

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Radanović, mag.ing.agr.

**OBOGAĆIVANJE JAJA S N-3 POLINEZASIĆENIM MASNIM
KISELINAMA I UTJECAJ KONZUMACIJE JAJA NA
LJUDSKO ZDRAVLJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2023.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Radanović, mag.ing.agr.

**OBOGAĆIVANJE JAJA S N-3 POLINEZASIĆENIM MASNIM
KISELINAMA I UTJECAJ KONZUMACIJE JAJA NA
LJUDSKO ZDRAVLJE**

- Doktorska disertacija -

Osijek, 2023.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Radanović, mag.ing.agr.

**OBOGAĆIVANJE JAJA S N-3 POLINEZASIĆENIM MASNIM
KISELINAMA I UTJECAJ KONZUMACIJE JAJA NA
LJUDSKO ZDRAVLJE**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Zlata Kralik

Povjerenstvo za ocjenu:

- 1. dr. sc. dr. h. c. Gordana Kralik, profesorica emeritus Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, predsjednica**
- 2. dr. sc. Ines Drenjančević, redovita profesorica Medicinskog fakulteta Osijek, članica**
- 3. dr. sc. Olivera Galović, docentica Odjela za kemiju, Sveučilišta Josipa Juraj Strossmayera u Osijeku, članica**

Osijek, 2023.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Radanović, mag.ing.agr.

**OBOGAĆIVANJE JAJA S N-3 POLINEZASIĆENIM MASNIM
KISELINAMA I UTJECAJ KONZUMACIJE JAJA NA
LJUDSKO ZDRAVLJE**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr. sc. Zlata Kralik

**Javna obrana doktorske disertacije održana je 06. listopada 2023. godine pred
Povjerenstvom za obranu:**

- 4. dr. sc. dr. h. c. Gordana Kralik, profesorica emeritus Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, predsjednica**
- 5. dr. sc. Ines Drenjančević, redovita profesorica Medicinskog fakulteta Osijek, članica**
- 6. dr. sc. Olivera Galović, docentica Odjela za kemiju, Sveučilišta Josipa Juraj Strossmayera u Osijeku, članica**

Osijek, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij: Poljoprivredne znanosti

Smjer:

UDK:

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Poljoprivreda

Grana: Stočarstvo

Obogaćivanje jaja s n-3 polinezasićenim masnim kiselinama i utjecaj konzumacije jaja na ljudsko zdravlje

Ana Radanović, mag.ing.agr.

Disertacija je izrađena na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: Prof. dr. sc. Zlata Kralik

U disertaciji se istražuju postupci obogaćivanja konzumnih jaja s n-3 polinezasićenim masnim kiselinama i utjecaj obogaćenih jaja na ljudsko zdravlje. Za istraživanje je upotrebjeno 480 TETRA SL nesilica koje su podijeljene u tri skupine (tretmani K, P1 i P2). Smjesa tretmana K bila je kontrolna i sadržavala je 5% sojinog ulja. Smjese tretmana P1 i P2 sadržavale su umjesto sojinog ulja kombinaciju lanenog i ribljeg ulja 3,5% + 1,5%, odnosno 3% i 2%. Utvrđene su značajne razlike ($P=0,001$) između $\sum n-3$ PUFA kao i omjera $\sum n-6/n-3$ PUFA između kontrolne i pokusnih smjesa za nesilice ($P=0,001$). Kontrolna smjesa za nesilice sadržavala je 5,04%, P1 smjesa 33,86%, a P2 smjesa 33,59% $\sum n-3$ PUFA. Omjer $\sum n-6/\sum n-3$ PUFA iznosio je u kontrolnoj smjesi 10,28:1, P1 smjesi 0,69:1 i P2 smjesi 0,68:1. Profili masnih kiselina u lipidima jaja ovisili su o hranidbenim tretmanima. Rezultati analize sadržaja ALA, EPA i DHA pokazuju da su jaja P1 i P2 skupina značajno obogaćena s n-3 PUFA u odnosu na K skupinu jaja ($P=0,001$) i to: ALA (5,6 % i 5,2%), EPA (0,4% i 0,4%) i DHA (2,8% i 2,7%), a sve bez negativnog utjecaja na pokazatelje kvalitete jaja. Profili n-3 PUFA u krvi ispitanika pri konzumaciji konvencionalnih i obogaćenih jaja (tretmani K i P1) statistički su se značajno razlikovali u $\sum SFA$ ($P=0,041$) i sadržaju ALA ($P=0,010$). Konzumacijom n-3 PUFA obogaćenih jaja ostvareno je smanjenje omjera $\sum n-6$ PUFA/ $\sum n-3$ PUFA u serumu ispitanika (27%) kao i povoljan utjecaj na određen biokemijske pokazatelje.

Broj stranica: 121

Broj slika i grafikona: 21

Broj tablica: 29

Broj literaturnih navoda: 265

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: n-3 PUFA, profil masnih kiselina, indeksi zdravlja jaja, kardiovaskularne bolesti

Datum obrane: 06. listopada 2023.

Povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. dr. h. c. Gordana Kralik- predsjednik
2. dr. sc. Ines Drenjančević - član
3. dr. sc. Olivera Galović- član

Disertacija je pohranjena u:

Nacionalna i sveučilišna knjižnica u Zagrebu, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Zagrebu, Sveučilište u Rijeci, Sveučilište u Splitu

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek

PhD thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Postgraduate university study: Agricultural sciences

Course: Animal Breeding

UDK:

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Agriculture

Branch: Animal Breeding

Enrichment of eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids and the impact of egg consumption on human health

Ana Radanović, mag.ing.agr.

Thesis performed at Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Supervisor: Prof. dr. sc. Zlata Kralik

The dissertation examines the processes of enriching table eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids and the impact of enriched eggs on human health. For the research, 480 TETRA SL layers were used, which were divided into three groups (treatments K, P1 and P2). The K treatment mixture was controlled and contained 5% soybean oil. Treatment mixtures P1 and P2 contained instead of soybean oil a combination of linseed oil and fish oil 3.5% + 1.5%, respectively 3% and 2%. Significant differences ($P=0.001$) were found between $\sum n-3$ PUFA as well as $\sum n-6/n-3$ PUFA ratio between control and experimental mixture for laying hens ($P=0.001$). The control mixture for layers contained 5.04%, P1 mixture 33.86%, and P2 mixture 33.59% $\sum n-3$ PUFA. The ratio of $\sum n-6/\sum n-3$ PUFA was 10.28:1 in the control mixture, 0.69:1 in the P1 mixture and 0.68:1 in the P2 mixture. Fatty acid profiles in egg lipids depended on feeding method. The results of the analysis of the content of ALA, EPA and DHA show that eggs of groups P1 and P2 are significantly enriched in n-3 PUFA compared to eggs of group K ($P=0.001$), namely: ALA (5.6% and 5.2%), EPA (0.4% and 0.4%) and DHA (2.8% and 2.7%), all without negative impact on egg quality indicators. The n-3 PUFA profiles in the blood of subjects who consumed conventional and enriched eggs (treatments K and P1) were statistically significantly different in the content of $\sum$ SFA ($P=0.041$) and ALA ($P=0.010$). The consumption of eggs enriched with n-3 PUFA resulted in a decrease in the ratio of $\sum n-6$ PUFA/ $\sum n-3$ PUFA in the serum of the subjects (27%), as well as a favorable effect on certain biochemical indicators.

Number of pages: 121

Number of figures i graph: 21

Number of tables: 29

Number of references: 265

Original in: croatian

Key words: n-3 PUFA, fatty acid profile, egg health indexes, cardiovascular diseases

Date of the thesis defense: September 15th, 2023.

Reviewers:

1. dr. sc. dr. h. c. Gordana Kralik – president
2. dr. sc. Ines Drenjančević – member
3. dr. sc. Olivera Galović – member

Thesis deposited in:

National and University Library, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, University of Zagreb; University of Rijeka; University of Split

KAZALO

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Proizvodnja i potrošnja jaja	3
2.2. Građa i nutritivna svojstva kokošnjih jaja	4
2.2.1. Građa jaja	4
2.2.2. Formiranje jaja	6
2.2.3. Nutritivna svojstva jaja	7
2.3. Metabolizam n-3 polinezasićenih masnih kiselina i n-6 polinezasićenih masnih kiselina.....	10
2.3.1. Oksidacija masnih kiselina	14
2.4. Utjecaj hranidbe nesilica na povećanje sadržaja n-3 polinezasićenih masnih kiselina u jajima	15
2.5. Jaje - funkcionalna namirnica	21
2.6. Utjecaj hranidbe na proizvodne osobine nesilica i fizikalna svojstva jaja	23
2.7. Senzorna svojstva jaja	25
2.8. Benefit konzumacije n-3 polinezasićenih masnih kiselina kod ljudi	27
3. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA	31
4. MATERIJAL I METODE	32
4.1. Smještaj i hranidba nesilica	32
4.2. Vanjska i unutarnja kvaliteta jaja	34
4.3. Profil masnih kiselina u smjesama za nesilice i u žumanjcima jaja	37
4.3.1. Aterogeni, trombogeni i hipo/hiperkolesterolemični indeksi	38
4.4. Senzorna analiza jaja.....	39
4.5. Određivanje oksidacije lipida u žumanjcima	40
4.6. Odabir ispitanika, analiza krvnih pokazatelja	41
4.7. Statistička obrada podataka	43
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA	44
5.1. Profil masnih kiselina u uljima i smjesama	44
5.2. Proizvodna svojstva nesilica	47
5.3. Pokazatelji vanjske kvalitete jaja	49
5.4. Utjecaj tretmana na unutarnju kvalitetu jaja	51
5.5. Profil masnih kiselina u jajima	55

5.6. Senzorna analiza	65
5.7. Oksidativni procesi u jajima	69
5.8. Klinička ispitivanja na ispitanicima	71
5.8.1. Profil n-3 PUFA u krvi ispitanika	71
5.8.2. Biokemijski pokazatelji krvi ispitanika	74
6. ZAKLJUČCI	87
7. LITERATURA	90
8. SAŽETAK	116
9. SUMMARY	118
10. PRILOG	120
ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

Jaja se smatraju visokovrijednom prehrambenom namirnicom jer sadrže esencijalne aminokiseline, masne kiseline, vitamine i mikroelemente. Mogu se obogatiti funkcionalnim sastojcima-nutricinima ako se nesilice hrane smjesama koje sadrže ili im se dodaju funkcionalni sastojci kao što su n-3 polinezasićene masne kiseline, selen, vitamin E, lutein i drugi. Jaje kao značajan proizvod u prehrani ljudi, smatra se funkcionalnim, ako uz osnovno prehrambeno djelovanje, dodatno utječe na jednu ili više funkcija u organizmu konzumenta, te poboljšava opće stanje organizma i/ili smanjuje rizik od određenih bolesti.

Učestala je uporaba farmakoloških preparata koji sadrže polinezasićene masne kiseline (n-3 PUFA) radi smanjenja kardiološkog rizika i razvoja karcinoma, ateroskleroze i nekih drugih bolesti. Mogući je prirodni način unosa u organizam n-3 PUFA, α -linolenske (ALA), eikosapentaenske (EPA) i dokosaheksaenske masna kiselina (DHA), putem hrane obogaćene navedenim nutrientima. Istražuju se modificirani sastavi smjesa za nesilice koje sadrže poželjna različita krmiva, odnosno funkcionalne sastojke koji se preko metabolizma nesilica ugrađuju u funkcionalni proizvod - jaje.

Najnovija istraživanja vezana su uz obogaćivanje konzumnih jaja s n-3 PUFA kao prirodnog izvora ovog nutriceinta. U skupini dugolančanih masnih kiselina bitne su esencijalne polinezasićene masne kiseline iz n-3 i n-6 serija (njihov sadržaj i omjer n-6/n-3 PUFA). Esencijalne masne kiseline ne mogu se sintetizirati u organizmu nego se moraju unositi hranom. Za ljudski organizam značajne su linolna (LA, C18:2, n-6) i ALA (C18:3, n-3). Pomoću enzimskih reakcija u tijelu nesilica, ove masne kiseline se konvertiraju u polinezasićene masne kiseline dugog ugljikovog lanca (LCPUFA). Iz linolne masne kiseline nastaju n-6 PUFA kao što je arahidonska (ARA, C20:4, n-6), a iz ALA nastaju n-3 PUFA kao što su EPA (C20:5, n-3) i DHA (C22:6, n-3). Bogat izvor n-3 PUFA, posebice ALA su biljna ulja i sjemenje (repica i lan). Riba, riblje ulje i plodovi mora glavni su izvori EPA i DHA. Esencijalne masne kiseline ulaze u strukture svih tkiva, a neophodne su za sintezu staničnih membrana.

Interes za pozitivnu ulogu n-3 PUFA javio se 70- tih godina prošlog stoljeća preko danskih istraživača koji su otkrili da Eskimi na Grenlandu imaju nisku učestalost kardiovaskularnih bolesti iako se prehranjuju namirnicama koje su bogate zasićenim masnim kiselinama. Istraživačka studija je objasnila ovu pojavu prehranjenjem unosom dugolančanih n-3 PUFA odnosno konzumacijom znatnih količina ribe (ulja) i morskih plodova. Utvrđena je veza između konzumacije ribljeg ulja i smanjenja rizika od smrtnosti infarkta miokarda. Također je dokazano da n-3 PUFA utječu na smanjenje razine triglicerida u krvi, smanjenje krvnog tlaka,

preveniraju nastanka dijabetesa tipa 2 i nekih oblika karcinoma. Metabolizmom n-6 PUFA nastaju proagregacijski snažni upalni eikozanoidi, a n-3 PUFA djeluju suprotno, protuupalno. Metaboličko djelovanje n-6 PUFA i n-3 PUFA u organizmu je antagonističko i kompetitivno, te je bitan njihov omjer u prehrani. Jaja obogaćena s n-3 PUFA trebaju odgovarati po kvaliteti tržišnim zahtjevima kao i preferencijama konzumenata.

U cilju obogaćivanja konzumnih jaja s n-3 PUFA kao i postizanju omjera n-6/n-3 PUFA, prema preporukama nutricionista do 4:1 obavljena su istraživanja na farmi nesilica. Primijenjena su tri hranidbena tretmana s 3 skupine nesilica (K, P1 i P2). Nesilice su hranjene smjesom standardnog sastava (K skupina) i smjesama modificiranog sastava (P1 i P2) skupine uz uporabu lanenog i ribljeg ulja u dvije različite koncentracije. Određivanjem aterogenih (AI), trombogenih (TI) i hipo/hiperkolesterolemičnih (HHI) indeksa žumanjaka jaja kao indikatora zdravstvenih svojstava žumanjaka utvrđena je prednost P1 i P2 tretmana u odnosu na K tretman. Provedena je senzorna analiza jaja uporabom triangl testa i hedonističkog testa dopadljivosti. Utvrđen je utjecaj dodatka ribljeg ulja u krmnu smjesu za nesilice na senzorna svojstva jaja koji je bio jače primjetan kod P2 nego kod P1 tretmana. Nakon analize pokazatelja unutarnje i vanjske kvalitete jaja, sadržaja n-3 PUFA u obogaćenim jajima i senzorne analize jaja, istraživanje je u drugom dijelu nastavljeno s jajima iz odabrane eksperimentalne skupine P1. Nastavak rada uključio je klinička istraživanja u bolničkim uvjetima na određenom uzorku ispitanika. Odabrani su mladi, zdravi volonteri-ispitanici u dobi 18 do 30 godina s normalnim indeksom tjelesne mase. Ispitanici kontrolne skupine konzumirali su dnevno 264 mg/100 g, a pokusne skupine 1051,60 mg/100 g jaja kroz tri tjedna. Konzumacija obogaćenih jaja s n-3 PUFA utjecala je na profil masnih kiselina i smanjila omjer n-6/n-3 PUFA u serumu ispitanika eksperimentalne skupine prema poželjnim granicama. Rezultati kliničkih ispitivanja pokazali su opravdanost uporabe jaja obogaćenih s n-3 PUFA u prehrani ljudi, u održavanju kardiovaskularnog zdravlja.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Proizvodnja i potrošnja jaja

Intenzivnom proizvodnjom konzumnih jaja u Republici Hrvatskoj opskrbljuje se većina domaćeg tržišta, dok se proizvodnja na malim obiteljskim gospodarstvima svodi na proizvodnju za vlastite potrebe.

Ukupan broj peradi u 2021. godini iznosio je 12,1 milijun kljunova što u odnosu na prethodnu godinu predstavlja pad od 7,4%. Smanjenje broja peradi posljedica je pada broja brojlera za 13%. Istovremeno povećan je broj kokoši nesilica koje čine 27% od ukupnog broja peradi (Tablica 1.)

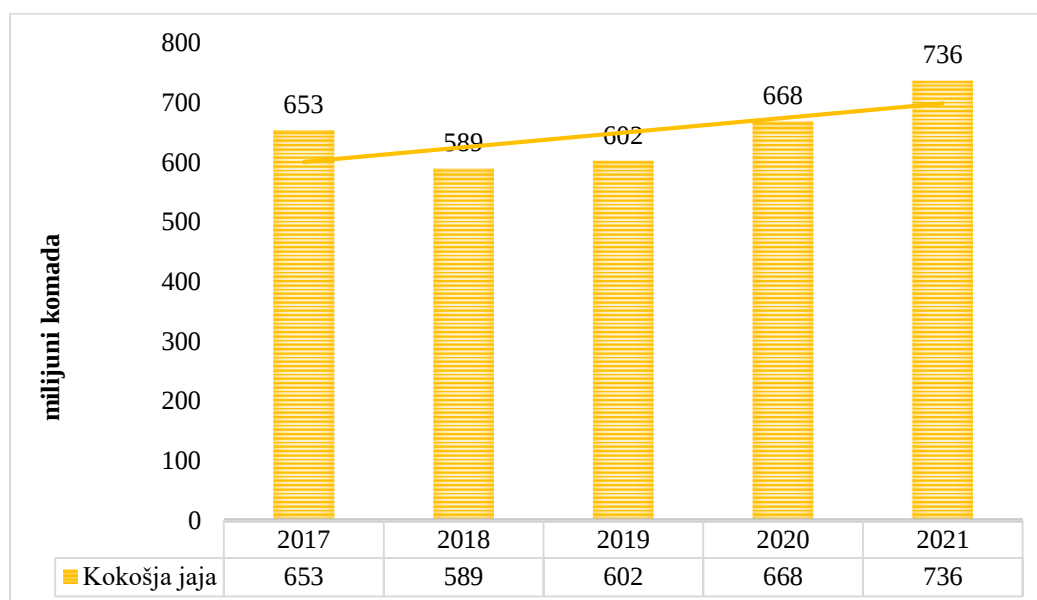
Tablica 1. Brojno stanje peradi, kokoši nesilica i samodostatnost u proizvodnji jaja u RH

Opis	2016.	2017.	2018.	2019.	2020.	2021.
Perad, ukupno	9.856.347	10.399.400	11.412.805	12.156.718	13.056.718	12.096.168
Kokoši nesilice	3.857.519	3.587.198	2.976.254	2.786.363	2.865.082	3.257.409
Samo- dostatnost	87	86	84	87	93	-

Izvor: Ministarstvo poljoprivrede, Zeleno izvješće 2021., str. 52.; Bobetić (2019.)

U 2021. godini proizvodnja kokošjih jaja iznosila je 732 milijuna komada, što je povećanje u odnosu na prethodnu godinu od 9,4%. U 2021. godini Hrvatska je uvezla 2500 tona jaja. Za što bolju organizacije proizvodnje važno je istražiti i kolika je samodostatnost određenog proizvoda. Samodostatnost nam ukazuje je li potrebno povećati proizvodnju ili raditi na tome da se višak proizvedene robe izveze.

Samodostatnost u proizvodnji jaja u RH iznosila je u 2020. godini 93% što nam ukazuje da se ova proizvodnja može povećati. Samodostatnosti u 28 država članica EU posljednjih godina kretala se između 102 i 104% (Szöllösi, 2021.). Procijenjeno je da će proizvodnja jaja i dalje rasti, a osim konvencionalnih jaja, predviđa se i proizvodnja „dizajniranih“ jaja koja se u nekim zemljama EU već godinama razvija. Na Grafikonu 1. prikazana je proizvodnja kokošjih jaja u razdoblju od 2016. do 2021. godine u RH.



