A u svojstvu izražajnosti boje žumanjka postojao stvarni minimum koji je manji od korigiranog minimuma (whiskera), kao i opažanje da samo kod tretmana A u svojstvu ukupna dopadljivost nije uočena najveća moguća ocjena (9). Temeljem iznesenog možemo zaključiti da je najmanja varijabilnost svojstava bila prisutna kod jaja kontrolnog tretmana A, dok su jaja iz pokusnih tretmana bila većih, ali međusobno jednakih varijabilnosti.



Slika 4.2. Box-plot dijagram svojstva izražajnosti boje žumanjka po tretmanima
(A: kontrolna skupina; B: skupina s dodatkom 0,5 % pripravka mikroalge *Schyzochytrium limacinum*; C: skupina s dodatkom 1 % pripravka mikroalge *Schyzochytrium limacinum*)



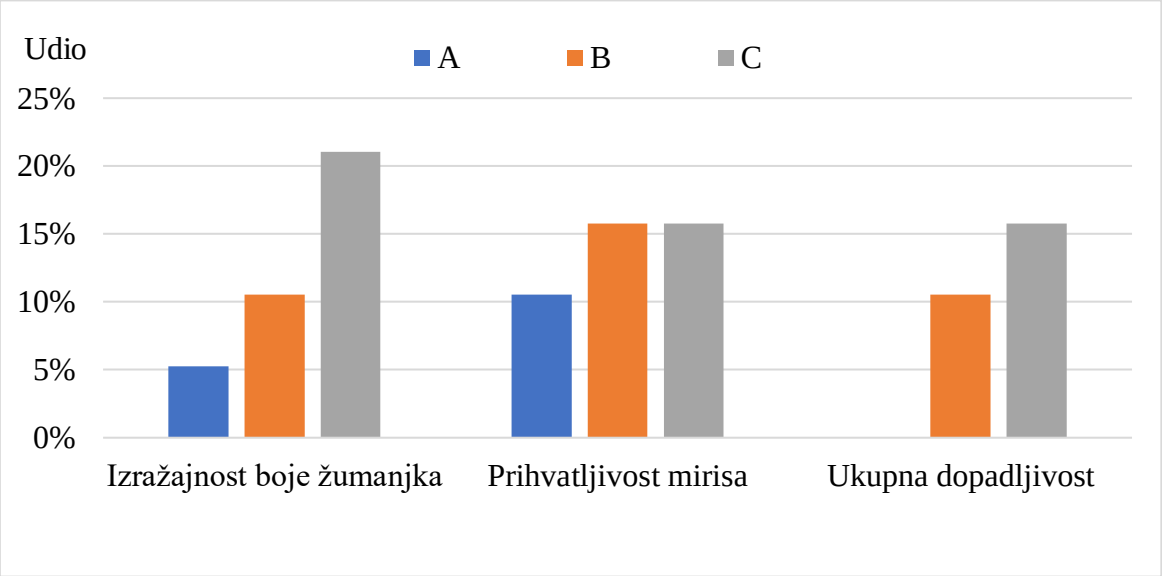
Slika 4.3. Box-plot dijagram svojstva prihvatljivosti mirisa po tretmanima
(A: kontrolna skupina; B: skupina s dodatkom 0,5 % pripravka mikroalge *Schyzochytrium limacinum*; C: skupina s dodatkom 1 % pripravka mikroalge *Schyzochytrium limacinum*)



Slika 4.4. Box-plot dijagram svojstva ukupne dopadljivosti po tretmanima
(A: kontrolna skupina; B: skupina s dodatkom 0,5 % pripravka mikroalge *Schyzochytrium limacinum*; C: skupina s dodatkom 1 % pripravka mikroalge *Schyzochytrium limacinum*)

Na slici 4.5. prikazan je udio (%) najveće ocjene po svojstvima i tretmanima iz koje je razvodno da se udio najveće ocjene izražajnosti boje žumanjka povećavao s povećanjem udjela mikroalgi u hranu što se može pripisati bogatom udio karotenoida u mikroalgama. Herber i Elswyk (1998.) navode da su jaja kokoši hranjenih morskim mikroalgama obogaćenim n-3 masnim kiselinama značajno povećala vrijednost crvenila (a*) žumanjaka u usporedbi s kontrolnim grupama. Isti autori navode kako se povećanje vrijednosti crvenila (a*) žumanjaka najvjerojatnije može pripisati taloženju karotenoida morskih mikroalgi.

Neki sastojci mikroalgi koji se koriste za obogaćivanje jaja s polinezasićenim n-3 masnim kiselinama prirodni su izvori karotenoida, a njihova uporaba u hranidbi kokoši nesilica povećava indeks boje žumanjka.