*Grafikon 1. Proizvodnja kokošjih jaja od 2016. do 2021. godine u RH
(Izvor: Ministarstvo poljoprivrede, Zeleno izvješće 2021., str. 52.)*

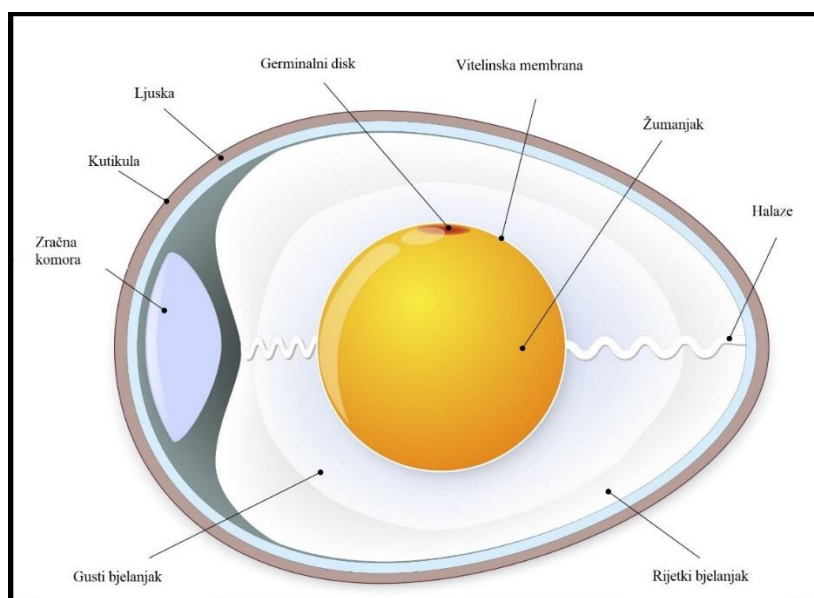
Potrošnja jaja razlikuje se između zemalja. Prosječna potrošnja po osobi u svjetskoj populaciji 2018. godine iznosila je 161 komad godišnje. Postoje razlike u potrošnji jaja. Tako se primjerice u Meksiku po osobi konzumira 368 kom godišnje, u Japanu 337 kom, Južnoj Africi 130 kom, a godišnji prosjek zemalja EU iznosi 210 kom. U Kini se po osobi prosječno konzumira 273 kom, Danskoj 248 kom, Portugalu 145 kom, a u Indiji samo 76 jaja godišnje. Bobetić (2019.) navodi da je prosječna potrošnja jaja u zemljama EU 13,1 kg per capita, a u Hrvatskoj 11 kg per capita. Preračunato proizlazi da je potrošnja u EU 218 kom, a u RH 183 kom per capita na godinu. Projekcije potrošnje na razini EU-28 ukazuju na daljnji rast od 8% do 2030. godine (Szöllősi, 2021.).

2.2. Građa i nutritivna svojstva kokošjih jaja

2.2.1. Građa jaja

Jaja se sastoje od tri glavna dijela: ljuske, bjelanjaka i žumanjaka (Slika 1.). Ljuska je s vanjske strane prekrivena tankim vlažnim slojem kutikule. Ovaj sloj ima zaštitnu ulogu, sprječava kontaminaciju jaja mikroorganizmima iz vanjske sredine. Ljuska je građena od sloja kalcijevog karbonata i dvije membrane - opne ljuske. Struktura ljuske izgleda je matriksa u koji su ugrađeni kalcij i organska tvar. Kada se gleda presjek jaja s unutarnje strane ljuska ima dvije opne. Opna koja obavija ljusku (vanjska opna) i ona koja obavija bjelanjak (unutarnja opna). Nakon nesanja jaja, na tupom djelu se te opne razdvajaju te se stvara zračna komora. Ljuska se stvara u uterusu i to 5-22 sata nakon ovulacije jajne stanice. Bjelanjak jajeta sastoji se od četiri različita sloja,

vanjskog tankog bjelanjka koji se nalazi uz unutarnju membranu ljuske, viskozni ili vanjski debeli bijeli sloj, unutarnji tanki bijeli sloj, koji se nalazi uz sam žumanjak i spiralni gusti sloj bjelanjka koji formira halaze. Sadržaj svakog sloja u postotcima iznosi: oko 23,3%, 57,3%, 16,8% i 2,7%. U svježim jajima, gusti bjelanjak dominira, njegova viskoznost je veća od viskoznosti tankog bjelanjka zbog visokog sadržaja ovomucina. Stajanjem jaja gusti bjelanjak postaje rjeđi, smanjuje mu se viskoznost, a halaze postaju tanje i lomljivije.



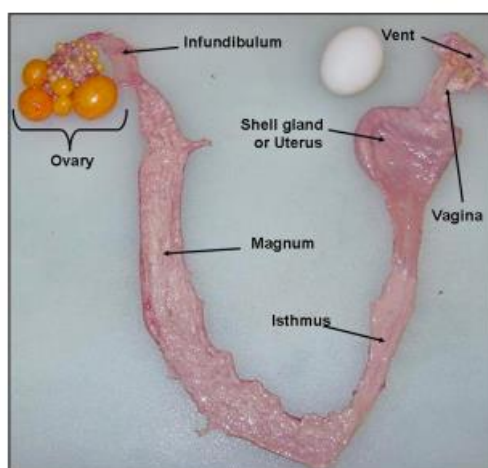
Slika 1. Građa kokošnjeg jajeta, presjek

(Izvor: <https://www.aces.edu/blog/topics/food-safety/structure-of-an-egg/>)

Halaze su spiralnog oblika, spirala je uvijena u smjeru kazaljke na satu i prostire se od tupog odnosno šiljatog dijela do žumanjka. Uloga halaze je da drži žumanjak na sredini. Halaze su malo elastične i dopuštaju ograničenu rotaciju žumanjka. Žumanjak se sastoji od dvije vrste lipoproteinske emulzije svijetlih i tamnih slojeva koncentrično poredanih kao krugovi od vanjske strane prema centru žumanjka. Najzastupljeniji je tamni sloj, a svijetlog sloja ima manje od 2% od ukupnog žumanjka. Tamni sloj žumanjka nastaje danju, a svijetli žumanjak se formira noću, što dovodi do izmjeničnog i kružnog izgleda ovih slojeva žumanjka. Žumanjak je obavljen opnom, u literaturi se ona naziva vitelinska membrana, i na taj je način odvojen od bjelanjka. Kod tek snesenog jajeta debljina ove opne je oko 10 µm. Stajanjem jaja ova opna postaje tanja i propustljivija (Li-Chan i Kim, 2008.). Cijelo jaje sastoji se 9 – 11 % ljuske, 60 – 63 % bjelanjaka i 28 – 29 % žumanjka.

2.2.2. Formiranje jaja

Proces formiranja unutarnjih komponenti i ljuske jajeta složen je i sastoji se od nekoliko faza ili koraka. Prvi korak je ovulacija žumanjka s pridruženom jajnom stanicom iz lijevog jajnika u lijevi jajovod budući da se desni jajnik i jajovod kod kokoši reducira tijekom embrionalnog razvoja. U procesu formiranja jajeta, jajovod se može podijeliti na pet dijelova s obzirom na građu i funkciju: infundibulum, magnum, isthmus, uterus i vagina. Prvi dio jajovoda infundibulum ima ulogu prihvatiti jajnu stanicu nakon ovulacije, te ukoliko je jato rasplodno u ovom dijelu se vrši oplodnja u jajetu. U ovom dijelu jajovoda žumanjak ostaje približno 15 minuta nakon čega se peristaltičkim pokretima jajovoda potiskuje u magnum. U magnumu se zatim odvija proizvodnja bjelanjaka tijekom perioda od 3 sata koji se taloži na žumanjak. Najprije se taloži gusti spiralni sloj koji tvori halaze, na njega se taloži unutrašnji rijetki sloj, zatim srednji gusti sloj te na kraju vanjski rijetki sloj bjelanjaka koji pružaju mehaničku i zaštitnu ulogu žumanjaku. U ovom dijelu nastaju sve bjelancevine bjelanjka (više od 40) dok u daljnjim dijelovima jajovoda - isthimusu i uterusu, jaje prima vodu i mineralne tvari. Nakon magnuma jaje prolazi u isthimus gdje se tijekom jednog sata proizvode vlakna koja čine podlupinsku, vanjsku ili ljuskovnu i unutrašnju ili jajčanu membranu. Razmicanjem vanjske i unutrašnje opne koje se odvajaju u području tupog vrha jajeta, nastaje zrakom ispunjeni prostor koji se naziva zračna komora. U uterusu dolazi do formiranja ljuske jajeta koje traje najduže u procesu formiranja jaja (više od 15 sati). Formiranje ljuske temelji se na odlaganju kalcijeva karbonata (CaCO_3) u oblik kristaličnog kalcita u organski matriks ljuske jajeta. Nakon što jaje u uterusu dobije čvrstu ljusku, kontrakcijama miškulature uterusa potiskuje se u vaginu, a iz vagine u kloaku, čime se završava proces nesenja jajeta (Roberts, 2004.; Amšel Zelenika i sur., 2020.).

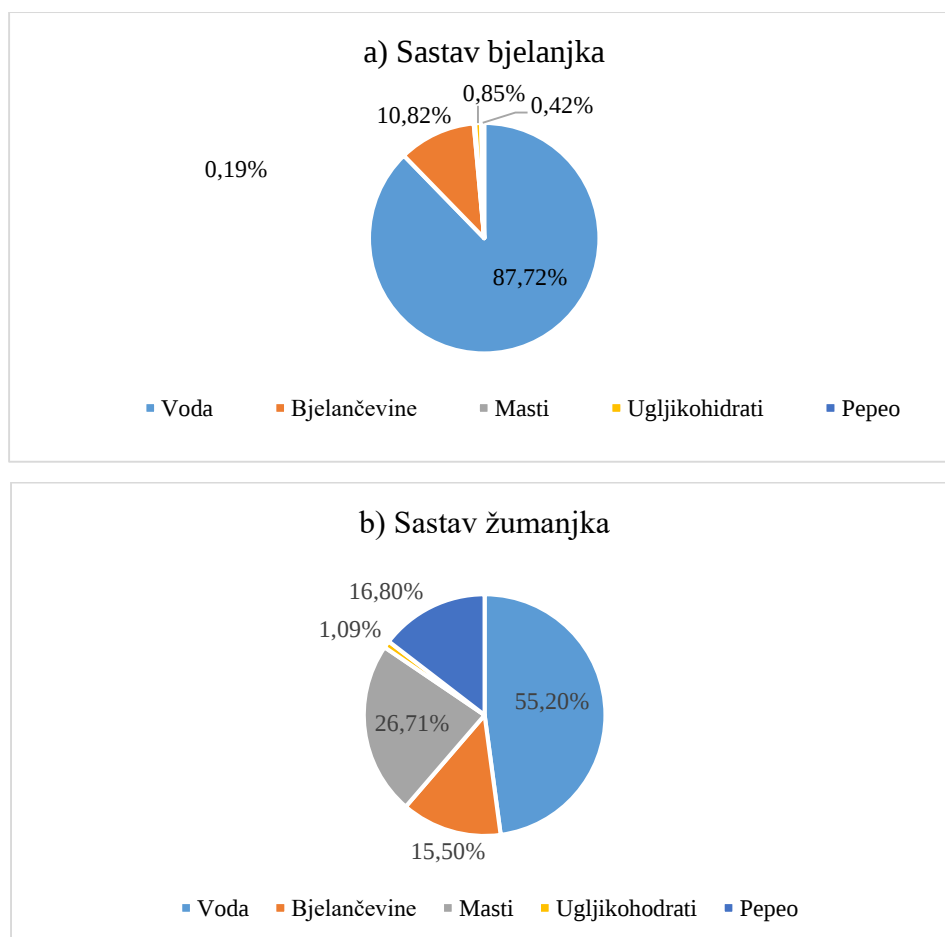


Slika 2. Dijelovi reproduktivnog sustava kokoši (Jacob i Pescatore, 2013.)

Neoplođeno jaje, određene svježine, čiste i neoštećene ljuske, koje odgovara Pravilniku o tržišnim standardima za jaja (NN 90/2021) može se staviti na tržište kao konzumno jaje.

2.2.3. Nutritivna svojstva jaja

Jaje je namirnica visoke biološke vrijednosti s vrlo dobrom iskoristivosti bjelančevina koje se u postotku od 94% ugrađuju u proteine organizma (Sanlier i Üstün, 2021.). Cjenovno je najdostupniji izvor animalnih bjelančevina u prehrani stanovnika u odnosu na druge namirnice (meso, riba). Bogat je izvor vitamina i minerala, sadrži sve esencijalne aminokiseline, masti i masne kiseline i bioaktivne komponentne kao što su lutein, zeaksantin, vitamini D i A, selen i kolin (Puglisi i Fernandez, 2022.). Nutrijenti su dobro izbalansirani, odgovaraju potrebama djece i odraslih osoba, posebice što sadrže i biološki aktivne komponente (Abeyrathne i Ahn, 2015.; Kovacs-Nolan i sur., 2005; Anton i sur. 2011). Svježe jaje sadrži: vode 76,1%, proteina 12,6%, masti 9,5%, ugljikohidrata 0,7% i pepela 1,1% (United States Department of Agriculture (USDA), 2018.). Postoje razlike u sastavu bjelanjaka i žumanjaka (Grafikon 2. a) i b).



Grafikon 2. a) i b). Sastav bjelanjaka i žumanjka (Réhault-Godbert i sur., 2019.)

U žumanjku jaja nalaze se vitamini A, D, E, K, B1, B2, B5, B6, B9 i B12, a bjelanjak sadrži vitamine B2, B3, B5, B1, B6, B8, B9 i B12. Konzumacijom 2 jaja/dan pokriva se 10% do 30% potreba vitamina za ljude. Jaja su bogata fosforom, kalcijem, kalijem i natrijem, a sadrže i mikroelemente kao što su cink, magnezij i selen. Jaja sadrže i kolesterol (250-400 mg/50 g jaja) koji prema najnovijim kliničkim istraživanjima ne utječe značajno na sadržaj kolesterola u krvi ljudi (López Sobaler i sur., 2017.; Kim i Campbell, 2018.).

Bioaktivne komponente sadržane u bjelančevinama i mastima žumanjka jaja doprinose poboljšanju zdravlja ljudi. Smatra se kako primjerice fosfitin ima antimikrobna svojstva u zaštiti od bakterije *Streptococcus* (Puglisi i Fernandez, 2022.) kao i antioksidativnu sposobnost kelatiranja metala željeza (Fe^{3+}). Blesso (2015.) navodi kako fosfolipidi iz žumanjka jaja (fosfatidilkolin i sfingomijelin) imaju ulogu u regulaciji apsorpcije kolesterola, metabolizma lipida u jetri i različitih upala u organizmu. Karotenoidi čine manje od 1% lipida žumanjka i djeluju kao prirodni pigmenti u žumanjku i daju žutu boju koja može varirati od blijedo žute do izraženo narančaste. Kokoši ne mogu sintetizirati karotenoide stoga se oni u organizam nesilice unose egzogeno. Karotenoide žumanjka uglavnom čine lutein, kriptoksantin i zeaksantin (Miranda i sur., 2015.; Li-Chan i Kim, 2008.). Uz minerale žumanjka selen i jod, karotenoidi imaju značajnu antioksidativnu ulogu u neutraliziranju slobodnih radikala i sprječavanju štetnih oksidacijskih procesa u stanici (Nimalaratne i Wu, 2015.).

Glavne masne kiseline u žumanjku jaja su oleinska kiselina (43,6%), palmitinska kiselina (25,1%), linolna kiselina (13,4%), stearinska kiselina (8,6%) i palmitoleinska kiselina (3,6%). Od omega 3 i omega 6 masnih kiselina zastupljene su DHA (1,8%) i arahidonska kiselina (AA; 1,7%) te α - LA i EPA. Općenito na sastav jaja utječe hranidba, dob, pasmina i okolišni uvjeti (Kuang i sur., 2018.). U Tablici 2. prikazani su nutritivni sastojci u konzumnim jajima (Miranda i sur., 2015.)

Tablica 2. Nutritivni sastojci u 100 g konzumnih jaja (Miranda i sur., 2015.)

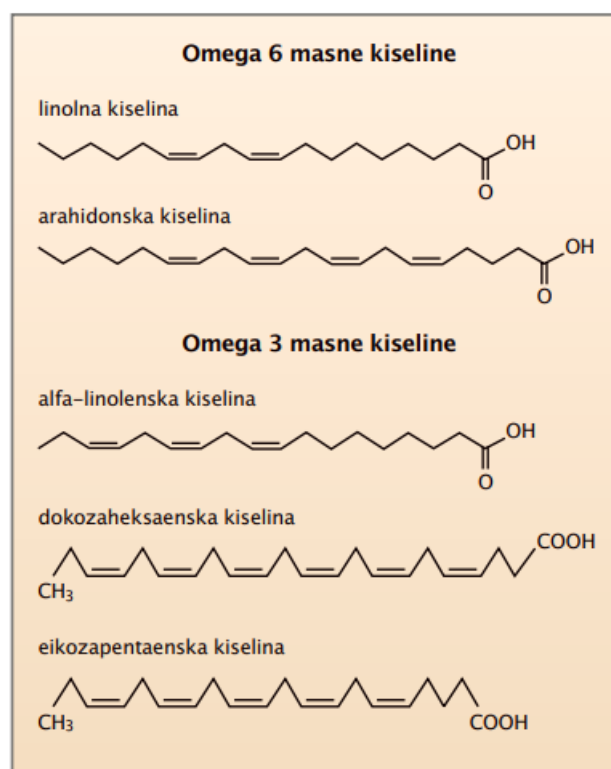
Nutrijenti	Jedinica mjere	Vrijednost u 100 g kokošnjeg jaja
Energija	(Kcal)	162
Bjelančevine	g	12,1
Ugljikohidrati	g	0,68
Masti	g	12,1
(SFA)	g	3,3
(MUFA)	g	4,9
(PUFA)	g	1,8
Kolesterol	mg	410
Energija	(Kcal)	162
Kalcij	mg	50
Željezo	mg	1,19
Magnezij	mg	10
Fosfor	mg	172
Kalij	mg	126
Natrij	mg	124
Cink	mg	1,05
Vitamin C	mg	0
Tiamin	mg	0,066
Riboflavin	mg	0,513
Niacin	mg	0,064
Vitamin B6	mg	0,121
Folat	μg	44
Vitamin B12	μg	1,11
Vitamin A, REA	μg	149
Vitamin A, IU	IU	520
Vitamin E	mg	1,03
Vitamin D (D2+D3)	μg	2,2
Vitamin D	IU	87
Vitamin K	μg	0,3
β - karoten	μg	10
β - kriptoksantin	μg	9
Lutein + zeaksantin	μg	331

2.3. Metabolizam n-3 polinezasićenih masnih kiselina i n-6 polinezasićenih masnih kiselina

Masne kiseline sastavni su dijelovi molekula masti i ulja. Kemijsku strukturu masnih kiselina čini ugljikovodični lanac s terminalnom metilnom skupinom (CH_3 -) na jednom kraju i karboksilnom skupinom ($-\text{COOH}$) na drugom kraju lanca. Nakon unosa u organizam masne kiseline mogu prolaziti tri različita metabolička puta:

- esterifikacija u stanične lipide (trigliceride, fosfolipide i kolesterol estere),
- beta oksidacija masnih kiselina za dobivanje energije i stvaranje ATP-a,
- služiti kao prekursori za enzimske reakcije stvaranja polinezasićenih masnih kiselina.

Stvaranje polinezasićenih masnih kiselina uglavnom se odvija u jetri, a rijeđe u drugim tkivima (Balić i sur., 2020.). PUFA u svojoj strukturi sadrže dvije ili više dvostrukih veza između atoma ugljika, a razlikuju se prema dužini ugljikova lanca, broju dvostrukih veza i lokaciji prve dvostruke veze u ugljikovom lancu prema kojoj se ujedno obavlja i klasifikacija PUFA (Karolyi, 2007.).



Slika 3. Kemijska struktura n-3 PUFA i n-6 PUFA (Vranešić Bender, 2011.)

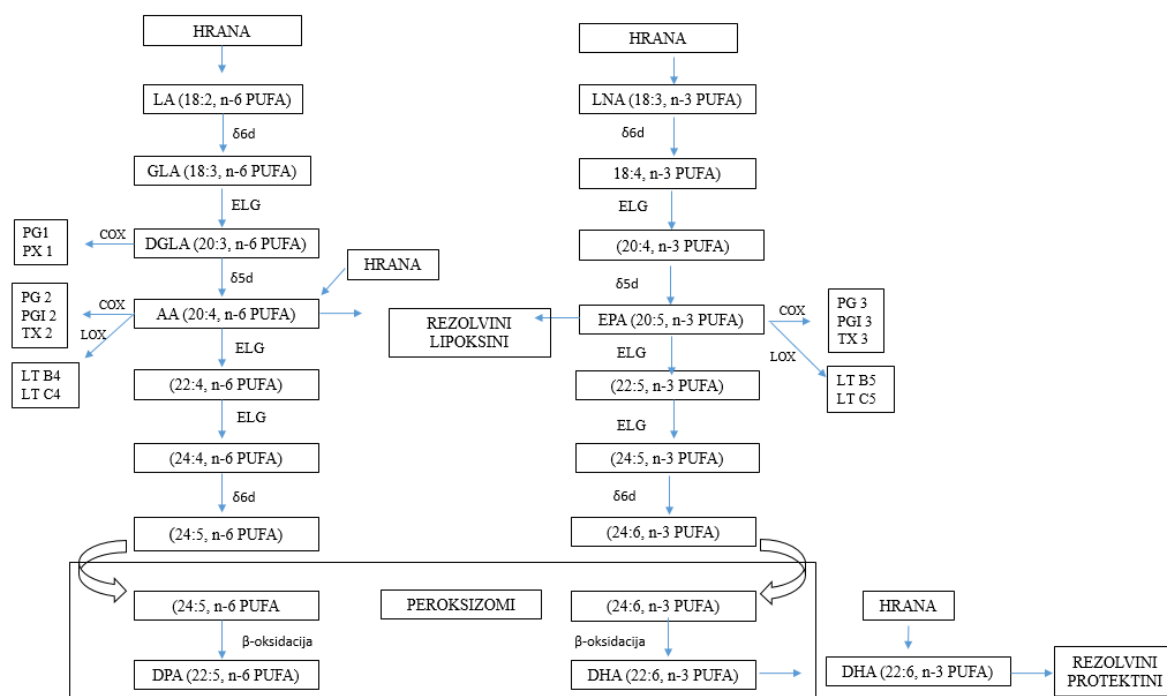
Dvostruke veze uvode se u lancu masnih kiselina iza devetog ugljikovog atoma od metilnog kraja, enzimima koje sisavci ne posjeduju. Esencijalne masne kiseline dijele se na dvije skupine: n-3 PUFA i n-6 PUFA. Slovo „n“ u nazivu polinezasićenih masnih kiselina u literaturi se koristi umjesto termina „omega“ i opisuje poziciju prve dvostruke veze u ugljikovodičnom lancu računajući od metilnog kraja. Prema tome kod n-3 PUFA prva dvostruka veza nalazi se na trećem ugljikovom atomu, dok je kod n-6 PUFA prva dvostruka veza smještena na šestom ugljikovom atomu u ugljikovodičnom lancu.

Ljudskom organizmu nužne su dvije masne kiseline, linolna i α -linolenska koje se u organizam unose putem hrane i čine početne točke za sintezu drugih važnih masnih kiselina. Linolna masna kiselina metabolira se u arahidonsku masnu kiselinu, a α -linolenska se metabolira do eikosapentaenske i dokosaheksaenske masne kiseline. Metabolički put n-6 PUFA i n-3 PUFA sastoji se od niza naizmjeničnih reakcija desaturacije i elongacije pri čemu desaturacijski enzimi uvode novu dvostruku vezu u ugljikov lanac, a elongacijski enzimi dodaju dva nova C atoma (Karolyi, 2007.). Poznati su geni desaturaza (FADS), ključnih enzima u sintezi n-3 PUFA koji ograničavaju brzinu reakcije. FADS1 i FADS 2 lokalizirani na 11 kromosomu (regiji 11q12-13.1) pri čemu FADS1 pokazuje aktivnost Δ 5-desaturaze dok je FADS2 izvorno identificiran kao Δ 6-desaturaza a u dodatnim istraživanjima utvrđeno je kako posjeduju aktivnosti Δ 4- i Δ 8-desaturaze. Također su istraživanjima identificirani geni elongaze ELOVL2 i ELOVL5 smješteni na 6p24.2 odnosno 6p12.1 regiji (Balić i sur., 2020.; Dyll i sur., 2022.).

Prvi korak u sintezi masnih kiselina je desaturacija uz enzim Δ 6-desaturazu pri čemu od LA i ALA nastaju međuprodukti gamalinolenska kiselina (GLA), odnosno stearidonska kiselina (SDA). Drugi korak je elongacija i sinteza dihomogama linolenske kiseline (DGLA) iz GLA i eikozatetraenska masna kiselina (ETA) iz SDA. Zatim slijedi ponovno desaturacija uz Δ 5-desaturazu i sinteza arahidonske i eikosaepentaenske masne kiseline. Dokosaheksaenska masna kiselina se sintetizira iz EPA dodatnim koracima koji se odnose na dvije reakcije elongacije i jednu beta oksidacije. Cjelokupni metabolički put sinteze DHA zahtjeva više koraka (5 do 7) u odnosu na ukupnu sintezu arahidonske masne kiseline koja se odvija u 3 koraka (Brenna, 2016.). Na Slici 4. prikazuje se metabolizam n-6 PUFA i n-3 PUFA.

Nakon sinteze, PUFA se pohranjuju u esterificiranom obliku u fosfolipidima ili kao neutralni gliceridi i mogu prema potrebi, djelovanjem enzima ciklooksigenaza i lipooksigenaza, služiti za stvaranje bioaktivnih signalnih molekula eikozanoida (Balić i sur., 2020.; Vranešić Bender, 2011.). Eikozanodi su tvari slične hormonima koje oslobađa većina stanica i djeluju kao autokrini i parakrini medijatori. Eikozanoidi izvedeni iz n-6 PUFA imaju proupalno djelovanje,

suprotno metabolizmu n-3 PUFA nastaju protuuplani eikozanodi što ukazuje na značajnu ulogu PUFA u održavanju homeostatskih i upalnih procesa u organizmu (Vranešić Bender, 2011.; Balić i sur., 2020.; Zárate i sur., 2017.). S obzirom na antagonističko djelovanje n-6 PUFA i n-3 PUFA u organizmu nužno je održavati izbalansirani omjer ovih masnih kiselina u prehrani ljudi koji se može postići konzumacijom prehrambenih proizvoda obogaćenih s n-3 PUFA kao što su omega jaja (Mariamenatu i Abdu, 2021.). Najefikasniji način povećanja n-3 PUFA u jajima je putem hranidbe nesilica. Nesilice konzumiraju hranu s povećanom koncentracijom pojedinih n-3 PUFA koje se nakon probave transportiraju u jaja. Navedeno se postiže korištenjem namirnica bogatih s n-3 PUFA kao što su riblje ili laneno ulje i sjemenje. Ako je koncentracija n-6 PUFA relativno mnogo veća od n-3 PUFA, zbog kompeticije u enzimu $\Delta 6$ desaturaze, smanjuje se efikasnost konverzije ALA u EPA i DHA (Simopoulos, 2016.). S druge strane visoka razina ALA iz primjerice lanenog ulja ograničava sintezu AA iz LA ukoliko se ono dodaje u hranidbene smjese nesilica (Mazalli i sur., 2004.).



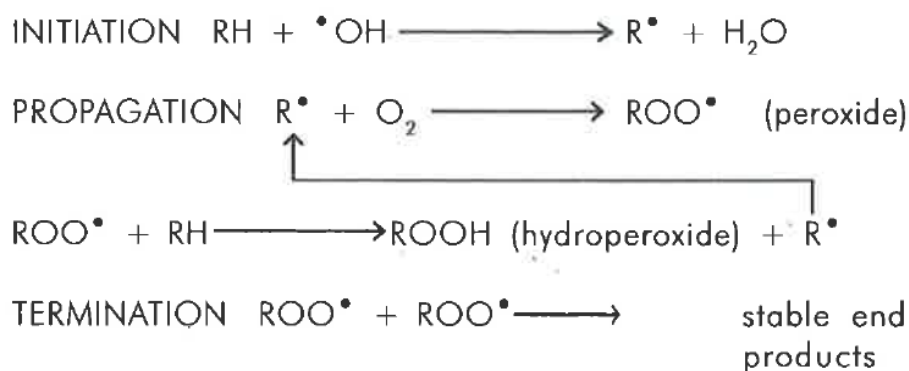
Slika 4. Biokemija n-6 i n-3 PUFA masnih kiselina (adaptirano prema Candela i sur., 2011.)

Kazalo: AA: arahidonska kiselina; DGLA: dihomogama-linolenska kiselina; DHA: dokozaheksaenska kiselina; DPA: dokozapentaenska kiselina; EPA: eikozapentaenska kiselina; GLA: gama-linolenska; LA: linolna kiselina; LNA: linolenska; COX: ciklooksigenaze; ELG: elongaza; LOX: lipoksigenaze; LT: leukotrieni; PG: prostaglandini; PGI: prostaciklini; TX: tromboksani.

Shahid i sur. (2020.) navode kako je korištenjem lanenog ulja u hranidbi nesilica uočena veća ekspresija gena odgovornih za procese desaturacije i elongacije koja ukazuju na bolju konverziju α -linolenske kiseline u DHA i EPA u odnosu na uporabu lanenog sjemena ili standardnih krmnih smjesa na bazi kukuruza. Bolja učinkovitost metaboličkih procesa rezultirala je značajno višim deponiranjem ukupnih n-3 PUFA u žumanjku jaja kod nesilica hranjenih lanenim uljem te povoljnijim omjerom n-6 PUFA/n-3 PUFA koji je od 2 do 12 tjedna primjene dizajniranih smjesa u hranidbi nesilica iznosio od $3,36 \pm 0,24$ do $1,51 \pm 0,04$. Sim i Cherian (1994.) navode da se deponiranje n-3 PUFA u žumanjak jaja postiže već od 9 do 12 tjedna hranidbe nesilica dizajniranim krmnim smjesama. Chen i sur. (1965.) i Van Elswyk (1997.) navode da se sadržaj ALA, EPA i DHA stabilizira već nakon dva do četiri tjedna hranidbe nesilica sa smjesama koje sadrže izvore bogate n-3 PUFA. Kapacitet konverzije dugolančane masne kiseline EPA i DHA u ljudskom organizmu je ograničena (Mariamenatu i Abdu, 2021.). Balić i sur. (2020.) navode stope konverzije od 16% za EPA, odnosno 0,7% za DHA, dok Van Dael (2021.) navodi manje stope konverzija ALA u EPA koja se u prosjeku kreće od 8% do 12%, i istovjetne podatke konverzije DHA koja iznosi <od 1%.

2.3.1. Oksidacija masnih kiselina

Proces autooksidacije masti i ulja može se opisati kroz 3 reakcije: inicijacija, propagacija i terminacija (Adams, 1999.). Prikaz autoooksidacije nalaze se na Slici 5.



Slika 5. Tri faze autooksidacije (Adams, C., 1999..)

Oksidaciju masti započinju odnosno iniciraju različiti slobodni radikali koji su vrlo reaktivne molekule. Supstrat koji se oksidira (RH) konvertira se u alkil radikal odstranjivanjem protona ili elektrona. Kobalt, bakar, željezo i mangan su najznačajniji metali koji iniciraju autoooksidaciju. Faza prolongacije započinje kada kritična količina slobodnih radikala reagira s kisikom i proizvodi alkil perokside koji zatim nastavljaju reakciju s molekulama supstrata te generiraju hidroperokside u nove molekule slobodnih radikala. Ovu fazu karakterizira brza potrošnja kisika i stvaranje energije koja može razoriti osnovno tkivo koje sadrži ulja. U trećoj fazi, terminaciji dolazi do rekombinacije slobodnih radikala koji utječu na stabilnost proizvoda (hidrokarboni, aldehidi, ketoni, alkoholi i organske kiseline). Pri tome dolazi do pojave neprihvatljivog okusa i mirisa. Dodavanjem određenih nezasićenih masnih kiselina u hranu nesilica, kao posljedica u proizvodnji nastaju oštećenja masnih kiselina odnosno aldehidi, nakon čega dolazi do širenja radikala kisika. Brzina oksidacije masnih kiselina ovisi o stupnju nezasićenosti i raste s povećanjem dvostruke veze (Ahmed i sur., 2016.). Prema navedenom, riblje ulje bogato je EPA i DHA masnim kiselinama koje sadrže po 5 ili 6 dvostrukih veza i podložnije je oksidativnim procesima. Hlapljivi produkti oksidacije u ribljem ulju koji su odgovorni za neugodan miris su 1-penten-3-ol, heksanal, 4-(Z) heptenal, 2,4 – (E,E) heptadienal, nonanal i 2,6 (E,Z) nonadienal (Aidos i sur., 2002.) Za detekciju oksidativnog stresa najčešće se koristi kvantifikacija spojeva kao što je malondialdehid. Reakcija malondialdehid s 2-tiobarbitrunom kiselinom (TBA) kao krajnji produkt daje reaktivne

supstance 2-tiobarbitutne kiseline (TBARS, Thiobarbituric Acid Reactive Substances) koji se određuju spektrofotometrijski. Oksidativni procesi u jajima uzrokuju narušavanje nutritivnih i senzornih svojstava jaja.

2.4. Utjecaj hranidbe nesilica na povećanje sadržaja n-3 polinezasićenih masnih kiselina u jajima

Esencijalne masne kiseline doprinose poboljšanju zdravlja i produktivnosti peradi (Alagawany i sur., 2019.). Sastav ukupnih masnih kiselina u konvencionalnim jajima je relativno nepovoljan. Od ukupnih masnih kiselina u lipidima žumanjka zasićene masne kiseline (SFA) čine 30% - 35% , mononezasićene masne kiseline (MUFA) čine 40% - 45%, dok su najmanje zastupljene (20%-25%) polinezasićene masne kiseline (PUFA; Nimalaratne i Wu, 2015.). Jaja kokoši nesilica hranjenih standardnim krmnim smjesama sadrže viši udio n-6 PUFA i niži sadržaj n-3 PUFA masnih kiselina (Khan i sur., 2017.; Grčević i sur., 2011.) Sastav masnih kiselina u žumanjku jaja može se modificirati uporabom krmnih komponenti bogatih s n-3 PUFA u smjesama za nesilice, budući da kokoši lako apsorbiraju n-3 PUFA iz hrane i akumuliraju ih u žumanjku (Kralik i Lovreković, 2018.; Kralik i sur. 2022.). Primjenom različitih biljnih i animalnih ulja u krmnim smjesama mogu se proizvesti jaja boljeg nutritivnog sastava i povoljnijeg n-6/n-3 PUFA omjera u odnosu na konvencionalna jaja. Alagawany i sur. (2019.) navode kako ulje ima veliku kalorijsku vrijednost i predstavlja dobar izvor energije u hranidbi peradi. Prednosti korištenja ulja su višestruke: poboljšava se apsorpcija lipoproteina i vitamina topivih u mastima, povećava se okus krmiva i pospješuje iskoristivost utrošene energije. Izvori n-6 polinezasićenih masnih kiselina su sojino, palmino, suncokretovo i repičino ulje, dok su laneno i riblje ulje izvor n-3 polinezasićenih masnih kiselina. Laneno ulje glavni je izvor α -linolenske masne kiseline, a izvor EPA i DHA su riba i ulje morskih organizama od kojih se izdvajaju lososovo ulje, ulje sardine i ulje haringe. U Tablici 3. prikazan je sastav n-3 PUFA i n-6 PUFA u biljnim uljima i uljima morskih organizama koji su prehrambeni izvor PUFA. Linolna kiselina također se nalazi u sjemenkama grožđa, repice, maka, konoplje i badema te orašastim plodovima (brazilski orasi, orasi, pinjoli i lješnjaci). ALA je u relativno većoj količini sadržana u chia sjemenkama, sjemenkama lana, bosiljka i podlanka (*Camelina sativa*), također u kloroplastu zelenog lisnatog povrća (cvjetača, brokula, kelj i zelena salata) te sjemenkama i orašastim plodovima oraha, bukve, soje, repice, bundeve, crvenog i crnog ribiza. S druge strane arahidonska kiselina nalazi se u životinjskim proizvodima kao što su meso, mast i maslac (Mariamenatu i Abdu, 2021.).

Tablica 3. Sastav PUFA u prehrambenim biljnim i ribljim uljima i ulju mikroalgi (g/100 g ukupnih masnih kiselina) (Mariamenatu i Abdu, 2021.)

Prehrambeni izvor PUFA		n-3			n-6		
		ALA	EPA	DHA	LA	AA	DPA n-6
Biljna ulja*	Laneno ulje	53,37	-	-	14,33	-	-
	Uljana repica	9,15	-	-	18,65	-	-
	Sojino ulje	7,6	-	-	51,36	-	-
	Ulje pšeničnih klica	5,3	-	-	55,1	-	-
	Kukuruzno ulje	0,6	-	-	49,83	-	-
	Suncokretovo ulje	0,33	-	-	49,89	-	-
	Ulje šafranike	0,1	-	-	12,72	-	-
Riblje ulja	Ulje lososa	-	13,3	18,23	-	-	2,99
	Ulje sardine	-	10,15	10,66	-	-	1,97
	Ulje haringe	-	6,28	4,21	-	-	0,62
	Ulje menhadena	-	13,18	8,56	-	-	4,92
Ulje mikroalgi	Phaeodactylum tricornutum	-	36,5	23,6	-	-	-
	Chlorella minutissima	-	29	-	-	-	-
	Nannochloropsis oceanica	-	23,4	-	-	-	-
	Nannochloropsis salina	-	28	-	-	-	-
	Cryptocodinium cohnii	-	-	41	-	-	-
	Ceratium horridum	-	-	29,3	-	-	-

* pročišćeno ulje

U konvencionalnoj proizvodnji jaja zastupljenija je uporaba biljnih ulja u odnosu na animalna ulja pri čemu se najčešće koristi sojino, repičino, palmينو i laneno ulje, a kao izvori animalnih masnoća koriste se svinjska mast, mast peradi, loj i riblje ulje (Kerr i sur., 2015.; Gao i sur., 2021.). Različite vrste ulja imaju različite omjere zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, a biljna ulja općenito sadrže veći udio PUFA masnih kiselina u odnosu na animalna koja su bogatija sa SFA (Tablica 4.). Međutim, ulja morskih organizama sadrže više n-3 PUFA i povoljniji omjer n-6/n-3 PUFA u svom sastavu. Industrija stočne hrane u posljednjim je desetljećima usmjerena na povećanje koncentracija korisnih n-3 PUFA u hranidbi peradi kako bi se osigurala proizvodnja zdravih animalnih proizvoda (Palmquist, 2009.). Istovremeno se preporučuje optimizacija omjera n-6/n-3 PUFA u ljudskoj prehrani uz osiguranje zadovoljavajućeg unosa PUFA koji može povoljno djelovati na zdravlje ljudi (Simopoulos, 2002.; Palmquist, 2009.). Mnogi istraživači proučavali su utjecaj hranidbenih tretmana na povećanje sadržaja n-3 PUFA u jajima, koristeći u smjesama za nesilice različite izvore n-3 PUFA.

Yalcin i Unal (2010.) upotrijebili su u hranidbi nesilica 4,5% ribljeg ulja kao i kombinaciju lanenog sjemena i ribljeg ulja (10% + 1,5%). Nakon 30 dana hranidbe s navedenim tretmanima ustanovili su u lipidima žumanjaka ALA 4,10%, EPA 0,55% i DHA 3,91% tj. ukupno 9,72% Σ n-3 PUFA, a omjer n-6/n-3 PUFA bio je 2,28. Stupin i sur. (2020.) pri kombinaciji lanenog (3,5%) i ribljeg ulja (1,5%) u smjesama za nesilice obogatili su jaja s mg/100 g ALA 384,20, EPA 25,20, DHA 175,80, odnosno Σ n-3 PUFA 585,20 mg/100 g jaja.

Korištenje ribljeg ulja u smjesama za nesilice u koncentraciji 0,3%, 0,6%, 0,9%, 1,20%, 1,5% u kombinaciji sa sojinim uljem (do 5% ukupno), rezultiralo je povećanjem n-3 PUFA od 258,44 do 327,35 mg/100g jaja (Kralik i sur., 2021.). Kralik i sur. (2020.) navode da se upotreba mikroalge *Schizochytrium limacinum* u smjesama za nesilice kao alternativa ribljem ulju pokazala efikasnom. U pokusu je sudjelovalo 6 skupina nesilica kojima je u smjese dodavana različita količina mikroalge, odnosno ribljeg ulja. Prva dva hranidbena tretmana sadržala su 0,5% mikroalge (E1) i 0,5% ribljeg ulja (E2). Hranidbeni tretmani E3 i E4 sadržali su 1% mikroalge odnosno ribljeg ulja, dok su tretmani E5 i E6 sadržali 1,5% mikroalge, odnosno ribljeg ulja. Mikroalge su djelovale jednako ili bolje od ribljeg ulja u obogaćivanju jaja s n-3 PUFA. Uporaba 0,5% mikroalge odnosno ribljeg ulja u smjesama za nesilice polučila je sljedeći sadržaj ukupnih n-3 PUFA u jajima nesilica: E1= 321,07 mg odnosno E2=346,25 mg/100 g jestivog dijela jaja. Uporaba 1% mikroalge u smjesama za nesilice rezultiralo je s 361,40 mg ukupnih n-3 PUFA/100 g jaja, dok je ista količina ribljeg ulja u smjesama povećala sadržaj

ukupnih n-3 PUFA na 346,17 mg/100 g jaja. Udio mikroalgi od 1,5% u hrani za nesilice povećao je sadržaj ukupnih n-3 PUFA u jajima na 399,34 mg/100 g jaja, dok je sadržaj ukupnih n-3 PUFA u 100 g jaja kokoši koje su konzumirale smjesu s ribljim uljem iznosio 369,02 mg.

Tablica 4. Udio SFA i PUFA i omjer n-6: n-3 PUFA u različitim vrstama ulja (¹Amjad Khan i sur. (2017.); Bhardwaj i sur. (2016.), Harwood (2019.); preuzeto od Mariamenatu i Abdu (2021.)