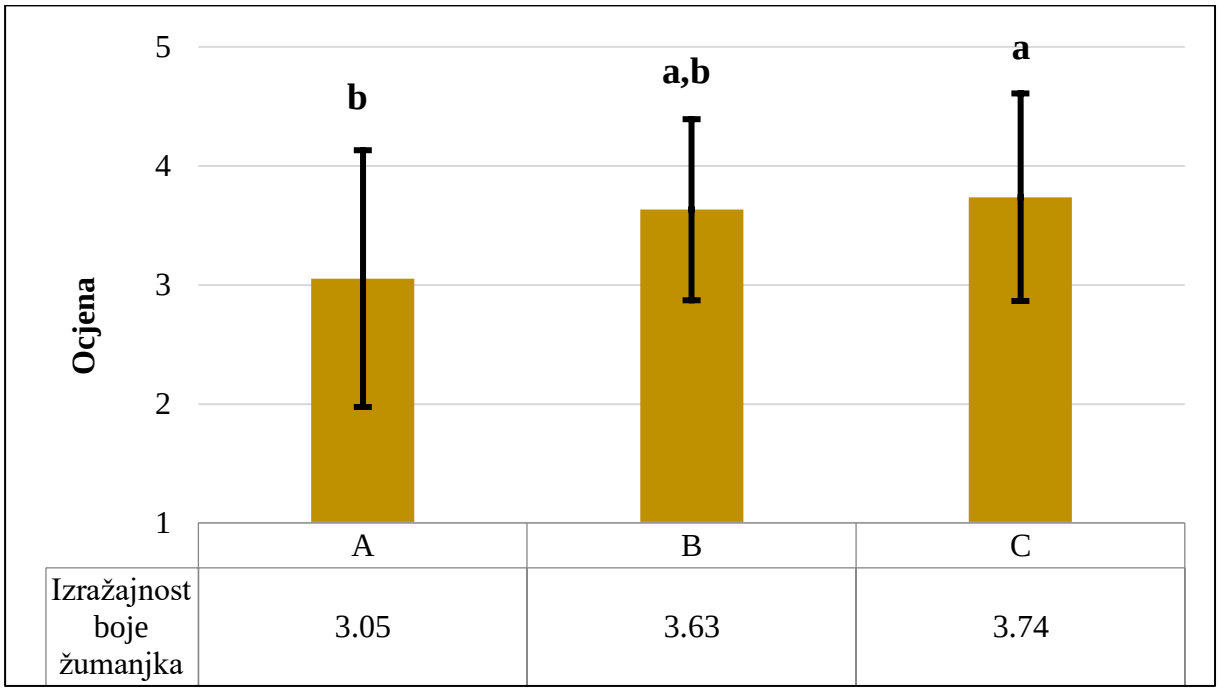


Slika 4.5. Udio najveće ocjene po svojstvima i tretmanima
(A: kontrolna skupina; B: skupina s dodatkom 0,5 % pripravka mikroalge *Schyzochytrium limacinum*; C: skupina s dodatkom 1 % pripravka mikroalge *Schyzochytrium limacinum*)

Aki i sur. (2003.) izvijestili su o visokim razinama β-karotena i ksantofila, uključujući kantaksantin i astaksantin u *Schizochytriumu* te su Kotrbáček i sur. (2013.) potvrdili da se karotenoidi učinkovito talože u žumanjku jaja kada se dodaju hrani za perad. Stoga, dodavanje mikroalgi u hranidbu kokoši nesilica učinkovito povećava boju žumanjaka što pridonosi pigmentaciji žumanjaka.

Udio najveće ocjene prihvatljivosti mirisa nije se značajno mijenjao između tretmana iz čega zaključujemo da analitičari to svojstvo nisu percipirali kao različito. Uočljivo je da je kod kontrolnog tretmana A izostala najveća ocjena za ukupnu dopadljivost, dok je njezin udio kod pokusnih tretmana bio između 10 (tretman B) i 15 % (tretman C). Svojstva izražajnosti boje žumanjka i ukupna dopadljivost pokazuju sličan trend, odnosno porast udjela najveće ocjene s povećanjem udjela mikroalgi u hrani kokoši.

Na slici 4.6. prikazani su prosjeci (kao stupci) i standardna devijacija (kao linije) svojstva izražajnosti boje žumanjka po tretmanima. Iz slike je vidljivo kako se s povećanjem udjela dodatka mikroalgi u hranu nesilica od tretmana A do C povećava izražajnost boje žumanjka. Statističkom obradom je utvrđeno da je tretman C koji je sadržavao u hrani kokoši najveći udio mikroalgi (1 %) imao najveću izražajnost boje žumanjka (3,74). Kontrolni tretman A (bez dodatka mikroalgi) imao je najmanju izražajnost boje žumanjka (3,05) što predstavlja statistički značajno manju vrijednost u odnosu na tretman C. Tretman B (0,5 % mikroalgi u hrani) je imao intermedijarnu vrijednost izražajnosti boje žumanjka te se nije značajno razlikovao od druga dva tretmana, iako je vrijednošću (3,63) sličan tretmanu C (3,74).



Slika 4.6. Grafički prikaz izražajnosti boje žumanjka po tretmanima (okomite linije predstavljaju standardnu devijaciju)

A: kontrolna skupina; B: skupina s dodatkom 0,5 % pripravka mikroalge Schyzochytrium limacinum; C: skupina s dodatkom 1 % pripravka mikroalge Schyzochytrium limacinum

*stupci označeni različitim slovima značajno se razlikuju; LSD test, P<0,05

Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima Walker i sur. (2012.) koji su u istraživanju koristili 4 vrste smjese za kokoši nesilice. Uz kontrolnu smjesu A, koristili su smjese koje su sadržavale dodatak mikroalge *Haematococcus pluvialis* u iznosu od 0,49 % za smjesu B, 1,47 % za smjesu C i 2,94 % za smjesu D. Mjerenja su provedena na svježim žumanjcima i kuhanim žumanjcima, te je kod svih uzoraka došlo do promijene u L*, a* i b* vrijednostima za boju žumanjka. L* vrijednost je smanjena kod svih uzoraka s povećanjem udjela mikroalge u sastavu smjese, što znači da su jaja tamnije boje. Vrijednosti a* žumanjaka drastično su porasle, što je trajanje hranjenja bilo duže i koncentracija mikroalge veća, uzorci su postajali crveniji. Vrijednosti b* pokazale su manje i sporije promjene u odnosu na vrijednosti L* i a*, ali je i uočena značajna razlika između tretmana. Tvrdo kuhani uzorci žumanjaka pokazali su iste trendove u analizi boja osim vrijednosti koje su bile niže za a* i b*, a veće za L*. Moguć razlog

tome su promjene matrice žumanjka izazvanih kuhanjem i denaturacijom proteina. Drugi razlog razlike mogao bi biti svjetlost koja se raspršila s površine čvrstih uzoraka koji su optički neravni.