Izvori masnoća	prehrambenih	SFA (%)	MUFA (%)	n-3 PUFA (%)	n-6 PUFA (%)	n-6/n-3 PUFA
Biljna ulja [*]	Laneno ulje ²	9	18	57	16	0,28/1
	Uljana repica ²	7	61	11	21	1,91/1
	Sojino ulje	15,6 ¹ ;15 ²	21,2 ¹ ;23 ²	7,3 ¹ ;8 ¹	51,5 ¹ ;54 ¹	7,05/1 ¹ ;6,75/1 ²
	Kukuruzno ulje	14,5 ¹ ;13 ²	29,9 ¹ ;29 ²	0,9 ¹ ;1 ²	50,4 ¹ ;57 ²	56/1 ¹ ;57/1 ²
	Suncokretovo ulje	12 ¹ ;12 ²	20,5 ¹ ;16 ²	0,10 ¹ ;1 ²	63,2 ¹ ;71 ²	63/1 ¹ ;71/1 ²
Riblje ulja	Ulje lososa ¹	19,9	17	35,3	1,06	0,03/1
	Ulje sardine ¹	30,4	14,5	28,1	2,2	0,078/1
	Ulje haringe ¹	21,3	56,6	11,9	12	1,01/1
Ulje mikroalgi	Phaeodactylum tricornutum ³	19	33	20 (ALA+EPA + DHA)	7 (LA+AA)	0,35/1
	Pavlova lutheri ³	20	28	29 (ALA+EPA + DHA)	1 (LA)	0,03/1
	Nannochloropsis gaditana ³	15	35	44 (ALA+EPA +DHA)	4 (AA)	0,09/1
	Ectocarpus siliculosus ³	-	16	43 (ALA+EPA)	16 (LA+AA)	0,37/1
	Fucus vesiculosus ³	21	28	15 (ALA+EPA)	25 (LA+AA)	1,66/1
	Chondrus crispus ³	34	15	23 (ALA+EPA)	19 (LA+AA)	0,82/1

* pročišćeno ulje

Meluzzi i sur. (2000.) istraživali su utjecaj izvora masnoće u hrani nesilica na sadržaj n-3 PUFA u jajima. Formirali su dvije skupine nesilica. Kontrolna skupina nesilica hranjena je smjesom u kojoj je korištena mast, dok je pokusna skupina nesilica konzumirala smjesu s dodatkom 3% ribljeg ulja. Hranidbeni period trajao je 4 tjedna. Autori navode da je došlo do značajnog ($P < 0,01$) povećanja sadržaja ukupnih n-3 PUFA u jajima nesilica pokusne skupine u odnosu na kontrolnu (192,58 mg odnosno 57,65 mg/jajetu). Osobito povećanje je zabilježeno u sadržaju ALA ($P = 13,32 \text{ mg/jajetu}$: $K = 10,16 \text{ mg/jajetu}$); EPA ($P = 19,53 \text{ mg/jajetu}$: $K = 0,74 \text{ mg/jajetu}$) i DHA ($P = 143,70 \text{ mg/jajetu}$: $K = 43,66 \text{ mg/jajetu}$). Također ističu da je kod ispitivanih tretmana zabilježeno smanjenja arahidonske masne kiseline kod jaja nesilica hranjenih smjesama s ribljim uljem u odnosu na jaja iz kontrolne skupine (25,54 mg odnosno 67,72 mg/jajetu).

Promila i sur. (2017.) upotrijebili su u hranidbi nesilica smjese koje su sadržavale 1%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5% i 4% lanenog ulja. Sadržaj ALA povećan je od 1,52% na 9,79% u ukupnim masnim kiselinama. Kralik i sur. (2008.) upotrijebili su u smjesama za nesilice u E1 tretmanu 3,5% ribljeg ulja + 1,5% repičinog ulja i u E2 tretmanu 1,5% ribljeg i 3,5% repičinog ulja, a K tretman poslužio je kao kontrola i sadržavao je sojino ulje. Ukupni n-3 PUFA bili su povećani kod E1 za 2,10 puta, a u E2 skupini jaja 1,41 puta nego u kontrolnoj skupini jaja. Povećanje sadržaja n-3 PUFA rezultiralo je smanjenjem sadržaja arahidonske kiseline. Autori su izvijestili da kokoši nesilice mogu sintetizirati EPA i DHA ukoliko hrana sadrži dovoljno ALA. Pri uporabi ribljeg ulja u hranidbi nesilica ALA se može povećati u jajima 4 do 8 puta, a Σ n-3 PUFA 2 do 6 puta (Zotte i sur., 2015.; Ehr i sur., 2017.; Kralik i sur. 2018.).

Utjecaj sastava ulja u hrani nesilica na deponiranje masnih kiselina u jajima objasnili su Ceylan i sur. (2011.). ALA je prevladavala u lipidima jaja pri hranidbi nesilica lanenim uljem, a DHA kod hranidbe nesilica ribljim uljem. Hudečková i sur. (2012.) i Aguilón-Páez i sur. (2020.) su zabilježili da se pri povećanju sadržaja n-3 PUFA smanjuje koncentracija n-6 PUFA. S ovim navodom suglasni su Hayat i sur. (2009.) i Lemahieu i sur. (2015.). Da dodatak ribljeg ulja u hranu nesilica utječe na obogaćivanje jaja s n-3 PUFA, naročito DHA potvrdila su istraživanja Lawlor i sur. (2010.) kao i Ceylan i sur. (2011.). Cachaldora i sur. (2006.) ustanovili su da se povećanjem udjela ribljeg ulja u hrani povećava sadržaj DHA, a smanjuje sadržaj AA u lipidima jaja što su također potvrdila istraživanja Kralik i sur. (2021.).

Mazalli i sur. (2004.) su ustanovili kompeticiju u metabolizmu n-3 PUFA i n-6 PUFA u enzimu Δ^6 desaturazi pri biosintezi masnih kiselina. Visoka razina ALA smanjuje sintezu AA iz LA što utječe na smanjeno njihovo odlaganje u lipide žumanjaka. Kralik i sur. (2021.) ustanovili su pozitivnu korelaciju između sadržaja EPA, DHA i Σ n-3 PUFA u hrani i njihovog deponiranja

u žumanjke. Linije regresije za sadržaje navedenih masnih kiselina definirane su sljedećim matematičkim izrazima: $y=61,7x + 238,81$ ($R^2 = 0,9787$), $y = 71,2x + 129,06$ ($R^2 = 0,9943$) i $y= 8,8433x + 6,545$ ($R^2 = 0,9045$).

Petrović i sur. (2012.) su istraživali dodatak lanenog ulja (1%, 2%, 3% i 4%) u hranu nesilica na sadržaj n-3 PUFA i omjer n-6 PUFA /n-3 PUFA u lipidima jaja. Autori su zaključili da se povećanjem lanenog ulja u hrani, povećava sadržaj ALA i DHA u lipidima žumanjaka i pri tome smanjuje n-6 PUFA/n-3 PUFA omjer od 6,38 do 3,96:1. Sadržaj ALA povećan je od 1,09% do 3,22%, a DHA od 1,25% do 1,72%. Istovremeno ustanovljeno je smanjenje sadržaja AA od 1,74% do 1,32% u ukupnim masnim kiselinama.

Ehr i sur. (2017.) navode kako korištenje lanenog ulja u hranidbi nesilica doprinosi dvostruko većem deponiranjem ukupnih n-3 PUFA ($P<0,01$) u žumanjku jaja u odnosu na ekvivalentni unos mljevenih sjemenki lana (0,5, 1, 2, 3 i 5%). Wang i sur. (2017.) su izvijestili da je obogaćivanje jaja s ALA mnogo lakše i ekonomičnije nego obogaćivanje s DHA, što su potvrdili Surai i Sparks (2001.). Hranom koja sadrži 3-4% ribljeg ulja obogaćuju se jaja s oko 180 - 250 mg/jaja, ali transfer efikasnosti iz hrane u jaja smanjuje se povećanjem udjela ribljeg ulja u hrani (Van Elswyck, 1997.). Međutim riblje ulje kao izvor DHA limitirano je u uporabi zbog pojave nepoželjnog mirisa jaja (Wang i sur., 2017.). Istraživanja su zbog toga usmjerena prema optimalnom doziranju ribljeg ulja u hranu za nesilice.

Coorey i sur. (2015.) su istraživali utjecaj dodatka ribljeg ulja, lanenog sjemena i chia sjemena u hranu nesilica na profil masnih kiselina i senzorna svojstva jaja. Sastav masnih kiselina u lipidima jaja ovisio je o hranidbenim tretmanima. EPA i DHA su detektirane samo u jajima nesilica koje su dobivale u smjesi riblje ulje ($P<0,05$). Međutim, Antruejo i sur. (2011.) su utvrdili pri uporabi lanenog i chia sjemena, u lipidima jaja n-3 PUFA, također EPA i DHA. Autori navode da je inkorporacija ALA i DHA u lipide žumanjka postepena i događa se kroz nekoliko tjedana (Van Elswyck, 1997.). Laca i sur. (2009.) upotrijebili su u hranidbi nesilica 2,5% lanenog (D1) i kombinaciju ribljeg + lanenog sjemena (1,5%+5% (D2) pri obogaćivanju jaja s n-3 PUFA. Rezultati istraživanja su pokazali da D1 jaja sadrže 0,32 mg/g, a D2 jaja 0,48 mg/g EPA. Sadržaj DHA bio je 3,62 mg/g žumanjka, odnosno 5,91 mg/g žumanjka. U komparaciji s kontrolnim jajima razlike su bile statistički značajne ($P<0,05$). Obogaćivanje jaja s EPA i DHA bilo je veće za 2 odnosno 3 puta kod eksperimentalnih u odnosu na kontrolnu skupinu.

Baucells i sur. (2000.) navode da dodatak linolne masne kiseline u hranu nesilica povećava sintezu i depoziciju dugolančanih masnih kiselina. Lešić i sur. (2015.) navode da na sastav masnih kiselina u jajima osim hrane utječe i dob nesilica te se pri istraživanju mora voditi računa i o tom čimbeniku. Petrović i sur. (2012.) ustanovili su kako omjer n-6/n-3 PUFA u lipidima žumanjka iznosi 12,1:1 ili više što je širi omjer od preporučenog od EFSA 3 do 5:1 (EFSA, 2010.).

Shahid i sur. (2020.) su pri hranidbi nesilica s lanenim uljem, ekstrudiranim lanenim brašnom i lanenim sjemenom ustanovili da hranidbeni tretmani imaju utjecaja na masu i proizvodnju jaja ($P<0,01$) kao i tjelesnu masu nesilica ($P=0,045$) te konzumaciju i konverziju hrane ($P<0,001$). Autori su također ustanovili utjecaj hranidbenih tretmana na Haugh jedinice (HJ).

2.5. Jaje - funkcionalna namirnica

Funkcionalni proizvodi su oni koji, osim osnovnih sastojaka, sadrže i tvari koje povoljno djeluju na zdravlje bez obzira jesu li prirodno dodani u hranu ili su dodani tijekom obrade. Koncept funkcionalne hrane nastao je sredinom 80-ih godina u Japanu, a razvojem funkcionalne hrane teži se dizajniranjem proizvoda koji su bogati bioaktivnim tvarima koje mogu pospješiti ljudsko zdravlje posebice u očuvanju zdravlja srca i smanjenju prekomjerne težine kao prepoznatim potrebama modernog čovjeka (Kralik i sur., 2010.).

Obogaćivanje prehrambenih proizvoda funkcionalnim sastojcima i konzumacija različitih dodataka prehrani u razvijenim zemljama učestalo se prakticira unazad tridesetak godina, a započelo je s rastom svjesnosti o utjecaju prehrane na zdravlje ljudi. Adams (1999.) definira funkcionalne sastojke ili nutrice kao molekule u hrani koji utječu na zdravlje, probavu i resorpciju nutrijenata.

PUFA se smatraju dijetalnim bioaktivnim tvarima koje doprinose prevenciji različitih bolesti i poboljšanju zdravlja ljudi (Keten, 2019.). Zdravstvene dobrobiti povezuju se s fiziološkim učincima EPA i DHA, a manje s ALA. Brojna istraživanja ukazuju kako EPA i DHA utječu na smanjenje rizika od nastanka kardiovaskularnih bolesti, neuroloških poremećaja i mentalnih bolesti, pomažu u prevenciji bolesti središnjeg živčanog sustava, dijabetes melitusa, pretilosti, ateroskleroze, pospješuju imunološku funkciju i smanjuju upale u organizmu (Vranešić Bender, 2011.; Fraeye i sur., 2012.; Patel i sur., 2022.). Ljudski i životinjski organizam ne može sintetizirati esencijalne PUFA stoga se one unose hranom. Unos n-3 PUFA u svakodnevnoj prehrani ljudi putem hrane ili funkcionalnih sastojaka je nedovoljan i ispod preporučenih razina. Pripisuje se djelomično nedostatnom konzumiranju ribe koja je izvor EPA i DHA (Candela i

sur., 2011.) kao i višoj cijeni tržišno dostupnih n-3 PUFA dodataka prehrani. Konzumacija nutritivno poboljšanih namirnica u zemljama sa srednjim i niskim dohotkom ima slabiju primjenu (Pinstrup-Andersen, 2013.).

Jaje je nutritivno bogata, a jeftina namirnica koja se konzumira u svim krajevima svijeta. Jaja se mogu obogatiti funkcionalnim sastojcima (nutricinima) među koje spadaju i n-3 masne kiseline. Dodatkom funkcionalnih sastojaka u hranu nesilicama putem njihovog metabolizma dodani sastojci ugrađuju se u jaja. Takva jaja mogu pridonijeti prehrambenom unosu n-3 PUFA kod svih stanovnika neovisno o kupovnoj moći. Profil masnih kiselina u žumanjcima jaja može se mijenjati pod utjecajem sastava obroka kojim se hrane nesilice. Kralik i sur. (2022.) navode kako se ovisno o izvoru i koncentraciji n-3 PUFA dodanoj u smjese nesilica ALA može povećati do 11,6 puta, EPA 3,6 puta, DHA 4,04 puta, a ukupne n-3 PUFA do 6,64 puta. Jaja obogaćena s n-3 PUFA koja se po svom nutritivnom sastavu razlikuju u odnosu na standardna konzumna u literaturi i tržištu navode se i kao „dizajnirana jaja“ te se kao takva smatraju funkcionalnim proizvodom.

U novije vrijeme funkcionalni proizvodi čija konzumacija može prevenirati različite bolesti ili poremećaje nazivaju se i nutraceuticima (Vishvakarma i sur., 2023.). Na europskom tržištu ne postoji zakonska regulativa koja egzaktno definira funkcionalne proizvode ili nutraceutike osim u području označavanja takvih proizvoda, odnosno iznošenja bilo koje nutritivne i zdravstvene tvrdnje. Posebni zahtjevi označavanja ovih proizvoda definirani su u okviru Uredbe (EZ) 1924/2006 (Díaz i sur., 2020.). Dodatno EU direktiva (No.116/2010.) definira zahtjeve u pogledu označavanja hrane sa n-3 PUFA na sljedeći način: hrana mora sadržavati najmanje 0,3 g ALA na 100 g i na 100 kcal, odnosno najmanje 40 mg EPA + DHA po 100 g i 100 kcal da bi se označavala kao "izvor n-3 PUFA". „Visoki izvor n-3 PUFA“ označava hranu koja sadrži najmanje 0,6 g ALA na 100 g i 100 kcal, odnosno najmanje 80 mg EPA + DHA na 100 g i 100 kcal (Miranda i sur., 2015., Kralik i sur., 2022.).

U jajetu težine 60 do 65 grama koncentracija ALA može se povećati od 400 do 600 mg/žumanjak. Metabolizam nesilica ima sposobnost preko procesa elongacije i desaturacije proizvesti EPA i DHA ako hrana za nesilice sadrži samo ALA. U tom slučaju mogu se obogatiti jaja za 90 do 115 miligrama s EPA i DHA. Za veće obogaćivanje jaja potrebno je koristiti riblje ulje ili morske alge.

Povećanjem n-3 PUFA smanjuje se omjer n-6/n-3 PUFA do preporučenih granica. Ako je navedeni omjer u standardnim jajima 7:1, u jajima obogaćenim s n-3 PUFA može se postići omjer 3,7:1 (Simopoulos, 2008.; Deckelbaum, 2010.).

2.6. Utjecaj hranidbe na proizvodne osobine nesilica i fizikalna svojstva jaja

Lipidi kao jedna od glavnih komponenti žumanjka jaja predstavljaju esencijalne nutrijente važne za rast i razvoj peradi i imaju važnu ulogu u ostvarenju proizvodnih osobina nesilica i kvaliteti proizvedenih jaja. Općenito se masnoće u obroke nesilica dodaju u količini manjoj od 10%. Tijekom razdoblja nesenja, količina mobilizacije i sinteze lipida u kokoši nesilica je u dinamičkoj ravnoteži, neovisno unose li se egzogeno iz hrane ili endogeno sintezom u jetri. Za formiranje jednog jajeta potrebno je 5-6 g lipida pri čemu količina koju nesilice dobivaju iz hrane iznosi približno 3 g dnevno (Gao i sur., 2021.). S ciljem osiguranja adekvatnog unosa masnih kiselina nužnih za proizvodnju visokokvalitetnih jaja i ostvarenje dobrih proizvodnih rezultata, u obroke nesilica dodaju se različite vrste ulja. U proizvodnji jaja veće dodane vrijednosti kao što su primjerice jaja obogaćena s n-3 PUFA primjenjuju se ulja bogata ovim masnim kiselinama kao što su laneno i riblje ulje. Utjecaj dodatka ovih vrsta ulja na proizvodne osobine i kvalitetu jaja opsežno je ispitivan u dosadašnjim istraživanjima.

Petrović i sur. (2012.) istraživali su proizvodne osobine nesilica i fizikalna svojstva jaja pri uporabi lanenog ulja u smjesama za nesilice (1%, 2%, 3%, 4%). Značajno višu nesivost ustanovili su kod skupine s 2% lanenog ulja u odnosu na ostale skupine nesilica ($P=0,014$). Najteža jaja od 62,5 g postignuta su kod prve skupine nesilica ($P<0,001$) u odnosu na ostale skupine. Autori nisu ustanovili povezanost između dodanog postotka lanenog ulja u hrani i nesivosti. Ovi rezultati suglasni su sa rezultatima istraživanja Basmacioglu i sur. (2003.) kao i Pardio i sur. (2005.). Konzumacija hrane se kretala od 123,2 g do 137,3 g/dan ($P>0,05$), a indeks oblika jaja 77,6% do 79,5% ($P<0,005$).

Kralik i sur. (2008.) kombinirali su riblje i repičino ulje u hranidbi nesilica. Nesilice skupine E1 dobivale su u hrani 3,5% ribljeg ulja + 1,5% repičinog ulja, a E2 skupina nesilica hranjena je sa 1,5% ribljim + 3,5% repičino ulje. Na kraju eksperimenta od 28 dana pokusne skupine nesilica bile su teže ($P<0,005$) od kontrolne skupine nesilica. U konzumaciji hrane nije bilo razlika između skupina nesilica ($P<0,005$), ali je intenzitet nesivosti bio niži kod E1 i E2 skupina u odnosu na kontrolnu skupinu nesilica. Celebi i Utlu (2006.) istaknuli su da dodatak ulja u hranu nesilica utječe na konzumaciju hrane, proizvodnju jaja i iskorištenje hrane ($P<0,005$). Grobas i sur. (2001.) su ustanovili da nesilice hranjene s lanenim uljem nesu teža jaja s boljom konverzijom hrane od kontrolne skupine što je u suprotnosti s nekim istraživanjima.

Aguillón-Páez i sur. (2020.) istraživali su utjecaj suncokretovog i lanenog sjemena u smjesama za nesilice na proizvodnju jaja. Autori su zaključili da nisu ustanovljene razlike u početnim i završnim težinama nesilica između tretmana kao niti u kvaliteti jaja (težina jaja i bjelanjaka,

Haugh jedinice kao i boja žumanjka; $P>0,05\%$). Međutim Jia i sur. (2008.) su izvijestili da laneno sjeme smanjuje proizvodnju jaja povećava konzumaciju i konverziju hrane pri dodatku 150g/kg smjese. Perić i sur. (2019.) navode da dodatak lanenog sjemena ili lanenog ulja nema negativnog utjecaja na proizvodnju i težinu jaja ($P>0,005$).

Ebeid (2011.) je u svom istraživanju koristio laneno i riblje ulje u hranidbi nesilica i nije ustanovio značajno različito djelovanje na konzumaciju hrane, proizvodnju jaja kao i težinu žumanjaka u odnosu na kontrolnu skupinu. Herkel i sur. (2014.) su ustanovili da laneno sjeme i ulje pozitivno djeluju na težinu jaja u odnosu na smjesu bez lanenog ulja ($P<0,005$), ali ne i na postotak nesivosti. Lee i sur. (2021.) ističu da dodavanje lanenog ulja (0%, 2%, 4%, 6% i 8%) u hranu ne utječe na konzumaciju hrane, težinu jaja, proizvodnju jaja ($P>0,005$). S ovim rezultatima slažu se i rezultati istraživanja Neijat i sur. (2006.) kao i Beheshti Moghadam i sur. (2020.). Irawan i sur. (2022.) upozoravaju da povećano dodavanje ALA ili n-3 PUFA u hranu nesilica može imati štetno djelovanje na performanse nesilica te je potrebno utvrditi limit uporabe. Elsayed i El-Afifi (2020.) su utvrdili da dodatak 3% lanenog ulja povećava proizvodnju jaja, težinu jaja, poboljšava iskorištenje hrane, ali smanjuje tjelesnu masu nesilica tijekom eksperimenta od 12 tjedana. Negativno djelovanje na prirast težine nesilica ustanovili su i Ayerza i Coates (2000.), a bolju konverziju hrane u jaja Ahmad i sur. (2013.) pri dodatku lanenog ulja u hranu nesilica.

Bertechini i Mazzucco (2013.) postavljaju pitanje što konzumenti smatraju kvalitetnim jajima? Autori definiraju kvalitetu kao set kvalitetnih svojstava (čista ljuska, pravilni oblik, veličina i težina, senzorska svojstva: miris i boja, nutritivna svojstva, sigurnost - odsustvo patogenih mikroorganizama, toksina, teških metala). Pod internom kvalitetom autori podrazumijevaju konzistenciju, odsustvo primjesa, Haugh jedinice >75 , veličinu komorice do < 2 mm, strukturiranu membranu, halaze, viskoznost bjelanjka i druge čimbenike bitne za preradu. Kvaliteta jaja ovisi o čimbenicima prije nesenja, kao i onim poslije (čuvanje, hlađenje i manipulacija jajima).

Laca i sur. (2009.) nisu ustanovili pri hranidbi nesilica s 2,5% lanenog ulja i kombinaciji 1,5% ribljeg ulja + 5% lanenog ulja, razlike u konzumaciji hrane niti konverziji hrane u jaja između tretmana ($P>0,05$). Utvrđene su statistički značajne razlike u debljine ljuske, težini žumanjaka, volumenu bjelanjaka ($P<0,005$) u korist eksperimentalnih skupina. Međutim, utvrđena su statistički ($P<0,005$) teža jaja, deblja ljuska i jači intenzitet boje žumanjka kod kontrolne u odnosu na eksperimentalne skupine ($P<0,05$). Tabidi (2011.) i Tayeb (2012.) su ustanovili da jaja tijekom čuvanja gube na masi, težini bjelanjka i žumanjaka i smanjuju se Haugh jedinice.

Autori zaključuju da su promijene koje vode opadanju kvalitete jaja ovisne o načinu i vremenu čuvanja. To su potvrdila i istraživanja Kralik i sur. (2015.) kao i Samli i sur. (2005.).

Jaja su kvarljivi proizvodi i gube na kvaliteti odmah nakon nesenja. Ovaj gubitak je još veći ako se nakon nesenja s njima pravilno ne postupa i ako se ne čuvaju na adekvatan način. Nakon nesenja jaja u bjelanjku i žumanjku se događaju različite fizikalno-kemijske promjene što dovodi do promjena u okusu i svježini jaja. Što je duži period čuvanja jaja, veći je gubitak unutarnje kvalitete (Oliveira i Oliveira, 2013.). Tijekom čuvanja jaja, vlaga i ugljični dioksid se prenose iz unutrašnjosti jajeta u okolinu, kroz pore ljuske jajeta, što povećava pH bjelanjka i on postaje manje viskozan (Hester, 2017.). Osim povećanja pH bjelanjka tijekom čuvanja jaja, dolazi i do gubitak mase. Ovaj pokazatelj smatra se važnim kriterijem za procjenu kvalitete-svježine jaja tijekom čuvanja. Pires i sur. (2020.) čuvali su jaja 6 tjedana na sobnoj temperaturi (20°C) utvrdili su visoku korelaciju ($r = 0,88$) između gubitka težine jaja i trajanja čuvanja jaja. Temperatura čuvanja mora se kontrolirati tijekom cijelog perioda čuvanja jaja (Jones i sur., 2018.). Guedes i sur. (2016.) pokazali su da su jaja čuvana u hladnjaku na 6,4°C 21 dan, imala sličnu kvalitetu s jajima čuvanim devet dana bez hlađenja na temperaturi od 28,1°C.

2.7. Senzorna svojstva jaja

Manipulacija različitim krmivima (masti i ulja) u hrani nesilica najčešći je način obogaćivanja jaja s n-3 PUFA (ALA, EPA, DHA). Neka istraživanja su pokazala da se pri većem odlaganju n-3 PUFA, u lipide žumanjaka može povećati intenzitet nepoželjnih senzorskih svojstava posebice „miris na ribu“ i miris užeglosti (Lawlor i sur., 2010.; Fraeye i sur., 2012.; Feng i sur. 2020.). Istraživanja su također pokazala da je kod nekih populacija ljudi taj miris prihvatljiv u određenom intenzitetu. Intenzitet senzorskih atributa kao što su „riblji miris“ i miris užeglosti povećani su sa većim sadržajem n-3 PUFA, osobito sadržajem DHA, u žumanjcima jaja (Gonzalez-Esquerra i Lesson, 2000.; Lawlor i sur., 2010.). Da bi se izbjegao „riblji“ miris u jajima autori preporučuju da smjese za nesilice ne bi trebale sadržavati više od 1% ribljeg ulja, odnosno 12% ribljeg brašna. Međutim, Yalcin (2017.) navodi da se dodavanje 1,5% ribljeg ulja u hranu za nesilice mogu postići zadovoljavajuća senzorna svojstva jaja.

Feng i sur. (2020.) su ustanovili da je učinkovitije umjesto ribljeg ulja upotrijebiti u hrani za nesilice mikroalge u cilju obogaćivanja jaja s DHA radi boljih senzornih svojstava. Petrović i sur. (2016.) su istraživali utjecaj lanenog ulja (1%-4%) u smjesama za nesilice na senzorne attribute jaja. Autori su zaključili da razlike u udjelu n-3 PUFA u jajima koje su ovisile o sadržaju lanenog ulja u hrani nesilica, nisu utjecale na promijene senzornih svojstava jaja. Ovi

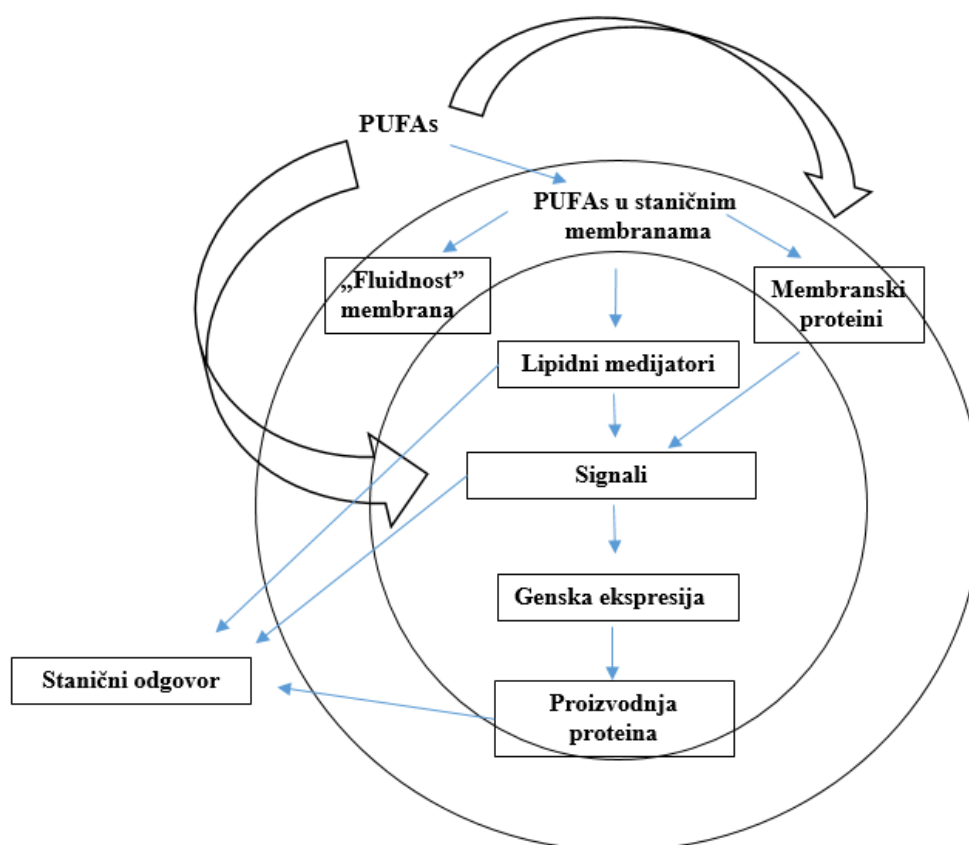
rezultati suglasni su rezultatima istraživanja Scheideler i sur. (1997.) kao i Mazalli (2004.). Proizvodi za koje se očekuje da zbog svog sastava imaju specifične pozitivne zdravstvene utjecaje trebaju biti prihvatljivi potrošačima (Friganović i sur., 2011.). Petrović i sur. (2016.) ističu da su takvi proizvodi zadovoljavajućih senzornih karakteristika kao što su: boja, okus, miris, tekstura i opća prihvatljivost. Coorey i sur. (2015.) su istraživali utjecaj lanenog sjemena, chai sjemena i ribljeg ulja na organoleptičke atribute jaja. Najbolja organoleptička svojstva imala su jaja porijeklom od nesilica koje su hranjene lanenim sjemenom u komparaciji sa jajima iz ostala dva hranidbena tretmana. Škrtić i sur. (2008.) istraživali su u kuhanim jajima miris, okus, prisustvo stranih tijela i opći utisak pomoću 7 panelista (skala ocjene 1 do 3). Jaja su potjecala od nesilica koje su hranjene s 5% sojinog ulja u hrani i E1 skupine s 2,5% ribljeg ulja + 2,5% lanenog ulja, te E2 skupine s 2,5% ribljeg ulja + 2,5% repičinog ulja). Panelisti su najbolje ocijenili organoleptičke atribute jaja kontrolne u odnosu na pokusne skupine ($P < 0,01$). Dodatkom ulja s višim sadržajem n-3 PUFA, odnosno EPA i DHA koje su podložne oksidaciji zbog više dvostrukih veza nego što ih sadrži ALA pogoršavaju se senzorska svojstva jaja (Fraeye i sur., 2012.). Oksidativni procesi u žumanjcima jaja posljedica su oksidacije lipida koji potiču iz hrane. Dodatkom 10% lanenog ulja u hranu nesilica, proizvedena jaja panelisti su ocijenili kao manje prihvatljiva od kontrolnih jaja zbog pojave „ribljeg mirisa“ (Caston i sur., 1994; Leeson i sur., 1998.). Laca i sur. (2009.) istraživali su senzorna svojstva jaja od nesilica koje su hranjene palminim uljem (kontrola), druga skupina (2,5% lanenog ulja) i treća skupina (kombinacija ribljeg ulja 1,5% i lanenog sjemena 5%). Ustanovili su nepoželjnu aromu i miris po ribi kao i žumanjke svjetlije boje kod druge i treće skupine jaja u odnosu na prvu skupinu. Povezanost nepovoljnih senzornih svojstava jaja i ribljeg ulja u hrani nesilica istakli su Schreiner i sur. (2004.) te Carrillo-Dominiguez i sur. (2005.) u prethodnim istraživanjima. Caston i sur. (1994.) ističu na pojavu blagog „off flavour“ u jajima ako se nesilice hrane lanenim sjemenkama, dok Ferrier i sur. (1994.) navode da 15 do 20% lanenog sjemena u hrani nesilica izaziva neugodan miris i okus po ribljem ulju što su potvrdili i Scheideler i sur. (1997.). Neki istraživači poput Cloughley i sur. (1997.) te Marshall i sur. (1994.) nisu ustanovili nepoželjna organoleptička svojstva kod n-3 PUFA jaja u odnosu na konvencionalna jaja.

Nepoželjni mirisi u jajima mogu se spriječiti ili smanjiti njihov intenzitet dodavanjem antioksidanata u hranu nesilica (Scheideler i sur. 1997., Singh i sur. 2010.). Sedoski i sur. (2012.) su pri korištenju algi, ribljeg, lanenog i repičinog ulja u proizvodnji jaja ustanovili temeljem ocjene panelista prihvatljivost svih ispitivanih skupina jaja za konzumaciju ($P > 0,005$). Parpinello i sur. (2006.) su ustanovili pri istraživanju utjecaja biljnih i ribljeg ulja

kao i algi da tip i količina izvora ulja u hrani nesilica mogu utjecati na pojavu „ribljeg mirisa“ kod kuhanih jaja. Kartikasari i sur. (2021.) su istraživali utjecaj 0,3%, 3% i 6% ALA u hranu nesilica na povećano odlaganje ALA u lipide žumanjaka uz ocjenu konzumne prihvatljivosti jaja. Upotrijebili su hedonistički test i polučili sljedeće ocjene prihvatljivosti: 6,4; 5,6 i 5,4, a za konvencionalna jaja prihvatljivost je iznosila 6,0 bodova. Iako je treća skupina jaja bolje ocijenjena, panelisti smatraju sve skupine jaja prihvatljivim za uporabu. Ova ocjena je u suglasnosti s rezultatima prethodnih istraživanja Hayat i sur. (2010.).

2.8. Benefit konzumacije n-3 polinezasićenih masnih kiselina kod ljudi

Esencijalne masne kiseline ugrađuju se u fosfolipide staničnih membrana s ulogom održavanja homeostaze membranskih proteina, fluidnosti membrana, regulacije staničnih signalnih procesa, stanične funkcije i genske ekspresije (Bentsen, 2017.; Venegas-Calderón i sur., 2010.; Kalish i sur., 2012.; Bazinet i Layé, 2014.).



Slika 6. Shematski prikaz utjecaja PUFA na stanične odgovore
(adaptirano prema Djuricic i Calder, 2021.)

Biološka funkcija polinezasićenih masnih kiselina uključuje proizvodnju oksigeniziranih spojeva iz obitelji oksilipina koji mogu nastati enzimskim ili neenzimskim reakcijama uz slobodne radikale kao katalizatore. Glavni enzimski putevi uključeni u proizvodnju oksilipina obuhvaćaju cikloksigenaze (COX), lipoksigenaze (LOX) i citokrom P450 oksidaze miješanih funkcija (CYP). Oksilipini izvedeni iz linolne kiseline i α -linolenska kiselina svrstavaju se u oktadekanoide, dok se derivati n-20 PUFA (ARA, DGLA i EPA) karakteriziraju kao eikozanoidi i uključuju prostaglandine, tromboksane i leukotriene. Dokozanoidi su izvedeni iz n-22 PUFA – adreninske kiseline (AdA, 22:4 n-6), dokosapentaenske kiseline (DPA, 22:5 n-3 ili 22:5 n-6) i dokosaheksaenska kiseline (DHA, 22:6 n-3). EPA se metabolizira uz COX i LOX enzime u seriju-3 prostaglandina (prostaglandin E3, prostaglandin I3 (prostaciklin I3) i tromboksane A3) i seriju 5-leukotriena (B5, C5 i D6) koji imaju izražen antiinflamatorni, vazodilatacijski i antiagregacijski učinak. Iz AA se uz iste enzime sintetiziraju prostaglandini serije-2 (prostaglandin E2, prostaglandin I2 (prostaciklin I2) i tromboksan A2) i leukotrieni serije-4: LTA4, LTB4, LTC4, LTD4 i LTE4 (Mariamenatu i Abdu, 2021.; Dyll i sur., 2022.). Eikozanoidi mogu djelovati kao vazodilatatori (npr. PGE2 i PGI2) ili vazokonstriktori (npr. TXA2 i cisteinil-LT) te na taj način utjecati na protok krvi i krvni tlak (Djuricic i Calder, 2021.). TXA2 potiče kontrakciju glatkih mišića, djeluje kao snažan aktivator trombocita uzrokujući njihovu agregaciju i stvaranje tromba. Općenito, oktadekanoide i eikozanoidi izvedeni iz n-6 PUFA imaju proupalno djelovanje (Vranešić Bender, 2011.).

AA i EPA se u organizmu sintetiziraju u podjednakim razinama kada su prekursori obje masne kiseline u podjednakim koncentracijama te je izražena kompeticija u sintezi eikozanoida izvedenih iz ovih masnih kiselina budući da se natječu za iste setove enzima (Simopoulos, 2010.).

Omjer n-6/n-3 PUFA u prehrani određuje razinu proizvodnje proupalnih ili protuupalnih lipidnih medijatora (Mariamenatu i Abdu, 2021.). U posljednja dva desetljeća otkrivena je nova obitelj lipidnih medijatora važnih u regulaciji upale zajedničkog naziva specijalizirani pro-razlučujući medijatori (SPM). U lipidne se medijatore ubrajaju rezolvini, protektin i marezin koji su izvedeni iz n-3 polinezasićenih masnih kiselina. EPA je derivat E oblika rezolvina (RvE), dok se D oblik rezolvina (RvD) biosintetizira iz DHA zajedno sa protektinima i marezinima (Zárate i sur., 2017.). Lipidni medijatori sudjeluju u rezoluciji upale kao visoko reguliranom, aktivnom i složenom procesu koji prekida upalni odgovor (Serhan i sur., 2014.; Duvall i Levy, 2016.). Mehanizam djelovanja rezolvina ogleda se u blokiranju proizvodnje proinflammatory medijatora i regulaciji prometa leukocita (Serhan i sur., 2022.; Ohira i sur.,

2010.; Jones i sur. 2012.; Liu i sur., 2022.). Protektini se stvaraju u živčanom tkivu i imaju neuroprotektivno djelovanje u mozgu, retini i središnjem živčanom sustavu.

Fiziološka važnost dokosaheksaenska masne kiseline vezana je za funkciju središnjeg živčanog sustava budući da se DHA obilno akumulira u ovom tkivu kao i u staničnim membranama mrežnice i reproduktivnom tkivu. Fosfolipidi fotoreceptorskih stanica dostižu koncentracije DHA veće od 50% te se nedostatak DHA povezuje s pogoršanim vidom i smanjenom aktivnosti rodopsina (Senapati, 2018.; Brenna, 2016.). Također je intenzivno istraživana utjecaj DHA na neonatalni razvoj djece i dojenčadi pri čemu se adekvatan DHA status povezuje s normalnim rastom i razvojem mozga (Van Dael, 2021.).

Niska incidijencija kardiovaskularnih bolesti uočena je kod Eskima. Njihova prehrana sastojala se uglavnom od ribe i ribljeg ulja što su znanstvenici doveli u vezu s konzumiranjem n-3 PUFA i njihovim povoljnim djelovanjem na zdravlje (Das, 2000.). Ove polinezasićene masne kiseline zbog opisanih fizioloških funkcija preveniraju pojavu ateroskleroze, dijabetesa, neuroloških bolesti, centralnog nervnog sustava, pojavu raka i pospješuju imunosti sustav (Trikalinos i sur., 2012.; Stark i sur., 2016., De Carvalho i Caramujo, 2012.).

Prehrana ljudi mijenjala se tijekom stoljeća. U prošlosti, ljudi su svakodnevno konzumirali znatno veće količine n-3 PUFA u odnosu na n-6 PUFA. Promjene u prehranbenim navikama ljudi dovele su i do disbalansa omjera $\sum$ n-6 PUFA/ $\sum$ n-3 PUFA u odnosu na početni omjeru 1:1 u prošlosti (Simopoulos, 2008.). Danas se način prehrane sastoji u visokom udjelu zasićenih masnih (SFA < 10%) i n-6 PUFA s visokim udjelom, a niskim udjelom n-3 PUFA što utječe na nepovoljan široki omjer 20 do 30:1 (Russo, 2009.). Prema istraživanjima Škrtić i sur. (2007.) navedeni omjer u lipidima konvencionalnih jaja kreće se 32,61:1, a Lešić i sur. (2015.) navode još širi omjer, 65:1.

Korištenjem n-3 PUFA jaja u prehrani smanjuje se rizik od kardiovaskularnih bolesti, inhibira rast malignih stanica u prostati, odlaže gubitak imunoloških funkcija i regulira normalni rad mozga i organa vida (Lewis i sur., 2000.). Prehrana koja uključuje funkcionalne proizvode kao što su n-3 PUFA jaja štiti organizam od metaboličkih anomalija (Khan i sur., 2017.). Metabolički sindrom čine čimbenici kao što su debljina, intolerantnost na glukozu i inzulin te dislipidemija. Beltrán-Sánchez i sur. (2013.) procijenili su da od ovog sindroma obolijeva 20 do 25% populacije u svijetu. Yashodhara i sur. (2009.) preporučuju konzumaciju jaja obogaćenih s n-3 PUFA kako bi se smanjio rizik pojave metaboličkog sindroma. Fosfolipidi iz jaja sadrže n-3 PUFA, smanjuju resorpciju lipida, utječu na CRP i $\alpha/4$ faktor u plazmi (Blesso, 2015.; Campos i sur., 2016.).