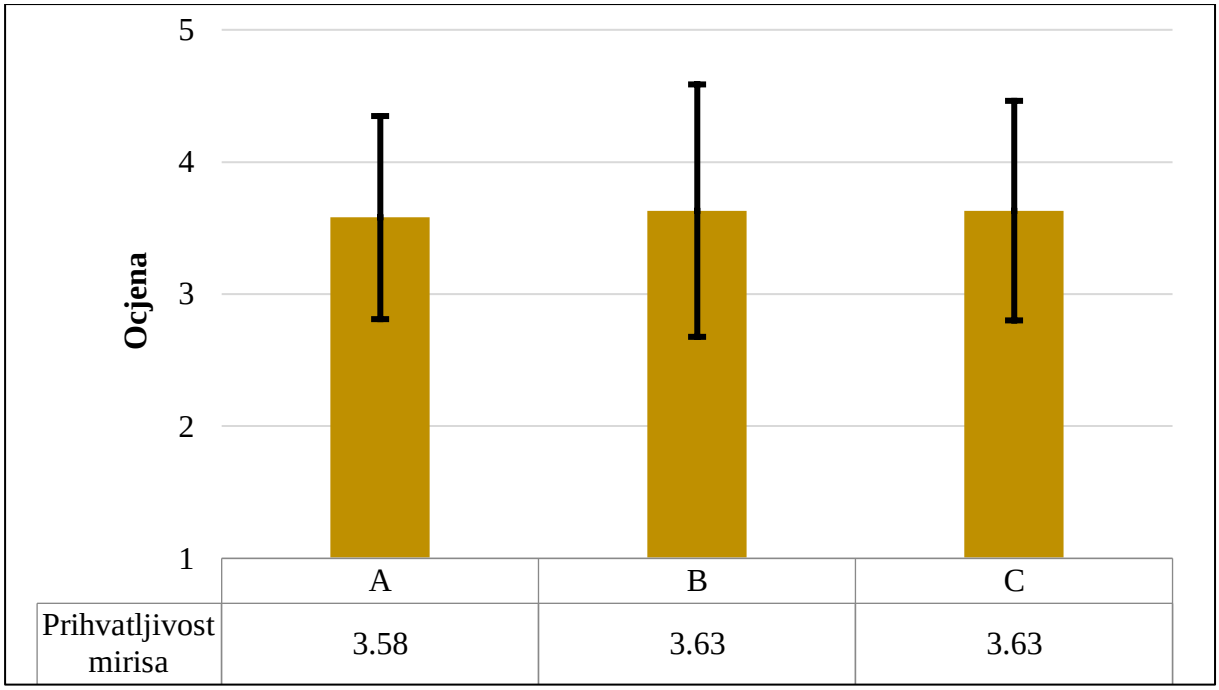
Također, Fredriksson i sur. (2006.) u svom istraživanju navode kako je do promijene u boji žumanjka došlo već nakon prvog tjedna kako su kokoši nesilice bile hranjene dodatkom mikroalgi u smjesu. Kada su mikroalge u smjesu bile dodane, vrijednost a* se značajno povećala (P <0,001), dok je vrijednost L * bila značajno niža (P <0,001). Dodavanje mikroalgi u prehranu značajno je povećalo sadržaj ukupnih karotenoida u žumanjku (P<0,001). Lutein/zeaksantin i b-karoten dramatično su porasli, a kantaksantin se povećao s 0 na 7,7 mg / kg.

Na temelju dobivenih rezultata i rezultata ostalih istraživanja sa sigurnošću možemo reći kako su mikroalge bogat izvor karotenoida te se njihovim dodavanjem u hranidbu kokoši nesilica značajno obogaćuje boja žumanjka, budući da se karotenoidi veoma djelotvorno talože u jaja i na taj način pospješuju ne samo boju, već i nutritivnu vrijednost jaja (Fredriksson i sur. 2006., McNeill i Van Elswyk 1998.).

Osim mikroalgi, utjecaj na boju žumanjka imaju i neki drugi biljni dodaci među kojima je i maslačak. Mijač i Vrkljan (2018.) izvješćuju o istraživanju u kojem je u kontrolnu smjesu za kokoši nesilice dodavan maslačak u iznosu od 1 % i 3 %. Hranidba uz dodatak maslačka imala je značajan utjecaj na boju žumanjka gdje je za sve vrijednost CIE (L*, a*, b*) kao i za vrijednosti YCF (Yolk Colour Fan lepeza) dovela do statistički značajnih razlika. Na temelju dobivenih rezultata, autori su zaključili da jaja kokoši hranjenih krmnom smjesom u kojoj je sintetski pigment zamijenjen maslačkom odaju dojam "prirodnih" odnosno domaćih jaja.

Na slici 4.7. prikazani su prosjeci (kao stupci) i standardna devijacija (kao linije) svojstva prihvatljivosti mirisa po tretmanima. Iz grafikona je vidljivo kako se s povećanjem udjela dodatka mikroalgi u hranu nesilica od tretmana A do C povećala prihvatljivost mirisa. Statističkom obradom utvrđeno je da su tretmani B i C koji su sadržavali u hrani kokoši 0,5 % i 1 % mikroalgi imali podjednaku prihvatljivost mirisa (3.63) dok je kontrolni tretman A imao manju prihvatljivost mirisa (3,58). Utvrđene razlike nisu bile statistički značajne.

Parpinello i sur. (2004.) u svojim rezultatima navode kako se dodatak od 2 % mikroalge *Schizochytrium sp.* u hranu kokoši nesilica značajno razlikovao za svojstvo mirisa u odnosu na kontrolnu grupu. Također, proveli su dodatno istraživanje u kojem su uz dodatak od 2 % mikroalge u smjesu dodali i ekstrakt ružmarina u iznosu od 2 %. Mikroalgu *Schizochytrium sp.* odabrali su iz razloga što je bogata omega-3 masnim kiselinama. Nije primijećena statistički značajna razlika za svojstvo prihvatljivosti mirisa, no kada su jaja bila ocjenjivana na način da su se pripremila kao kajgana, svojstvo prihvatljivosti okusa je imale manje vrijednosti dok je svojstvo prihvatljivosti mirisa poboljšano.