Nadalje, nezdravi način života uključujući i prehranu, povećava rizik od dijabetesa, hipertenzije, kao i kardiovaskularnih bolesti (Fuller i sur., 2015.). Shakoore i sur. (2020.) su ustanovili da konzumacija omega-3 jaja smanjuje ukupni kolesterol za 16,57 mg/dcl ($P < 0,001$), trigliceride za 17,48 mg/dcl, a povećava koncentraciju HDL kolesterola za 0,48 μ g/dl ($P < 0,001$) u komparaciji s prehranom bez jaja. Autori su zaključili da konzumacija 3 jaja dnevno djeluje pozitivno na profil lipida u serumu i krvni tlak kod pacijenata s metaboličkim sindromom u komparaciji s konzumnim jajima konvencionalnog sastava. Eksperimentalno je utvrđeno da je bitan omjer $\sum n-6$ PUFA/ $\sum n-3$ PUFA, kao i omjer LA:ALA u prehrani ljudi (Candela i sur., 2011.; Simopoulos, 2010.).

Dnevne potrebe u unosu n-3 PUFA razlikuju se između pojedinih zemalja, odnosno organizacija što se preispituje pomoću kliničkih ispitivanja. World Health Organization (WHO) preporučuje 0,3 - 0,5 g dnevno EPA + DHA, a ISSFAL (International Scientific Society for the Fatty Acids and Lipids) preporučuju za EPA+DHA 500 mg dnevno. NATO (North Atlantic Treaty Organisation) preporuča 800 mg dnevne konzumacije EPA + DHA, a American Heart Association (AHA) preporuča 1 g EPA + DHA dnevno i konzumiranje ribe 2 puta tjedno kod bolesnika s koronarnom bolešću. Preporuke EFSA (European Food Safety Authority) odnose se na konzumaciju 2 do 4 g EPA + DHA u cilju smanjenja triglicerida i visokog krvnog tlaka (Bagga i sur., 2002.; Kralik i sur., 2022.). Osim navedenog, EFSA daje preporuku za dnevni unos DHA kod dojenčadi 100 mg, a za trudnice i dojilje 200 mg.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

Cilj istraživanja

Cilj istraživanja uključuje više aktivnosti koje se odnose na sljedeće.

- Proizvesti jaja obogaćena s n-3 polinezasićenim masnim kiselinama: α -linolenskom (ALA), eikosapentaenskom (EPA) i dokosaheksaenskom (DHA)
- Modulirati hranidbene tretmane za nesilice uz izbor tretmana koji osigurava najefikasnije odlaganje n-3 polinezasićenih masnih kiselina u lipide žumanjaka
- Osigurati optimalni omjer n-6 PUFA/n-3 PUFA u obogaćenim jajima
- Istražiti fizikalno-kemijska svojstva n-3 PUFA obogaćenih jaja u komparaciji s konvencionalnim jajima
- Istražiti oksidativne procese u lipidima žumanjaka n-3 PUFA obogaćenih i konvencionalnih jaja
- Istražiti senzorna svojstva n-3 PUFA obogaćenih i konvencionalnih jaja
- Istražiti utjecaj konzumacije n-3 PUFA jaja na biomedicinske pokazatelje krvožilnog sustava i sadržaj n-3 PUFA u plazmi
- Primijeniti metode istraživanja koje osiguravaju znanstveno tumačenje i zaključivanje rezultata istraživanja

Hipoteza

Intenzivna su ispitivanja mogućnost konzumacije konzumnih jaja s povećanim sadržajem n-3 PUFA na ljudsko zdravlje.

Budući da ljudski organizam ne može sintetizirati esencijelne n-3 masne kiseline one se moraju unositi hranom. Važno je stoga osigurati dostupne i prihvatljive namirnice iz kojih je bioiskoristivost n-3 masnih kiselina jednaka i/ili veća u odnosu na postojeće dodatke prehrani koji su dostupni na tržištu.

Pretpostavka je da će se istraživanjem proizvesti jaja obogaćena n-3 masnim kiselinama u količini koja će predstavljati značajan doprinos unosu n-3 PUFA kod ljudi, bez negativnih utjecaja na fizikalno-kemijska i senzorna svojstva kvalitete jaja. Također se očekuje istovremeno pozitivan učinak konzumacije n-3 PUFA jaja na biokemijske pokazatelje u krvi konzumenata.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Smještaj i hranidba nesilica

Postupci s nesilicama u pokusu kao i analize jaja provedeni su prema protokolima odobrenim od Bioetičkog povjerenstva za istraživanja na životinjama Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Za istraživanje je upotrijebljeno 480 nesilica TETRA SL hibrida, koje su podijeljene u tri skupine. Nesilice kontrolne skupine konzumirale su hranu s 5% sojinog ulja, P1 skupina nesilica konzumiralo je hranu s kombinacijom 1,5% ribljeg ulja i 3,5% lanenog ulja, te P2 skupina nesilica dobivala je hranu s 2% ribljeg i 3% lanenog ulja (Tablica 5.).

Tablica 5. Plan hranidbenih tretmana u pokusu (%)

Pokusne skupine	Sojino ulje	Riblje nerafinirano ulje	Laneno ulje
K	5,00	-	-
P1	-	1,50	3,50
P2	-	2,00	3,00

Svaka skupina sadržavala je po 160 nesilica podijeljenih u 16 ponavljanja. Pokusno razdoblje trajalo je 30 dana (od 27.3.2019. do 26.4.2019.). Prvih 2 dana bilo je razdoblje prilagodbe nesilice (navikavanje jata na uvjete držanja), a pokusno razdoblje hranidbe nesilica trajalo je 28 dana. Nakon 21. dana hranidbe uzorkovana su jaja za analizu kvalitete, profil masnih kiselina. Preostalih 7 dana skupljana su jaja za potrebe ispitivanja s volonterima. Nesilice su hranu i vodu konzumirale *ad libitum*. Sastav krmnih smjesa korištenih u pokusu prikazan je u Tablici 6.

Tablica 6. Sastav krmnih smjesa za nesilice (%)

Sastojak	Kontrola	P1	P2
Kukuruz	48,86	48,86	48,86
Sojina sačma	20,67	20,67	20,67
Tostirana soja	4,00	4,00	4,00
Suncokretova sačma	5,00	5,00	5,00
Lucerka	1,50	1,50	1,50
Kalcij zrnca	10,67	10,67	10,67
Mono kalcijev fosfat	1,33	1,33	1,33
Kvasac	0,50	0,50	0,50
Sol	0,33	0,33	0,33
Zakiseljivač	0,33	0,33	0,33
Nanofeed	0,33	0,33	0,33
Metionin	0,15	0,15	0,15
Premix*	1,33	1,33	1,33
Sojino ulje	5,00	-	-
Riblje ulje	-	1,50	2,00
Laneno ulje	-	3,50	3,00
Ukupno	100,00	100,00	100,00

*Premix jedan kg sadrži: Vit. A 840.000 IJ; Vit. D₃ 210.000 IJ; Vit. E 8.350 mg; Vit. K₃ 168 mg; Vit. B₁ 150 mg; Vit B₂ 374 mg; Vit. B₆ 200 mg; Vit. B₁₂ 918 mg; Vit. C 1.860 mg; Niacin 2.100 mg; Pantotenska kiselina 584 mg; Folna kiselina 75 mg; Biotin 7 mg; Kolin klorid 33.600 mg; Željezo 2.520 mg; Jod 76 mg; Bakar 425 mg; Mangan 5.640 mg; Cink 175 mg; Selen 32 mg; Canthaxanthin 260 mg.

Nesilice su bile su smještene u kavezima, a po jednoj nesilici bilo je osigurano 750 cm² površine kaveza od čega je 600 cm² bilo korisne površine. Kavezi s nesilicama smješteni su u istom peradnjaku gdje su bili isti mikroklimatski uvjeti. Režim osvjetljenja bio je 16 sati svjetla i 8 sati mraka.



Slika 7. Nesilice u kavezima za vrijeme pokusa (Z. Kralik 2019.)

Smjese za nesilice koje su se koristile u pokusu bile su izbalansirane na bazi 17,00% sirovog proteina i 12,10 MJ/kg ME. Kemijski sastav smjesa prikazan je u Tablici 7.

Tablica 7. Kemijski sastav smjesa korištenih u pokusu (%)

Parametar	K	P1	P2
Vlaga	9,8	9,5	9,7
Sirovi protein	17,23	17,31	17,07
Sirova mast	7,7	7,7	7,7
Sirova vlaknina	4,9	4,7	4,8
Sirovi pepeo	11,88	11,67	11,18

Vlaga-HRN ISO 6496:2001; Sirovi protein-ISO 1871:2009; Sirova mast- HRN ISO 6492:2001, Sirova vlaknina-RU-013-06; Mod. HRN EN ISO 6865:2001 i Sirovi pepeo- HRN ISO 5984:2004/Ispr. 1:2016

4.2. Vanjska i unutarnja kvaliteta jaja

Ukupno je za potrebe analize vanjske i unutarnje kvalitete korišteno 270 jaja (90 po skupini). Sve analize napravljene su na svježim jajima te jajima čuvanim 14 i 28 dana u hladnjaku na +4°C. Kvaliteta jaja određena je mjerenjem sljedećih pokazatelja: masa jaja i masa osnovnih dijelova u jajetu, udjeli osnovnih dijelova u jajetu, dužina i širina jaja, indeks oblika, čvrstoća i debljina ljuske, visina bjelanjka, Hough jedinice (HJ), boja žumanjka, pH bjelanjka i pH žumanjka.

Dužina i širina jaja mjerena je pomoću pomične mjerke s rasponom mjerenja 0-30 mm/0-12" (Insize, USA).

Indeks oblika izračunat je iz mjera širine i dužine jaja koristeći sljedeću formulu: indeks oblika (%) = širina jaja/dužina jaja*100.

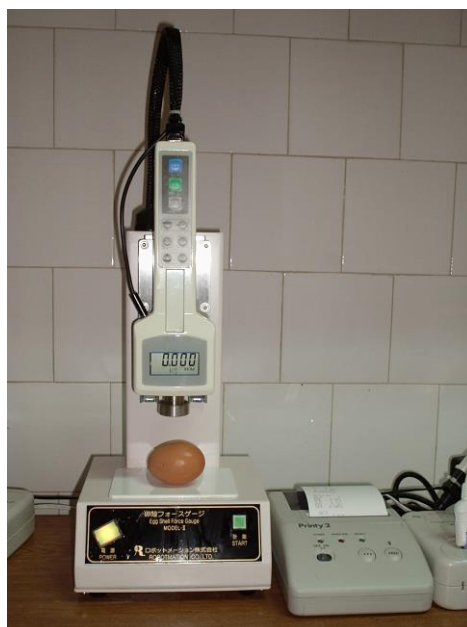
Masa osnovnih dijelova jaja (bjelanjak, žumanjak i ljuska) utvrđena je pomoću vage PB 1502-S (Mettler Toledo, BBK 422-6 DXS), a računskim putem dobivene su vrijednosti udjela osnovnih dijelova jaja (%).

Automatskim uređajem Egg Multi-Tester EMT-5200 (Robotmation Co., Ltd., Tokyo, Japan) izmjerena je masa jaja (g), visina bjelanjka (mm), HJ i boja žumanjka (Slika 8.).

Čvrstoća ljuske jaja (kg/cm^2) određena je uređajem Egg shell Force Gauge Model-II (Robotmation Co., Ltd., Japan)



Slika 8. Egg Multi-Tester uređaj za analizu unutarnje kvalitete jaja (Z. Kralik, 2019.)



*Slika 9. Eggshell Force Gauge Model – II uređaj za mjerenje čvrstoće ljuske jaja
(Z. Kralik, 2019.)*

Elektronskim mikrometrom s točnošću od 0,001 mm na sredini ljuske jaja određena je debljina (Insize, USA), a vrijednosti pH bjelanjka i žumanjka, izmjerene su pH metrom MP 120 (Mettler Toledo, model SevenEasy).

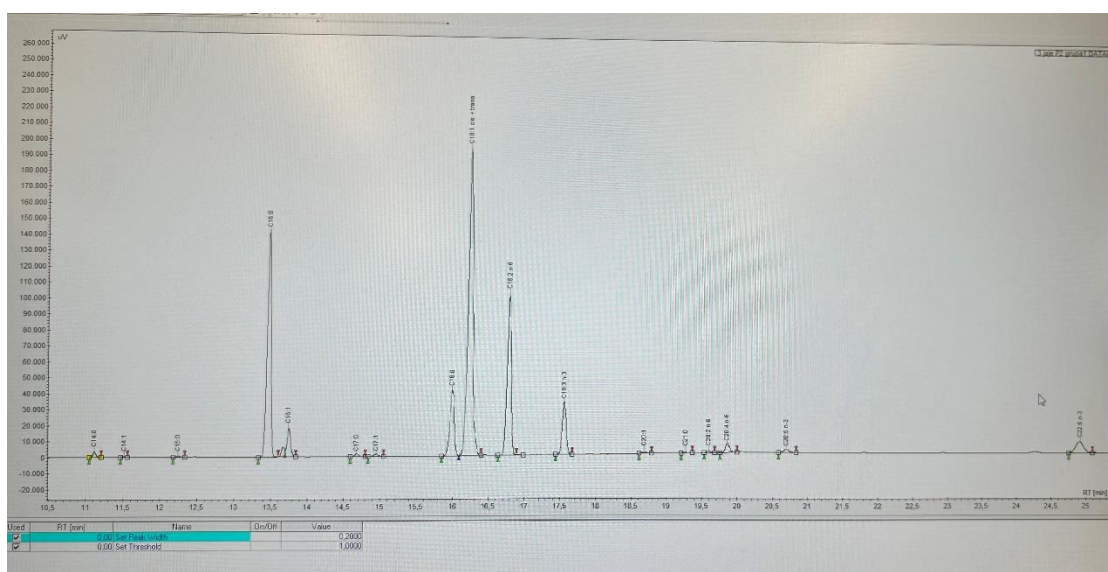


*Slika 10. Mjerenje debljine ljuske jaja uporabom elektronskog mikrometra Insize, USA
(Z. Kralik, 2019.)*

4.3. Profil masnih kiselina u smjesama za nesilice i u žumanjcima jaja

Za analizu je uzorkovano 30 jaja i 3 uzorka smjese za nesilice. Profil masnih kiselina analiziran je na 30 žumanjaka, 10 po skupini. Uzorci smjese analizirani su u tri paralelna uzorka.

Standardna metoda pripreme uzoraka za određivanje profila masnih kiselina podrazumijeva ekstrakciju masti iz uzorka te hidrolizu i esterifikaciju masnih kiselina. Masne kiseline određene su prema metodi Csapó i sur. (1986.). Postupak pripreme uzorka u standardnoj metodi je sljedeći: uzorku izvaganom u tikvicu (3 g) dodaje se 8 ml koncentrirane kloridne kiseline (HCl) i uzorak se zagrijava 60 minuta na vodenoj kupelji. Nakon hlađenja uzorku se dodaje 7 ml etanola, zatim 25 ml dietiletera i uzorak se miješa jednu minutu. Zatim se dodaje 25 ml petroletera i uzorak se ponovno miješa jednu minutu. Nakon odvajanja faza uzima se gornji (organski) sloj koji se upari pomoću rotacijskog uparivača. Nakon uparavanja u tikvicu se dodaje 4 ml metanolne otopine natrijeve lužine (0,5 M NaOH), tikvica se spoji na povratno hladilo i uzorak se zagrijava na vodenoj kupelji do nestanka masnih kapljica. Zatim se dodaje 4 ml metanolne otopine borovog trifluorida (14% BF₃) te se uzorak dalje zagrijava tri minute. Nakon toga u tikvicu se dodaje 4 ml n-heksana, uzorak se zagrijava jednu minutu i hladi. Nakon hlađenja uzorka u tikvicu se dodaje zasićena otopina natrijevog klorida (NaCl). Nakon razdvajanja faza uzima se gornji organski sloj i osuši s bezvodnim natrijevim sulfatom (Na₂SO₄). Tako pripremljen uzorak prebaci se u vijalicu i čuva u zamrzivaču do analize.



Slika 11. Izgled kromatograma analize jednog uzorka (Z.Kralik, 2023.)

Profil masnih kiselina utvrđen je korištenjem plinskog kromatografa SCION 436-GC (SCION Instruments), opremljenog kapilarnom kolonom tipa FAMEWAX (RESTEK, Bellefonte, USA) (unutarnji promjer 30 x 0,32 mm, film 0,25 µm) i plamenim detektorom. Volumen uzorka za injektiranje bio je 1 µL, a radni uvjeti sljedeći: temperatura injektora: 230 °C, temperatura detektora 230 °C, protok plina nosioca (vodik) 2.5 mL/min. Temperaturni program pećnice programiran je na sljedeći način: od 50 do 160 °C: 20 °C/min, od 160 do 225 °C: 10 °C/min uz zadržavanje na 225 °C devet minuta. Ukupno trajanje analize je 21 minutu. Za identifikaciju pojedinačnih masnih kiselina u kromatogramu korištena je standardna smjesa 37 masnih kiselina (Food Industry FAME Mix, Restek Corporation, Bellefonte, PA, SAD). Udjeli pojedinačnih masnih kiselina prikazani su kao postotak ukupnih masnih kiselina u lipidima žumanjaka. Nakon očitavanja kromatograma (Slika 11.) izračunava se udio pojedinih masnih kiselina u ukupnim mastima žumanjka iz omjera površine relevantnog pika prema ukupnoj površini pikova svih masnih kiselina.

4.3.1. Aterogeni, trombogeni i hipo/hiperkolesterolemični indeksi

Na osnovu rezultata analize masnih kiselina u lipidima žumanjaka izračunati su indeksi koji su značajni sa zdravstvenog stajališta (indeksi zdravlja jaja; eng. „egg health indexes“):

- aterogeni indeks (AI),
- trombogeni indeks (TI) i
- hipo/hiperkolesterolemični indeks (HHI).

AI i TI indeksi su izračunati prema Omri i sur. (2019.), dok je HHI izračunat prema Fernández i sur. (2007.) primjenom sljedećih formula:

$$AI = (4 \times C14:0 + C16:0 + C18:0) / (\sum MUFA + \sum n-6 PUFA + \sum n-3 PUFA)$$

$$TI = (C14:0 + C16:0 + C18:0) / 0,5 \times \sum MUFA + 0,5 \times \sum n-6 PUFA + 3 \times \sum n-3 PUFA + (\sum n-3 PUFA / \sum n-6 PUFA)$$

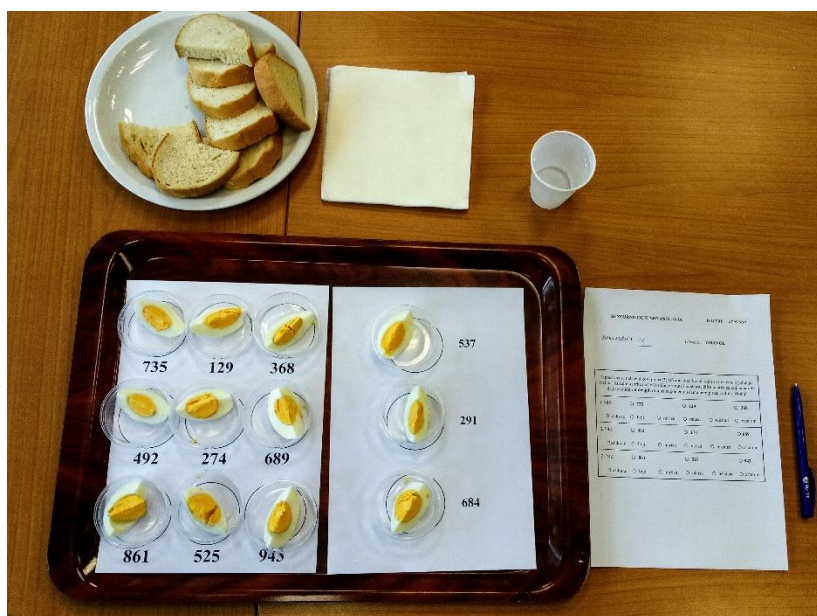
$$HHI = (C18:1 n-9 + C18:2 n-6 + C20:4 n-6 + C18:3 n-3 + C20:5 n-3 + C22:5 n-3 + C22:6 n-3) / (C14:0 + C16:0)$$

gdje znači MUFA= mononezasićene masne kiseline, PUFA= polinezasićene masne kiseline.

Masna kiselina CC22:5 n-3 nije detektirana u K, P1 i P2, a C20:5 n-3 nije detektirana u K skupini jaja.