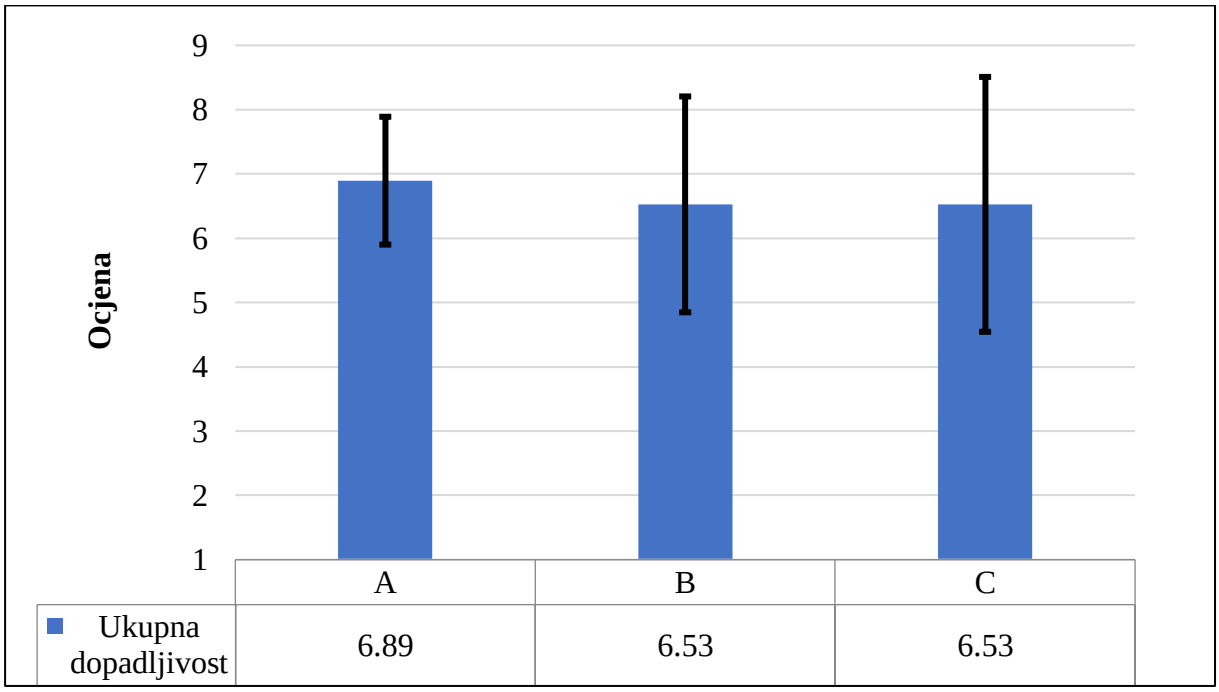
Slika 4.7. Grafički prikaz prihvatljivosti mirisa po tretmanima (okomite linije predstavljaju standardnu devijaciju)

A: kontrolna skupina; B: skupina s dodatkom 0,5 % pripravka mikroalge Schyzochytrium limacinum; C: skupina s dodatkom 1 % pripravka mikroalge Schyzochytrium limacinum

Batista i sur. (2017.) proveli su senzorno ocjenjivanje na kolačićima koji su sadržavali mikroalge *Arthrospira Platensis* i *Chlorella Vulgaris* u dodatku od 2 % i 6 %. Ocjenjivači su za svojstvo mirisa najbolje ocijenili i prihvatili kolačiće sa dodatkom od 2 % *A. Platensis*. Kolačići sa dodatkom od 6 % *A. Platensis* također su imali visoku vrijednost za svojstvo mirisa, ali manju za svojstvo okusa.

Na slici 4.8. prikazani su prosjeci (kao stupci) i standardna devijacija (kao linije) svojstva ukupne dopadljivosti po tretmanima. Iz grafikona je vidljivo kako se s povećanjem udjela dodatka mikroalgi u hranu nesilica od tretmana A do C smanjuje ukupna dopadljivost. Statističkom obradom je utvrđeno da je tretman A koji nije sadržavao dodatak mikroalgi u hranidbu kokoši nesilica imao veću vrijednost za ukupnu dopadljivost (6,89). Tretmani B i C koji su sadržavali dodatak mikroalge u iznosu od 0,5 % i 1 % imali su identičnu vrijednost za svojstvo ukupne dopadljivosti (6,53) što statistički nije značajno manja vrijednost u odnosu na tretman A. Na temelju dobivenih rezultata, možemo zaključiti da usprkos značajno izražajnijoj boji žumanjka nije ostvareno povećanje dopadljivosti mirisa ni ukupne dopadljivosti jaja.

Mnogi autori ukazuju kako rezultati senzornih analiza proizvoda koji u sebi sadrže dodatke mikroalgi poput tjestenine (Abril i Barclay (1998.), kolačića (Singh i sur. 2015., Batista i sur. 2017.) ili jogurta (Dubey i Kumari 2011.) otkrivaju da su ovi proizvodi uglavnom cijenjeni od strane potrošača. Hanaa i sur. (2015.) izvijestili su o keksima koji su sadržavali dodatak mikroalge *Spirulina platensis* u iznosu od 0,3 % 0,6 % i 0,9 %. Keksi su značajno prihvaćeni na temelju senzornih parametara (boja, miris/aroma, okus, tekstura), ukupne ocjene i opće prihvatljivosti.



Slika 4.8. Grafički prikaz ukupne dopadljivosti po tretmanima (okomite linije predstavljaju standardnu devijaciju)

A: kontrolna skupina; B: skupina s dodatkom 0,5 % pripravka mikroalge Schyzochytrium limacinum; C: skupina s dodatkom 1 % pripravka mikroalge Schyzochytrium limacinum

Gorupić (2016.) je u svom istraživanju u hranidbu kokoši nesilica koristila mikroalge (All-G-Rich™) u iznosu od 1 % i 2 %. Utvrđen je trend, statistički neznačajan ($P>0,05$), povećanja dopadljivosti boje, kao i trend smanjenja dopadljivosti mirisa i teksture s povećanjem udjela All-G-Rich™ u hrani. Također, utvrđeno je značajno smanjenje ($P<0,05$) dopadljivosti okusa i ukupne dopadljivosti između kontrolnog tretmana bez dodatka mikroalgi i tretmana koji je sadržavao dodatak od 2 % mikroalgi. Nadalje, utvrđeno je statistički značajno prisustvo stranih aroma između kontrolnog tretmana i tretmana sa 2% dodatka mikroalgi. Pritom se vrijednosti tretmana koji je sadržavao 1 % dodatka mikroalgi za svojstva dopadljivosti boje, mirisa, okusa, teksture i ukupne dopadljivosti nisu značajno razlikovale od kontrolnog tretmana Na temelju dobivenih rezultata autor zaključuje kako je dodatak mikroalgi narušio senzorne karakteristike jaja pri dodavanju 2 % mikroalgi u smjesu nesilicama.

Mnogo je razloga zbog kojih može doći do narušavanja senzornih svojstava jaja. Carrillo i sur. (2008.) navode kako produkti oksidacije mogu biti odgovorni za stvaranje neugodnih svojstava i savjetuju korištenje antioksidansa kako bi se to spriječilo. Također, na negativne senzorne karakteristike mogu uzrokovati i nepravilno rukovanje uzorcima, neispravna oprema, vrsta i kvaliteta mikroalge kao i uvjeti provođenja eksperimenta. Prihvatljivost senzornih svojstava je također dosta individualna stvar. Surai i Sparks (2001.) navode kako prihvatljivost određenih senzornih karakteristika ovisi od države do države. Zemlje poput Čilea u hranu za perad redovito dodaju riblje brašno ili ulje te su samim time navikli na miris i okus "po ribi" kod peradarskih proizvoda. U zemljama Europe se izbjegava korištenje ribljeg brašna jer se okus i miris po ribi smatraju neprihvatljivima.

Osnovni razlog dodavanja mikroalgi u hranu nesilica je poboljšanje masnokiselinskog sastava jaja s čime je povezan koristan utjecaj na ljudsko zdravlje. Postoje brojna istraživanja koja potvrđuju da obogaćena jaja n-3 masnim kiselinama utječu na smanjenje triglicerida u krvi, kao i smanjenje krvnog tlaka i začepljenja krvnih žila (Kralik i sur. 2017.). U skladu s tim, brojna istraživanja su potvrdila povoljan učinak dodavanja mikroalgi na masnokiselinski sastav jaja (Ao i sur. 2015., Herber i Elswyk 1996., Sefer i sur. 2011.). Uz uvjet da je ostvaren povoljan zdravstveni učinak kroz poboljšani sastav masnih kiselina jaja, a bez negativnog utjecaja na senzorne karakteristike kako je utvrđeno ovim istraživanjem, dodatak mikroalgi *Schizochytrium limacinum* u udjelima do 1% u hranu kokoši nesilica može se smatrati korisnim.

5. Zaključak

Na temelju dobivenih rezultata i rasprave možemo zaključiti sljedeće:

- Prema broju točnih odgovora u triangl testu senzorni analitičari su iskazali značajnu razliku između kontrolnog tretmana A i pokusnog tretmana C s dodatkom 1 % mikroalge *Schyzochytrium limacinum*.
- Razlike između kontrolnog tretmana A i pokusnog tretmana B s 0,5 % mikroalge *Schyzochytrium limacinum*, kao ni između pokusnih tretmana međusobno nisu bile statistički značajne.
- Razlike između jaja tretmana A i C najčešće su pripisane okusu (57,89 % odgovora), zatim boji (26,32 % odgovora) i teksturi (15,79 % odgovora), dok razlika u mirisu nije zamijećena.
- Udjeli najveće ocjene u hedonističkim testovima izražajnosti boje žumanjka i ukupne dopadljivosti izraženo su rasli s povećanjem udjela mikroalgi u hrani
- Utvrđeno je da je izražajnost boje žumanjka pokusnog tretmana C bila statistički značajno veća nego kod kontrolnog tretmana A (3,74 naspram 3,05) što se može pripisati bogatom udio karotenoida u mikroalgama.
- Utvrđene su podjednake ocjene prihvatljivosti mirisa jaja, odnosno povećanje udjela dodatka mikroalgi u hranu nesilica nije značajno utjecalo na prihvatljivost mirisa jaja.
- Usprkos većoj ocjeni za ukupnu dopadljivost jaja kontrolnog tretmana A (6,89) nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na pokusne tretmane B i C (6,53 u oba tretmana).
- Mikroalge predstavljaju vrlo bogat i vrijedan izvor hranjivih tvari. Sadrže sve esencijalne aminokiseline i bogate su blagotvornim polinezasićenim masnim kiselinama. Njihova antioksidativna i antikancerogena svojstva predstavljaju potencijalni napredak u medicini i liječenju bolesti. Mnoga istraživanja su navela prednosti korištenja mikroalgi, no usprkos tome i dalje postoje prepreke koje ograničavaju razvoj i globalnu upotrebu. Jedna od bitnih prepreka je skupa proizvodnja biomase mikroalgi i njihovih proizvoda, dok je druga prepreka djelovanje mikroalgi na senzorna svojstva prehrambenih proizvoda. Pritom se najčešće ističe nepovoljan miris i okus po ribi pri većim udjelima zbog čega se potrošači radije odlučuju za proizvod manje nutritivne vrijednosti, ali privlačnijih senzornih karakteristika. Vrlo čest razlog dodavanja mikroalgi u hranu nesilica je poboljšanje masnokiselinskog sastava jaja s čime je povezan koristan utjecaj na ljudsko zdravlje. Uvažavajući navedeno, a bez negativnog utjecaja na senzorne karakteristike kako je utvrđeno ovim istraživanjem, dodatak mikroalgi *Schizochytrium limacinum* u udjelima do 1 % u hranu kokoši nesilica može se smatrati korisnim.