4.4. Senzorna analiza jaja

Senzorna analiza jaja provedena je upotrebom trianl testa i hedonističkog testa dopadljivosti. U postupku senzorne analize sudjelovalo je 28 ocjenjivača u prvoj sesiji i 24 ocjenjivača u drugoj sesiji. U istraživanju je sudjelovalo 70 % ocjenjivača koji su završili edukaciju iz senzorne analize s prethodnim dugogodišnjim iskustvom, dok je 30 % ocjenjivača prethodno sudjelovalo u sličnim analizama, ali nisu bili formalno educirani. Razlog takvom izboru ocjenjivača je uključivanje dijela ocjenjivača koji se ponašaju kao potrošači radi reprezentativnije analize. Svi ocjenjivači su prije ocjenjivanja bili upućeni u pravila i procedure testova. Priprema uzoraka sastojala se polaganja jaja u hladnu vodu, zagrijavanja vode do vrenja i zadržavanja tijekom 10 minuta. Jaja su nakon kuhanja stavljena u hladnu vodu tijekom 5 minuta, očišćena od ljuske i čuvana na temperaturi 40-60 °C do konzumacije. Neposredno pred konzumaciju jaja su razrezana uzdužno na četvrtine, a jedna četvrtina je predstavljala uzorak za kušanje koji su bili servirani ocjenjivačima. Pri provedbi trianl testa svakom ocjenjivaču su bila ponuđena tri seta po tri kodirana uzorka s troznamenkastom šifrom. Unutar svakog seta su dva uzorka bila ista, a jedan različit (Slika 12.).



Slika 12. Pripremljeni uzorci za senzornu analizu (I.Kos, 2019.)

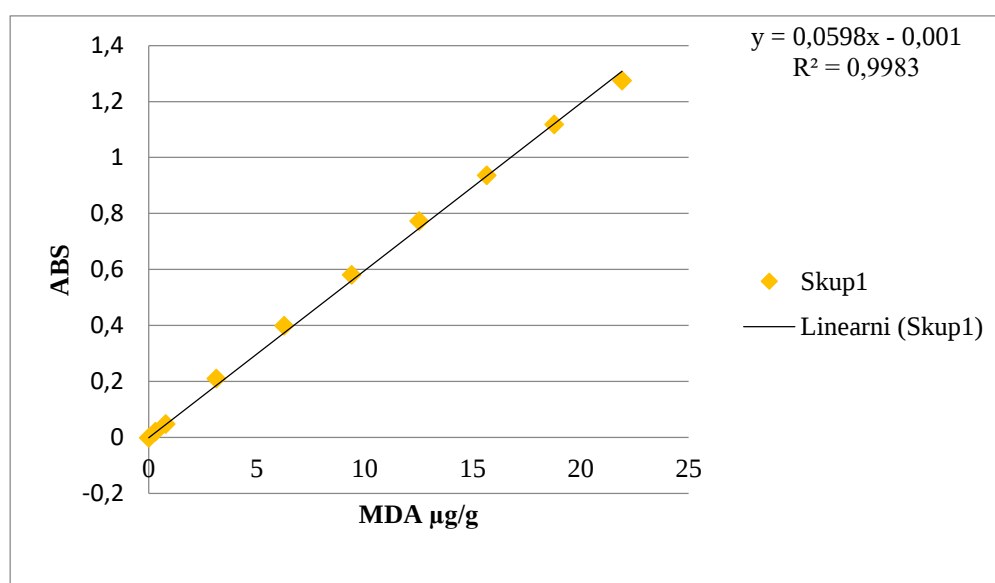
Ocjenjivači su potom bili upitani da izaberu koji je uzorak različit i da označe u čemu percipiraju razliku (u boji, mirisu, okusu, teksturi ili ostalome). Redoslijed uzoraka unutar seta određen je kao potpuno slučajni dizajn, a mogući redosljedi bili su: ABA, AAB, BAA, BAB, BBA, ABB. Ocjenjivači su zamoljeni da nakon uzimanja svakog pojedinačnog seta

konzumiraju kruh i vodu radi neutralizacije usta i odmora osjetila. U testu su ponuđena tri seta koji su predstavljali sve parove tretmana u istraživanju; K:P-1, K:P-2, P-1:P-2. Redoslijed setova u triangl testu bio je određen potpuno slučajno.

U provedbi hedonističkog testa dopadljivosti ocjenjivačima su bila ponuđena tri uzorka kodirana troznamenkastom šifrom, a svaki uzorak je predstavljao jedan tretman. Ocjenjivači su iskazali dopadljivost boje, dopadljivost mirisa i dopadljivost okusa na hedonističkoj skali od 1 (uopće mi se ne sviđa) do 9 (u potpunosti mi se sviđa). Ocjenjivači su zamoljeni da nakon uzimanja svakog pojedinačnog uzorka konzumiraju kruh i vodu radi neutralizacije usta i odmora osjetila. Redoslijed uzorka je određen kao potpuno slučajni dizajn, a mogući redoslijedi uzoraka bili su: ABC, ACB, BAC, BCA, CAB i CBA.

4.5. Određivanje oksidacije lipida u žumanjcima

Za potrebe određivanja oksidacije lipida u žumanjcima jaja iz svake je skupine nasumično prikupljeno po 30 jaja (ukupno 90). Oksidacija lipida u žumanjku određena je na svježim jajima te jajima čuvanim 14 i 28 dana u hladnjaku na 4°C (n=10 po skupini). Priprema uzorka za analizu oksidacije masti obavljena je na sljedeći način: 4 g žumanjka odvagano je u epruvetu i dodano je 12 ml 10%-tna trikloroctena kiselina, smjesa je homogenizirana i centrifugirana 15 minuta na 5500 x g na 4°C.



Grafikon 3. Standardna krivulja za izračun oksidacije lipida u žumanjcima jaja

Nakon centrifugiranja otpipetirano je 2,5 ml supernatanta kojemu je dodano 1 ml otopine tiobarbiturne kiseline (pH 2,5). Epruvete se zatvore i urone u vodenu kupelj na 95°C 30 minuta. Nakon hlađenja dodano je 1,5 ml destilirane vode i smjesa je centrifugirana 15 minuta na 5500 x g na 4°C. Sadržaj obojenog produkta koji nastaje reakcijom produkata lipidne peroksidacije s tiobarbiturnom kiselinom izmjeren je spektrofotometrijski na 532 nm (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, USA). Dobivene vrijednosti uspoređene su sa standardnom krivuljom (Grafikon 3.) priređenom pomoću standarda malondialdehid tetrabutilamonijeve soli (Sigma-Aldrich, Švicarska), a iskazane u µg MDA/g žumanjka.

4.6. Odabir ispitanika, analiza krvnih pokazatelja

Nakon obrade jaja od strane senzornih panelista, te uvida u rezultate, odabrane su dvije skupine nesilica (K i P1) koje su nastavile s proizvodnjom jaja te su jaja iz tih skupina korištena u daljnjem istraživanju provedenom s volonterima.

Volonteri su sudjelovali u randomiziranoj, dvostrukoj slijepoj studiji (registracija na ClinicalTrials, <https://clinicaltrials.gov/>, Identifikator: NCT02720250). Odabrano je 20 mladih zdravih volontera-ispitanika u dobi od 18 do 30 godina koji su imali normalan indeks tjelesne mase (BMI; Body Mass Index). Prije odabira ispitanika postavljeni su kriterij isključivosti. Kriteriji isključivosti bili su pušenje u anamnezi, hipertenzija, koronarna arterijska bolest, dijabetes, hiperlipidemija, oštećenje bubrega, cerebrovaskularna i periferna arterijska bolest te uzimanje bilo kakvih lijekova ili tvari koje bi mogle utjecati na endotel. Također, nitko od sudionika nije uzimao funkcionalnu hranu obogaćenu n-3 PUFA niti dodatak n-3 PUFA u obliku kapsula prije uključivanja u ovo ispitivanje. Ukoliko je ispitanik ispunio sve traženo bio je upoznat s protokolom i postupcima istraživanja koji su sukladni standardima postavljenim posljednjom revizijom Helsinške deklaracije, a odobrilo ih je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku (KI: 602-04/14-08/06; br.: 2158-610714-114). Svaki sudionik je potpisao suglasnost o sudjelovanju u ispitivanju. Svi ispitanici su tijekom 21 dan konzumirali po tri jaja dnevno, što je bilo ukupno 63 jaja po ispitaniku. Jaja su bila L razreda, mase od 63-73 g. Kontrolna skupina ispitanika konzumirala je jaja proizvedena prema standardnoj hranidbi nesilica. Pokusna skupina ispitanika konzumirala je jaja nesilica P1 skupine čije su nesilice hranjene smjesom s povećanim sadržajem n-3 PUFA. Ispitanici kontrolne skupine dnevno su u organizam unosili 264 mg n-3 PUFA, dok su ispitanici pokusne skupine dnevno unosili 1051,60 mg n-3 PUFA.

U Tablici 8. prikazani su prosječni dnevni unosi n-3 PUFA ispitanika kontrolne i eksperimentalne skupine. Obogaćena jaja porijeklom od nesilica koje su hranjene smjesom u koje je dodano 1,5% ribljeg ulja i 3,5% lanenog ulja, sadržavala su 3,99 puta više n-3 PUFA od konvencionalnih jaja (kontrolna skupina).

Tablica 8. Konzumacija n-3 PUFA prema skupinama ispitanika

Skupina ispitanika	Masa jaja, g	Jestivi dio, g		n-3 PUFA	n-3 PUFA
		Jaje	3 jaja	mg/100 g	mg/dan
K	67,47	58,73	176,19	149,88	264,17
P1	67,78	58,56	175,68	598,59	1051,60

Istraživač kao i ispitanici nisu znali kojoj skupini ispitanici pripadaju sve do kraja trodnevnog protokola prehrane (jaja su označena #1 ili #2 prije nego što su distribuirana u Laboratorij). Ispitanici su prije preuzimanja jaja u Laboratoriju za kvalitetu animalnih proizvoda dobili upute da kuhaju jaja 10-ak minuta prije konzumiranja. Također, svi ispitanici su dobili upute da uzimaju samo jaja koja su im dana za potrebe istraživanja, da ne uzimaju ostalu hranu bogatu n-3 PUFA, funkcionalnu hranu obogaćenu n-3 PUFA ili kapsule s povećanim sadržajem n-3 PUFA tijekom protokola studije.

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za kliničku i sportsku fiziologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku. Dva studijska posjeta i sva mjerenja opisana u nastavku obavljena su prvog dana i dan neposredno nakon završetka protokola. Sva testiranja obavljena su ujutro nakon gladovanja preko noći. Ispitanici su dobili upute da ne poduzimaju nikakve napore aktivnosti tijekom 24 sata prije posjete i da izbjegavaju unos kofeina ujutro prije studijske posjete.

Ispitanici su bili pozvani u Laboratorij za vađenje krvi koji se nalazi u sklopu Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek. Svakom ispitaniku uzet je uzorak venske krvi nakon 15 minuta odmora u sjedećem položaju. Iz krvi su analizirani sljedeći pokazatelji: leukociti, eritrociti, hemoglobin, hematokrit, MCV (Mean Corpuscular Volume), MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), RDW-CV (Red blood cell Distribution Width), trombociti, MPV (Mean Platelet Volume), sedimentacija eritrocita, fibrinogen, glukoza, urea, kreatinin, urati, hsCRP (High Sensitivity C-Reactive Protein), željezo, transferin, kolesterol, trigliceridi, HDL i LDL kolesterol, te HDL-C/kolesterol.

4.7. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja obrađeni su pomoću tri statistička programa. Za obradu podataka kvalitete jaja, sadržaja masnih kiselina i oksidacije masti u žumanjcima jaja, korišten je statistički programa TIBCO® Statistica™ Version 13.5.0.17, ©1984-2018 TIBCO Software inc. (2018). U analizi je korištena GLM procedura, analiza varijance, a za utvrđivanje značajnih razlika na razini $P < 0,05$; $P < 0,01$ i $P < 0,001$ korišten je Fisherov LSD-test.

Za senzorne analize hedonističkog testa korišten program SAS Studio University Edition 3.71 (SAS Institute, 2018.) upotrebom procedure NPAR1WAY za neparametrijske analize s Kruskal-Wallis testom i DSCF metodom (Dwas, Steel, Critchlow-Flinger) za usporedbu tretmana pri razini značajnosti $P < 0,05$. Dobiveni podaci iz triangl testa obrađeni su izračunom statističke značajnosti bazirane na broju točnih odgovora, pri čemu je za odbacivanje H_0 hipoteze uz razinu značajnosti $P < 0,05$ od ukupno 52 ocjenjivanja trebalo točno odabrati različit uzorak u barem 25 slučajaja (Lawless i Heymann, 2010.).

Za analizu rezultata krvnih pokazatelja korišten je statistički program Excel, razlike između skupina testirane su studentovim t-testom. Od statističkih parametara u tablicama su prikazane aritmetička sredina ($\bar{x}$) i standardna devijacija (sd).

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA

5.1. Profil masnih kiselina u uljima i smjesama

U Tablici 9. prikazan je profil masnih kiselina u sojinom, lanenom i ribljem ulju. Analiza je pokazala specifičnosti profila masnih kiselina obzirom na vrstu ulja. Sojino ulje bogato je s linolnom kiselinom (54,12%). Laneno ulje sadrži velike udjele α -linolenske (51,57%). Riblje ulje sadrži α -linolensku (1,15%), eikosapentaensku masnu kiselinu (10,57%) i dokosaheksaensku masnu kiselinu (26,02%).

Tablica 9. Profil masnih kiselina u uljima (% od ukupnih masnih kiselina)

Masna kiselina	Sojino ulje	Laneno ulje	Riblje ulje*
Miristinska C14:0	-	-	5,32
Pentadekanska C15:0	-	-	1,01
Palmitinska C16:0	10,93	6,73	21,79
Heptadekanska C17:0	-	-	1,13
Stearinska C:18:0	4,62	4,35	4,96
Arahidska C20:0	-	-	0,44
Heneikozanska C21:0	-	-	0,43
ΣSFA	15,55	11,08	35,08
Palmitoleinska C16:1	-	-	6,59
Cis-10-heptadekanska C17:1	-	-	0,45
Oktadekanska C18:1	24,31	20,37	12,28
Eikozenska C20:1	-	-	2,59
Eruka C22:1	-	-	1,75
ΣMUFA	24,31	20,37	23,66
Linolna C18:2 n-6	54,12	16,98	1,86
Eikozadienska C20:4 n-6	-	-	1,66
Σn-6 PUFA	54,12	16,98	3,52
α -linolenska C18:3 n-3	6,02	51,57	1,15
Eikozapentaenska C20:5 n-3	-	-	10,57
Dokhozaheksaenska C22:6 n-3	-	-	26,02
Σn-3 PUFA	6,02	51,57	37,74
n-6/n-3 PUFA	8,99	0,32	0,09

*Riblje ulje je nerafinirano

Prema analizama sojino i laneno ulje ne sadrže EPA niti DHA, a da bi se jaja obogatila s n-3 PUFA, u smjese za nesilice dodana je kombinacija u dvije koncentracije lanenog i ribljeg ulja (P1 3,5% + 1,5% i P2 3% + 2%). Ovi rezultati profila masnih kiselina u smjesama sukladni su s onima koje navode Petrović i sur. (2012.), Ceylan i sur. (2011.), Lawlor i sur. (2010.) te Kralik i sur. (2022.).

U Tablici 10. prikazani su rezultati analize profila masnih kiselina u smjesama za nesilice prema hranidbenim tretmanima, kontrolna smjesa (K) i pokusne smjese (P1 i P2).

Kontrolna smjesa sadržavala je 16,72% SFA, 26,47% MUFA, 51,84% n-6 PUFA i 5,04% n-3 PUFA. Omjer n-6/n-3 PUFA u K smjesi bio je 10,28:1. Sadržaj EPA i DHA nije detektiran u kontrolnoj smjesi. Pokusne skupine P1 i P2 u smjesama za nesilice sadržavale su 16,84% i 17,33% SFA; 25,89% i 26,28% MUFA, te 23,40% i 22,79% n-6 PUFA. Sadržaj n-3 PUFA u pokusnim skupinama bio je ujednačen te je iznosio P1 33,89% odnosno 33,59%. Omjer n-6/n-3 PUFA u smjesi P1 iznosio je 0,69:1 a u P2 0,68:1. Sadržaj EPA i DHA povećan je u P2 u odnosu na P1 smjesu od 1,86% i 2,42% na 3,53% i 4,84%. Utvrđene su značajne razlike ($P=0,001$) između n-3 PUFA kao i omjera n-6/n-3 PUFA između kontrolne i pokusnih smjesa ($P=0,001$). Rezultati analiza smjesa korištenih u pokusu suglasni su s navodima Yalcin i Unal (2010.), Kralik i Lovreković (2018.) i Alagawany i sur. (2019.).

Hranidba nesilica sa standardnim krmnim smjesama prema Grčević i sur. (2011.) i Khan i sur. (2017.) sadrži veći udio n-6 PUFA, a manji udio n-3 PUFA što je bio slučaj i u našem istraživanju. Pokusne smjese P1 i P2 sadržavale su približno jednake udjele SFA i MUFA kao i kontrolna smjesa ($P=0,006$ i $P=0,001$). Razlike su utvrđene u sadržaju n-6 PUFA (23,40%: 22,70% i 51,84%; $P=0,001$) kao i u n-3 PUFA (33,86% : 33,59% i 5,04%; $P=0,001$). Uporabom kombinacije biljnog (lanenog) i animalnog (ribljeg ulja) koja se lako resorbiraju (Kralik i Lovreković, 2018.) unesene n-3 PUFA u organizam nesilica efikasno se akumuliraju u žumanjke jaja. Za obrazloženje rezultata istraživanja posebno su važne analize sadržaja ALA, EPA i DHA u smjesama P1 i P2 skupina s obzirom na njihov značaj u preveniranju kardiovaskularnih bolesti (Keten, 2019.).

Tablica 10. Profil masnih kiselina u hrani za nesilice (% od ukupnih masnih kiselina)

Masna kiselina	K	P1	P2	P vrijednost
Miristinska C14:0	0,00±0,00 ^c	1,26±0,05 ^b	1,51±0,01 ^a	0,001
Pentadekanska C15:0	0,00±0,00 ^c	0,17±0,00 ^b	0,20±0,00 ^a	0,001
Palmitinska C16:0	11,27±0,21 ^a	10,82±0,18 ^b	11,09±0,02 ^{ab}	0,038
Heptadekanska C17:0	0,00±0,00 ^c	0,21±0,1 ^b	0,23±0,01 ^a	0,001
Stearinska C:18:0	4,71±0,02 ^a	4,11±0,03 ^b	4,03±0,01 ^c	0,001
Arahidska C20:0	0,41±0,00 ^a	0,27±0,00 ^b	0,27±0,00 ^b	0,001
Behenska C22:0	0,33±0,16 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,007
Σ SFA	16,72±0,22^b	16,84±0,21^b	17,33±0,01^a	0,006
Palmitoleinska C16:1	0,00±0,00 ^c	1,52±0,03 ^b	1,80±0,01 ^a	0,001
Oktadekanska C18:1	26,24±0,02 ^a	21,55±0,07 ^b	21,01±0,13 ^c	0,001
Eikozenska C20:1	0,23±0,05 ^c	1,31±0,03 ^b	1,59±0,01 ^a	0,001
Eruka C22:1	0,00±0,00 ^c	1,51±0,05 ^b	1,88±0,02 ^a	0,001
Σ MUFA	26,47±0,07^a	25,89±0,13^b	26,28±0,09^a	0,001
Linolna C18:2 n-6	51,84±0,11 ^a	23,23±0,22 ^b	22,54±0,19 ^c	0,001
Eikozadienska C20:4 n-6	0,00±0,00 ^c	0,17±0,01 ^b	0,25±0,01 ^a	0,001
Σ n-6 PUFA	51,84±0,11^a	23,40±0,21^b	22,79±0,19^c	0,001
α-linolenska C18:3 n-3	5,04±0,03 ^c	28,47±0,02 ^a	26,33±0,21 ^b	0,001
Eikozapentaenska C20:5 n-3	0,00±0,00 ^c	1,86±0,02 ^b	2,42±0,02 ^a	0,001
Dokhozaheksaenska C22:6 n-3	0,00±0,00 ^c	3,53±0,06 ^b	4,84±0,04 ^a	0,001
Σ n-3 PUFA	5,04±0,03^b	33,86±0,28^a	33,59±0,28^a	0,001
n-6/n-3 PUFA	10,28±0,05^a	0,69±0,02^b	0,68±0,01^b	0,001

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja; $\bar{x}$ =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; Prosječne vrijednosti u redovima označene slovima ^{a,b,c} su statistički značajno različite na razini P<0,05; P<0,01 i P<0,001.

5.2. Proizvodna svojstva nesilica

U Tablici 11. prikazane su žive mase nesilica po skupinama, tijekom 21. dana hranidbe posebno pripremljenim krmnim smjesama. Pred početak davanja pokusnih smjesa nesilice su izvagane (početak hranidbenog pokusa) i nakon što su 21 dan konzumirale pripremljene smjese svaka skupina je ponovo vagana (Tablica 11.).