6. Literatura

1. Abril J.R., Barclay W.R. (1998). Production of Docosahexaenoic Acid-Enriched Poultry Eggs and Meat Using an Algae-Based Feed Ingredient. World Review of Nutrition and Dietetics. 83:77-88.
2. Aki T., Hachida K., Yoshinaga M., Katai Y., Yamasaki T., Kawamoto S., Kakizono T., Maoka T., Shigeta S., Suzuki O., Ono K. (2003). Thraustochytrid as a potential source of carotenoids. J. Am. Oil. Chem. Soc. 80:789-794.
3. Ao T., Macalintal L.M., Paul M.A., Pescatore A.J., Cantor A.H., Ford M.J., Timmons B., Dawson K.A. (2015). Effects of supplementing microalgae in laying hen diets on productive performance, fatty-Acid profile, and oxidative stability of eggs. J. Appl. Poult. Res. 24:394–400.
4. Armstrong A.W., Voyles S.V., Armstrong E.J., Fuller E.N., Rutledge J.C. (2011). Angiogenesis and oxidative stress: common mechanisms linking psoriasis with atherhosclerosis. J Dermatol Sci. 63:1–9.
5. Barclay W.R., Meager K.M, Abril J.R. (1994). Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. Journal of Applied Phycology. 6 123-129.
6. Barsanti L., Coltelli P., Evangelista V., Frassanito A.M., Passarelli V., Vesentini N., Gualtieri P. (2008). Oddities and curiosities in the algal world. Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection. Dordrecht: Springer. 353–91.
7. Batista A.P., Niccolai A., Fradinho P., Fragoso S., Buršić I., Rodolfi L., Biondi N., Tredici M.R., Sousa I.S., Raymundo A. (2017). Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. Algal Research. 26 161-171.
8. Becker E.W. (1994). Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press, London.
9. Becker E.W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. Handbook of Microalgal Culture. Blackwell, Oxford. 312-351.
10. Becker E.W. (2007). Microalgae as a source of protein: Research review paper. Biotechnology Advances. 25 207–210
11. Belarbi E.H., Molina E., Chisti Y. (2000). A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. Process Biochemistry. 35:951–69.
12. Bendich A., (1989). Symposium conclusions: biological action of carotenoids. J. Nutr. 119:135–136.
13. Blaženčić J. (2007). Sistematika algi. Beograd: NNK Internacional.
14. Bremer G.B. (1995). Lower marine fungi (labyrinthulomycetes) and the decay of mangrove leaf litter. Hydrobiologia 295. 89-95.
15. Carmeliet P. (2003). Angiogenesis in health and disease. Nature Medicine 9. 653–660.

16. Carrillo S., López E., Casas M.M., Avila E., Castillo R.M., Carranco M.E., Calvo C., Pérez-Gill F. (2008). Potential use of seaweeds in the laying hen ration to improve the quality of n-3 fatty acid enriched eggs. Journal of applied phycology. 20(5): 271-278.
17. Chamorro G., (1980). Etude toxicologique de l'algue Spirulina plante pilote productrice de protéines. (Spirulina de Sosa Texcoco S.A.). UF/MEX/78/048, UNIDO/10.387.
18. Cherrington J.M., Strawn L.M., Shawver L.K. (2000). New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. Adv Cancer Res. 79:1–38.
19. Chin H.J., Shen T.F., Su H.P., Ding S.T. (2006). Schizochytrium limacinum SR-21 as a source of docosahexaenoic acid: optimal growth and use as a dietary supplement for laying hens. Crop and Pasture Science. 57(1) 13-20.
20. Cornish M., Garbary D. (2010). Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. Algae. 25:155–71.
21. da Silva Vaz B., Botelho Moreira J., de Morais M.G., Vieira Costa J.A. (2016). Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. Current Opinion in Food Science. 7:73-77.
22. Del Campo J.A., García González M., Guerrero M.G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology. 74 (6) 1163–1174.
23. Doucha J., Lívanský K., Kotrbáček V. (2009). Production of Chlorella Biomass Enriched by Selenium and Its Use in Animal Nutrition: A Review. Applied Microbiology and Biotechnology. 83/6 1001–1008.
24. Dubey R.P, Kumari P. (2011). Preparation of low fat and high protein frozen yoghurt enriched with papaya pulp and Spirulina. Trends Biosci. 4 182–184.
25. Fabregas J., Herrero C. (1990). Vitamin content of four marine microalgae. Potential use as source of vitamins in nutrition. J. Ind. Microbiol. 5:259–263.
26. Fayzunnessa N., Morshedul A.M., Uddin A., Anzana P., Saifur R. (2011). In vivo study on the efficacy of hypoglycemic activity of Spirulina plantesis in Long Evan rats.. International Journal of Biomolecules and Biomedicine. 1 27-33.
27. Findlay R.H., Fell J.W., Coleman N.K. (1980). In Biology of Marine Fungi. Cambridge University Press: London. 91-103.
28. Fredriksson S., Elwinger K., Pickova J. (2006). Fatty acid and carotenoid composition of egg yolk as an effect of microalgae addition to feed formula for laying hens. Food Chemistry. 99 (2006) 530–537.
29. Gantar M., Svirčev Z. (2008). Microalgae and cyanobacteria: food for thought. Journal of Phy-cology. 44 (2) 260–268.
30. Gerster H. (1998). Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3) Int. J. Vitam. Nutr. Res. 68:159-173.
31. Gill I., Valivety R. (1997). Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and application. Trends Biotechnol. 15 401-409.
32. Ginzberg A., Cohen M., Sod-Moriah U., Shany S., Rosenshtrauch A., Arad S. (2000). Chickens fed with biomass of the red microalga Porphyridium sp. have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. Journal of Applied Phycology. 12 (3-5), 325-330.

33. Godoy Danesi E.D., Rangel-Yagui O.C., Sato S., Monteiro de Carvalho J.C. (2011). Growth and content of spirulina platensis biomass chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources. Brazilian journal of microbiology. 42(1) 362–373.
34. Gorupić M. (2016). Utjecaj dodatka algi na sadržaj omega-3 masnih kiselina i senzorna svojstva jaja. Diplomski rad. Agronomski fakultet Zagreb.
35. Gouveia L., Batista A.P., Sousa I., Raymundo A., Bandarra N.M. (2008b). Microalgae in novel food products. Food Chemistry Research Developments. 75-112.
36. Guedes A.C., Barbosa C.R., Amaro H.M., Pereira C.I., Malcata F.X. (2011). Microalgal and cyanobacterial cell extracts for use as natural antibacterial additives against food pathogens. Int. J. Food Sci. Technol. 46:862–870.
37. Gutiérrez-Salmeán G., Fabila-Castillo L., Chamorro-Cevallos G. (2015). Nutritional and toxicological aspects of Spirulina (Arthrospira). Nutrición Hospitalaria. 32 34-40.
38. Han X., Miao X.L., Wu Q.Y. (2006). High quality biodiesel production from heterotrophic growth of Chlorella protothecoides in fermenters by using starch hydrolysate as organic carbon. J. Biotechnol. 126, 499-507.
39. Hanaa H. El-Baky A., El-Baroty G.S., Ibrahem E.A. (2015). Functional characters evaluation of biscuits sublimated with pure phycocyanin isolated from Spirulina and Spirulina biomass. Nutr. Hosp. 32 231–241.
40. Hasan M.R., Chakrabarti R. (2009). Use of algae and aquatic macrophytes as feed in smallscale aquaculture: a review. In Bulletin: FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 531. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
41. Herber S.M., Van Elswyk M.E. (1996). Dietary marine algae promotes efficient deposition of n-3 fatty acids for the production of enriched shell eggs. Poult. Sci. 75:1501–1507.
42. Herber S.M., Van Elswyk M.E. (1998). Dietary Marine Algae Maintains Egg Consumer Acceptability While Enhancing Yolk Color. Poultry Science. 77:493–496.
43. Hibbeln, J. R., Nieminen L.R.G., Blasbalg T.L., Riggs J.A., Lands W.E.M. (2006). Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: Estimations considering worldwide diversity. Am. J. Clin. Nutr. 83:1483-1493.
44. Huang Z.B., Ackman R.G., Ratnayake W.M.N., Proudfoot F.G. (1990). Effect of dietary fish oil on n-3 fatty acid levels in chicken eggs and thigh flesh. J. Agric. Food Chem. 38:743-747.
45. Jiang Y., Fan K.W., Wong R.T.Y., Chen F. (2004). Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga Schizochytrium mangrovei. J. Agric Food Chem. 52:1196-1200.
46. Khan M.I., Shin J.H., Kim J.D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products: a review. Microb Cell Fact 2018.
47. Kotrbáček V., Skřivan M., Kopecký J., Pěnkava O.P., Hudečková P., Uhríkova I., Doubek J. (2013). Retention of carotenoids in egg yolks of laying hens supplemented with heterotrophic Chlorella. Czech J. Anim. Sci. 58:193-200.

48. Kovač D.J., Simeunović B.J., Babić O.B., Mišan A.Č., Milovanović I.Lj. (2013). Algae in food and feed. Food and Feed Research. 40 (1) 21-31.
49. Kralik G., Kralik Z., Strakova E., Grčević M., Hanžek D. (2017). Enriched eggs as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids for humans. Acta Veterinaria Brno. 86:293-301.
50. Lemahieu C., Bruneel C., Termote-Verhalle R., Muylaert K., Buyse J., Foubert I. (2013). Impact of feed supplementation with different omega-3 rich microalgae species on enrichment of eggs of laying hens. Food Chem. 14:4051-4059.
51. Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. Pharmacogn Rev. 4(8):118–26.
52. Luiten E.E.M., Akkerman I., Koulman A., Kamermans P., Reith H., Barbosa M.J., Sipkema D., Wijffels R.H. (2003). Realizing the promises of marine biotechnology. Biomolecular Engineering. 20:429–39.
53. Madeira M.S., Cardoso C., Lopes P.A., Coelho D., Afonso C., Bandarra N.M., Prates J.A.M. (2017). Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. Livestock Science. 205: 111-121.
54. Martins R.F., Ramos M.F., Herfindal L., Sousa J.A., Skaerven K., Vasconcelos V.M. (2008). Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine cyanobacteria - Synechocystis and Synechococcus. Mar Drugs. 6(1):1–11.
55. McCann J.C., Ames B.N. (2005). Is docosahexaenoic acid, an n3 longchain polyunsaturated fatty acid required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. The American Journal of Clinical Nutrition. 82 (2) 281-295.
56. Mijač I., Vrkljan A. (2018). Mogućnost korištenja krmiva bogatih pigmentima u tovu pilića i proizvodnji konzumnih jaja. Stručni projekt. Agronomski fakultet Zagreb.
57. Mohammed M.K., Mohd M.K. (2011). Production of carotenoids (antioxidants/colourant) in Spirulina platensis in response to indole acetic acid (IAA). International Journal of Engi-neering Science and Technology (IJEST). 3 (6) 4973-4979.
58. Morais M.G., Miranda M.Z., Costa J.A.V. (2006). Biscoitos de chocolate enriquecidos com Spirulina platensis: características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. Aliment. e Nutr. 17:323–328.
59. Ngo D.N., Kim M.M., Kim S.K. (2006). Chitin oligosaccharides inhibit oxidative stress in live cells. Carbohydr Polym. 74:228–34.
60. Ogbonna J.C., Tanaka H., (1998). Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of photosynthetic cells: a method of achieving continuous cell growth under light dark cycles. Bioresour. Technol. 65 65-72.
61. Pangestuti R., Kim S.K. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. J. Funct. Foods. 3:255–266.
62. Park J.H, Upadahava S.D., Kim I.H. (2015). Effect of Dietary Marine Microalgae (Schizochytrium) Powder on Egg Production, Blood Lipid Profiles, Egg Quality and Fatty Acid Composition of Egg Yolk in Layers. Asian Australas. J. Anim. Sci. Vol. 28, March No. 3 391-397.

63. Parpinello G.P., Meluzzi A., Sirri F., Tallarico N., Versari A. (2004). Sensory evaluation of egg products and eggs laid from hens fed diets with different fatty acid composition and supplemented with antioxidants. Food Research International. 39 (2006) 47–52.
64. Patil V., Kallqvist T., Olsen E., Vogt G., Gislerod H.R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. Aquaculture International. 15:1–9.
65. Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. (2008). Free radicals, antioxidants in diseases and health. Int J Biomed Sci. 4(2):89–96.
66. Plaza M., Cifuentes A., Ibanez E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. Trends in Food Science & Technology. 19 (1) 31-39.
67. Pulz O., Gross W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology. 65 (6) 635-648.
68. Raposo M.F.J., Morais R.M.S.C., Morais A.M.M.B. (2013). Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. Mar. Drugs. 11:233–252.
69. Ribeiro T., Lordelo M.M., Costa P., Alves S.P., Benevides W.S., Bessa R.J.B., Lemos J.P.C., Pinto R.M.A., Ferreira L.M.A., Fontes C.M.G.A., Prates J.A.M. (2014). Effect of reduced dietary protein and supplementation with a docosahexaenoic acid product on broiler performance and meat quality. Br. Poult. Sci. 55 752-765.
70. Richmond A., Preiss K. (1980). The biotechnology of algaculture. Interdisciplinary Science Reviews. 5 (1), 60–70.
71. Ruperez P. (2002). Mineral content of edible marine seaweeds. Food Chemistry. 79 (1), 23-26.
72. Shields R.J., Lupatsch I. (2012). Algae for Aquaculture and Animal Feeds.
73. Shin D., Kakani G., Karimi A., Cho Y.M., Kim S.W., Ko Y.G., Shim K.S., Park J.H. (2011). Influence of dietary conjugated linoleic acid and its combination with flaxseed oil or fish oil on saturated fatty acid and n-3 to n-6 fatty acid ratio in broiler chicken meat. Asian Australas. J. Anim. Sci. 24:1249-1255.
74. Simopoulos A.P. (2003). Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids: Evolutionary aspects. World Rev. Nutr. Diet. 92:171-174.
75. Singh P., Singh R., Jha A., Rasane P., Gautam A.K. (2015). Optimization of a process for high fibre and high protein biscuit. J. Food Sci. Technol. 52 1394–1403.
76. Smee D.F., Bailey K.W., Wong M.H. (2008). Treatment of influenza A (H1N1) virus infections in mice and ferrets with cyanovirin-N. Antivir Res. 80(3):266–71.
77. Spolaore P., Joannis Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006). Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering. 101 (2), 8796.
78. Sugawara T., Matsubara K., Akagi R., Mori M., Hirata T. (2006). Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. Agric Food Chem. 54:9805–10.
79. Surai P.F., Sparks N.H.C. (2001). Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. Trends in food science i technology. 12(1): 7-16.

80. Uttara B., Singh A.V., Zamboni P., Mahajan R. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. Curr Neuropharmacol. 7(1):65–74.
81. Vílchez C., Forján E., Cuaresma M., Bédmar F., Garbayo I., Vega J.M. (2011). Marine carotenoids: Biological functions and commercial applications. Mar. Drugs. 9:319–333.
82. Walker L.A., Wang T., Xin H., Dolde D. (2012). Supplementation of Laying-Hen Feed with Palm Tocos and Algae Astaxanthin for Egg Yolk Nutrient Enrichment. Journal of agricultural and food chemistry. 60. 1989-99.
83. Washida K., Koyama T., Yamada K., Kitab M., Urmura D. (2006). Karatungiols A and B two novel antimicrobial polyol compounds, from the symbiotic marine dinoflagellate Amphidinium sp. Tetrahedron Lett. 47(15):2521–5.
84. Wijesekara I., Pangestuti R., Kim S.K. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydr. Polym. 84:14–21.
85. Winwood R.J. (2015). 6 - Algal oils: Properties and processing for use in foods and supplements. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition. Woodhead Publishing. 159-172.
86. Yen H.W., Hu I.C., Chen C.Y., Ho S.H., Lee D.J., Chang J.S. (2013). Microalgae-based biorefinery - From biofuels to natural products. Bioresour. Technol. 135:166–174.
87. Zahroojian N., Moravej H., Shivazad M. (2011). Comparison of marine algae (Spirulina platensis) and synthetic pigment in enhancing egg yolk colour of laying hens. British poultry science. 52 584-8.
88. Zappe H., Snell M.E., Bossard M.J. (2008). PEGylation of cyanovirin-N, an entry inhibitor of HIV. Adv Drug Deliv Rev. 60(1):79–87.
89. Zeller S., Barclay W., Abril R., (2001). Production of Docosahexaenoic Acid from Microalgae. ACS Symposium Series; American Chemical Society.
90. Zhu L., Zhan, X., Ji L., Song X., Kuang C. (2007). Changes of lipid content and fatty acid composition of Schizochytrium limacinum in response to different temperatures and salinities. Process Biochemistry. 42:(2) 210-214.

7. Životopis

Ivana Mijač rođena je 11. veljače 1994. godine u gradu Čapljina u Bosni i Hercegovini. Nakon završene osnovne škole u Popovcu u Osječko-baranjskoj županiji, 2008. godine upisuje Opću Gimnaziju u Belom Manastiru.

Po završetku srednje škole 2012. godine upisuje preddiplomski studij Animalne znanosti na Agronomskom fakultetu u Zagrebu i 2016. godine stječe akademski naziv sveučilišne prvostupnice Animalnih znanosti. Potom upisuje diplomski studij Proizvodnja i prerada mesa na istom fakultetu koji završava 2019. godine stjecanjem akademskog naziva magistre inženjerke Proizvodnje i prerade mesa.

Tijekom studiranja bila je aktivna članica veslačkog kluba Agronomskog fakulteta i nastupala je na brojnim sveučilišnim i memorijalnim regatama. Po završetku studiranja 2019. godine odlazi na dragovoljno vojno osposobljavanje i karijeru počinje graditi u Oružanim snagama Republike Hrvatske.