Tablica 11. Živa masa nesilica na početku i na kraju istraživanja ($\bar{x} \pm \text{sd}$; g)

Masa nesilica	K (n=160)	P1 (n=158)	P2 (n=157)	P vrijednost
Početak istraživanja	2063,35 $\pm$ 126,6	2094,05 $\pm$ 127,6	2070,13 $\pm$ 117,1	0,069
Kraj istraživanja	2066,11 $\pm$ 135,3	2099,91 $\pm$ 134,0	2076,26 $\pm$ 119,2	0,086

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja; $\bar{x}$ =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; n.s. P>0,05

Prosječne žive mase nesilica na početku istraživanja u K, P1 i P2 skupinama iznosile su 2063,36 g; 2094,05 g i 2070,13 g. Nakon 21. dana tretmana masa nesilica istim redoslijedom je iznosila K 2066,11 g; P1 2099,91 g i 2076,16 g. Nisu utvrđene značajne razlike u živim masama između skupina nesilica na početku (P=0,069) niti na kraju istraživanja (P=0,086). Primjetno je bilo održavanje dobre tjelesne kondicije kod svih skupina nesilica.

Aguillón-Páez i sur. (2020.) pri uporabi lanenog i suncokretovog sjemena u smjesama za nesilice također nisu ustanovili razlike u početnim i završnim masama nesilica između tretmana. Međutim Elsayed i AlAfif (2020.) su utvrdili da dodatak 3% lanenog ulja smanjuje tjelesnu masu nesilica u odnosu na kontrolnu skupinu tijekom eksperimenta od 12 tjedana. Negativno djelovanje hranidbenih tretmana na prirast tjelesne mase tijekom pokusa s nesilicama pri različitim hranidbenim tretmanima ustanovili su Ayerza i Coates (2000.).

U Tablici 12. prikazani su proizvodni pokazatelji nesilica tijekom tri tjedna hranidbe nesilica različitim smjesama. Nakon formiranja pokusnih skupina za vrijeme prilagodbe nesilica na skupinu i uvjete držanja koje je trajalo dva dana u K skupini nije bilo uginuća te se u skupini nalazilo 160 nesilica. U skupini P1 uginule su dvije nesilice te je skupina na početku hranidbenog perioda imala 158 nesilica, dok je u P2 skupini bilo 157 nesilica jer su zabilježena tri uginuća. Tijekom naredna tri tjedna proizvodnje jaja nije bilo uginuća. Ukupan broj jaja u tri tjedna u kontrolnoj skupini bio je 3.176 komada, P1 skupini 3.146 komada i P2 skupini 3.116 komada. Intenzitet nesivosti u svim skupinama kretao se oko 94,5%. Konzumacija hrane po danu kretala se od 125,2 g (skupina K) do 127,3 g (skupina P2).

Tablica 12. Proizvodni pokazatelji nesilica tijekom tri tjedna istraživanja

Pokazatelj	K	P1	P2
Broj nesilica na početku istraživanja	160	158	157
Broj nesilica na kraju istraživanja	160	158	157
Mortalitet	0	0	0
Ukupno jaja po skupini	3176	3146	3116
Broj jaja po nesilici	19,84	19,91	19,84
Intenzitet nesivosti (%)	94,52	94,82	94,51
Konzumacija hrane (g/danu)	125,2	126,6	127,3

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja

Rezultati analize proizvodnih pokazatelja nesilica tijekom istraživanja pokazuju da su sve nesilice bile zdrave i konzumirale su približno jednaku količinu hrane te ostvarile podjednaki intenzitet nesivosti. Konzumacija hrane pokazuje zadovoljavajuću ješnost kako kontrolne tako i pokusnih smjesa kod sve tri skupine nesilica. Petrović i sur. (2012.) ostvarili su zadovoljavajuću nesivost pri hranidbi smjesom s 2% lanenog ulja. Basmacioglu i sur. (2003.) i Pardio i sur. (2005.) nisu ustanovili povezanost između dodatka lanenog ulja u smjese i nesivosti, a dnevna konzumacija se kretala od 123,2 g do 137,3 g. Naši rezultati o dnevnoj konzumaciji nalaze se unutar citiranih pokazatelja. Kralik i sur. (2008.) nisu ustanovili razliku u konzumaciji hrane pri uporabi ribljeg i repičinog ulja u smjesama. Međutim, Celebi i Utlu (2006.) su utvrdili utjecaj vrste ulja na konzumaciju, nesivost i iskorištenje hrane ($P<0,05$) što su potvrdili Küçükersan i sur. (2010.). Autori su ustanovili da uporaba 3% suncokretovog, ribljeg, sojinog i lješnjakovog ulja u hranidbenim tretmanima utječu na nesivost i težinu jaja ($P<0,01$).

Ebeid (2011.) nije ustanovio utjecaj lanenog i ribljeg ulja na konzumaciju hrane i proizvodnju jaja o čemu su također suglasni Perić i sur. (2019.), a to potvrđuju i rezultati našeg istraživanja. Lee i sur. (2021.) također ističu da dodavanje lanenog ulja u hranu nesilica ne utječe na konzumaciju hrane i proizvodnje jaja što su potvrdila i istraživanja Neijat i sur. (2016.) te Beheshti Moghadam i sur. (2020.). Bolju konverziju hrane u jaja, ustanovili su Ahmad i sur. (2013.) pri uporabi lanenog sjemena u hrani nesilica u odnosu na kontrolnu skupinu. Laca i sur. (2009.) pri uporabi lanenog i ribljeg ulja u hranidbi nesilica u različitim udjelima, nisu ustanovili značajne razlike u konzumaciji hrane niti u konverziji hrane u jaja ($P>0,05$).

Analiza rezultata navedenih autora može se sažeti u sljedeće: konzumacija smjese g/dan bila je približno jednaka u našem istraživanju kao i istraživanjima Pardio i sur. (2005.), Ebeid (2011.) te Lee i sur. (2021.). Küçükersan i sur. (2010.) su ustanovili da vrsta ulja utječe na nesivost i težinu jaja, ali nema utjecaja na pokazatelje kvalitete (indeks oblika i debljina ljuske). Altaçlı i sur. (2022.) su ustanovili da dodavanje lanenog ulja u smjese za nesilice nema utjecaja na konzumaciju hrane, ali povećava masu jaja. Osim vrste ulja, na proizvodne osobine nesilica kao što su proizvodnja jaja, težina jaja, konzumacija i konverziju hrane utječe i udio dodanog ulja. Rezultati istraživanja u kojima su u smjese za nesilice dodavani udjeli lanenog ulja od 2% - 3% što je slično našem istraživanju nisu utvrdila negativan utjecaj dodatka lanenog ulja na gore navedene pokazatelje (Ceylan i sur., 2011.; Feng i sur., 2018.; Świątkiewicz i sur., 2020.; Ehr i sur., 2017.; Neijat i sur., 2016.). U istraživanja u kojima je laneno ulje ili sjeme u smjese za nesilice dodavano u omjeru 5% ili više uočeno je statistički značajno smanjenje tjelesne težine nesilica i mase jaja (Scheideler i Froning, 1996.; Kim i sur., 2016.; Leeson i sur., 2000.).

5.3. Pokazatelji vanjske kvalitete jaja

U Tablicama 13., 14. i 15. prikazuju se pokazatelji vanjske kvalitete svježih i čuvanih jaja u hladnjaku na +4°C kroz 14 i 28 dana. Analizom su obuhvaćeni indeks oblika (%), masa jaja (g), čvrstoća ljuske (kg/cm²) i debljina ljuske (mm). Prema Bertechini i Mazzucco (2013.) navedene vrijednosti pokazatelja uklapaju se u definiciju o kriteriju za kvalitetna jaja.

Tablica 13. Pokazatelji vanjske kvalitete svježih jaja

Pokazatelj	K	P1	P2	P vrijednost
Indeks oblika (%)	75,52±2,58	75,99±2,56	76,32±2,72	0,502
Masa jaja (g)	67,47±2,37	67,78±2,38	67,50±2,31	0,856
Čvrstoća ljuske (kg/cm ²)	2,81±0,43	2,67±0,39	2,86±0,51	0,243
Debljina ljuske (mm)	0,419±0,02	0,412±0,02	0,414±0,02	0,560

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja; $\bar{x}$ =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; n.s. P>0,05

U Tablici 13. prikazani su pokazatelji vanjske kvalitete svježih jaja (1 dan nakon nesenja). Jaja su bila pravilnog oblika, čiste ljuske i mase 61,47 g (K skupina), 67,78 g (P1 skupina) i 67,50 g (P2 skupina). Najveća čvrstoća ljuske 2,86 kg/cm² utvrđena je kod P2 skupine jaja, zatim

slijedi K skupina 2,81 kg/cm² i na kraju P1 skupina sa čvrstoćom ljuske 2,81 kg/cm². Na tablicama 14. i 15. prikazani su pokazatelji vanjske kvalitete jaja nakon čuvanja jaja u hladnjaku na +4°C, 14 odnosno 28 dana. Indeks oblika (%), masa jaja (g), čvrstoća ljuske (kg/cm²) te debljina ljuske (mm) kod jaja čuvanih u hladnjaku kreću se u približnom rasponu vrijednosti kao kod svježih jaja.

Tablica 14. Pokazatelji vanjske kvalitete jaja čuvanih 14 dana u hladnjaku na +4°C

Pokazatelj	K	P1	P2	P vrijednost
Indeks oblika (%)	76,34±2,3	75,05±2,1	76,19±2,8	0,095
Masa jaja (g)	66,39±2,2	66,79±2,3	66,69±2,3	0,780
Čvrstoća ljuske (kg/cm ²)	2,71±0,4	2,79±0,5	2,72±0,4	0,758
Debljina ljuske (mm)	0,412±0,03	0,422±0,02	0,417±0,02	0,349

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja; $\bar{x}$ =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; n.s. P>0,05

Tablica 15. Pokazatelji vanjske kvalitete jaja čuvanih 28 dana u hladnjaku na +4°C

Pokazatelj	K	P1	P2	P vrijednost
Indeks oblika (%)	75,27±2,27	76,71±2,60	76,44±2,33	0,063
Masa jaja (g)	64,47±2,08	65,41±3,01	65,44±2,17	0,222
Čvrstoća ljuske (kg/cm ²)	2,75±0,45	2,97±0,62	2,72±0,60	0,187
Debljina ljuske (mm)	0,418±0,01	0,412±0,02	0,407±0,03	0,215

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja; $\bar{x}$ =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; n.s. P>0,05

Nisu utvrđene značajne razlike (P>0,005) u analiziranim pokazateljima između skupina kod svježih niti hlađenih jaja. Međutim, vrijednosti analiziranih pokazatelja upućuju na zaključak da su konzumiranjem komponiranih smjesa nesilice proizvodile kvalitetna jaja.

Indeks oblika jaja definiran je kao omjer širine i duljine jaja, a važan je kriterij u određivanju vanjske kvalitete jaja. Kokošja jaja mogu biti različitih oblika, kao na primjer duguljasta, okrugla, s jedne strane ravna-spljoštena, ovalna i slično. Jaja koja nemaju pravilan ovalni oblik ne mogu se staviti u skupinu jaja ekstra kvalitete. Jaja se prema obliku svrstavaju u tri razreda

AA ovalnog oblika čiji je indeks od 72 do 76, duguljasta indeks oblika < 72 i okruglasta indeks oblika > 76 (Nikolova i Kocevski, 2006.).

Okrugla i duguljasta jaja ne slažu se dobro u ambalažu-kutije za jaja, stoga postoji veća vjerojatnost da će se njihova ljuska tijekom transporta prije oštetiti u odnosu na jaja pravilnog oblika. Jaja oštećene ljuske prije će gubiti na unutarnjoj kvaliteti tijekom čuvanja u rashladnim vitrinama trgovačkih centara, a ukoliko je oštećenje ljuske značajno unutarnji sadržaj jaja može onečistiti ljusku ostalih jaja u pakiranju, što svakako nije primjereno ponuditi kupcu (Duman i sur. 2016.). Indeks oblika svježih jaja i jaja skladištenih 14 i 28 dana u hladnjaku na $+4^{\circ}\text{C}$ u našem istraživanju bio je na gornjoj granici za jaja normalne kvalitete te se kretao između 75 i 76%.

Altaçlı i sur. (2022.) u istraživanju utvrdili su kako dodatak lanenog ulja u smjese za nesilice nema utjecaja na debljinu ljuske, indeks bjelanjka, indeks žumanjka i Haugh jedinice što je u suglasnosti s rezultatima Artan i Durmuş (2015.) i Yassein i sur. (2015.).

Kralik i sur. (2014.) u istraživanju utjecaja vremena skladištenja na kvalitetu kokošjih jaja također nisu utvrdili da vrijeme skladištenja konvencionalno proizvedenih jaja utječe na vrijednosti debljine i čvrstoću ljuske, što je sukladno našim rezultatima. Autori kod omega-3 PUFA jaja ističu da postoji značajna razlika ($P<0,05$) u debljini i čvrstoći ljuske između svježe analiziranih jaja i onih čuvanih 28 dana u hladnjaku, što nije sukladno našim rezultatima.

5.4. Utjecaj tretmana na unutarnju kvalitetu jaja

U Tablici 16. prikazan je utjecaj hranidbenih tretmana (K, P1 i P2) i vremena čuvanja jaja (1, 14 i 28 dana) na pokazatelje unutarnje kvalitete jaja. Analizirani su visina bjelanjka (mm), boja žumanjka, Haugh jedinice, pH vrijednost bjelanjaka i pH vrijednost žumanjaka.

Analiza varijance pokazala je utjecaj hranidbenih tretmana samo na pH vrijednost bjelanjaka ($P=0,001$). Vrijeme čuvanja bilo je značajno za sve analizirane pokazatelje kvalitete ($P=0,001$). Interakcija hranidbenih tretmana i vremena čuvanja jaja pokazali su se značajnim za boju žumanjaka ($P=0,018$) te pH vrijednosti bjelanjaka ($P=0,001$) i žumanjaka ($P=0,013$).

Tablica 16. Utjecaj hranidbenih tretmana i vremena čuvanja na pokazatelje unutarnje kvalitete jaja

Pokazatelj	Vrijeme analize	Visina bjelanjka (mm)	Boja žumanjka	HJ	pH bjelanjka	pH žumanjka
K	1	6,20±1,02 ^a	12,66±0,47 ^{cd}	71,83±10,31 ^a	8,22±0,09 ^d	5,99±0,08 ^e
	14	5,57±1,02 ^b	12,70±0,70 ^{cd}	70,79±7,86 ^b	8,88±0,04 ^{bc}	6,04±0,05 ^d
	28	4,52±0,86 ^c	12,76±0,50 ^c	60,12±9,83 ^c	9,06±0,07 ^a	6,19±0,08 ^a
P1	1	6,25±0,87 ^a	12,46±0,73 ^d	73,90±7,72 ^a	8,04±0,15 ^f	6,03±0,08 ^{de}
	14	5,21±1,09 ^b	13,06±0,36 ^{ab}	68,93±8,36 ^b	8,92±0,04 ^b	6,10±0,11 ^c
	28	4,77±1,22 ^c	13,13±0,51 ^a	62,25±10,97 ^c	9,04±0,07 ^a	6,18±0,08 ^{ab}
P2	1	5,84±1,30 ^a	12,66±0,47 ^{cd}	72,16±9,30 ^a	8,12±0,14 ^e	6,00±0,05 ^{de}
	14	5,57±0,88 ^b	12,80±0,48 ^{bc}	70,57±7,87 ^b	8,86±0,03 ^c	6,13±0,12 ^c
	28	4,83±0,81 ^c	12,90±0,54 ^b	64,11±8,46 ^c	9,05±0,04 ^a	6,17±0,09 ^{ab}
P vrijednost						
Tretmana		0,992	0,091	0,556	0,001	0,054
Vremena čuvanja		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Interakcija		0,141	0,018	0,442	0,001	0,013

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja; $\bar{x}$ =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; Prosječne vrijednosti u stupcima označeni različitim slovima ^{a,b,c,d,e,f} su statistički značajno različiti na razini P<0,05; P<0,01 i P<0,001.

Visina bjelanjaka kod svježih jaja u K skupini bila je 6,20 mm, P1 skupini 6,25 mm i P2 5,84 mm, a nakon 28 dana hlađenja istim redoslijedom je iznosila 4,5 mm, 4,77 mm i 4,83 mm. Utvrđeno je da se boja žumanjaka mijenja tijekom čuvanja jaja tj. postaje tamnija, jačeg intenziteta kod jaja porijeklom od nesilica P1 skupine u odnosu na K i P2 skupine. Kod P1 skupine ustanovljena je najveća vrijednost Haugh jedinica u komparaciji s P2 i K skupinama kod svježih jaja (73,90:72,16 i 71,83). Smanjenje vrijednosti Haugh jedinica tijekom čuvanja jaja u hladnjaku 14, odnosno 28 dana, posljedica je opadanja visine bjelanjaka što se dovodi u vezu s procesima hidrolitičke razgradnje, difuzije nutrijenata u žumanjak kao i isparavanja vode i CO₂ kroz pore ljuske. Kemijski procesi u bjelanjcima i žumanjcima mijenjaju pH vrijednosti. Tako se pH vrijednost bjelanjaka tijekom čuvanja jaja u hladnjaku povisuje kod K od 8,22 do 9,06, P1 skupine 8,04 do 9,04 i P2 skupine od 8,12 do 9,05. Istovremeno povisuje se i pH vrijednost žumanjaka kod K skupine od 5,99 do 6,19, P1 skupine od 6,03 do 6,18 i P2 skupine

od 6,00 do 6,17. Kvaliteta jaja ovisi o više čimbenika prije nesenja kao i onih poslije nesenja: čuvanje, hlađenje i manipulacija s jajima (Bertechini i Mazzucco, 2013.). Küçükersan i sur. (2010.) su ustanovili da hranidbeni tretmani nemaju utjecaja na debljinu ljuske, indeks oblika, indeks bjelanjaka i Haugh jedinice. Rezultati istraživanja u ovom radu, također potvrđuju da hranidbeni tretmani (sojino ulje kao i kombinacija lanenog i ribljeg ulja) nemaju utjecaja na Haugh jedinice, boju žumanjaka, visinu bjelanjaka i pH vrijednost žumanjaka ($P>0,05$), osim što djeluju na pH vrijednosti bjelanjaka ($P=0,001$). Konzumenti potražuju svježa i visoko kvalitetna jaja. Unutarnja kvaliteta jaja opada s vremenom i uvjetima čuvanja (Lee i sur., 2016.). Bjelanjak se razgrađuje (kompleks lizocim-ovomucin) i gubi viskozitet, povećava se pH vrijednost bjelanjaka i žumanjaka te se odvija difuzija hranjivih tvari preko vitelinske membrane (Lee i sur., 2016; Tabidi, 2011.). Međutim vrlo je važno da opadanje vrijednosti unutarnjih pokazatelja kvalitete jaja nije značajno, što ukazuje da su jaja i dalje vrlo zadovoljavajuće kvalitete, što smo mi postigli u našem istraživanju.

Kralik i sur. (2014.) u istraživanju utjecaja vremena čuvanja na kvalitetu konvencionalnih i n-3 PUFA kokošnjih jaja navode da vrijeme čuvanja konvencionalno proizvedenih jaja značajno ($P<0,05$) utječe na povećanje pH bjelanjaka i žumanjka, dok su smanjene vrijednosti visine bjelanjaka, Haugh jedinice i boje žumanjka. Navedeni autori ističu da je analiza vanjske i unutarnje kvalitete omega-3 jaja pokazala da dužina čuvanja jaja značajno utječe ($P<0,05$) na povećanje pH bjelanjaka i žumanjka, te smanjene vrijednosti visine bjelanjaka i Haugh jedinice. U Tablici 17. prikazani su masa (g) i udjeli (%) bjelanjaka, žumanjaka i ljuske u svježim jajima kao i u jajima čuvanim 14 odnosno 28 dana u hladnjaku na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Masa jaja prema skupinama K, P1 i P2 bila je ujednačena. Istraživanje je pokazalo da razlike u osnovnim dijelovima, u apsolutnim ili relativnim pokazateljima nisu bile značajne između skupina jaja i vremena čuvanja ($P>0,05$). Unutarnji sadržaj jaja (bjelanjak i žumanjak) zaštićen je ljuskom, međutim ona nije dovoljna da jaja ostanu svježa duže vrijeme. Mnoge zemlje razvile su stroga pravila za čuvanje jaja kako bi se što duže održavala kvaliteta koju su imala nakon nesenja. Sličnosti se mogu uočiti u zakonskim propisima koji reguliraju kvalitetu, čuvanja, rok trajanja i isporuku konzumnih jaja potrošačima u SAD-u, EU, Kanadi, Turskoj, Hrvatskoj i mnogim drugim zemljama (Stadelman i Cotterill, 1995.; Pravilnik o tržišnim standardima za jaja 2021.; Uredba Komisije (EZ) br. 589/2008). Prema tim propisima, jaja se moraju isporučiti potrošaču u roku od 21 dan od proizvodnje, a potrošiti u roku od 28 dana.

Tablica 17. Masa i udjeli osnovnih dijelova u jajima ispitivanih skupina; ($\bar{x} \pm sd$)

Pokusne skupine	Svježa jaja (g)			Svježih jaja (%)		
	Bjelanjka	Žumanjka	Ljuska	Bjelanjka	žumanjka	Ljuska
K	41,14±2,58	17,59±1,22	8,74±0,74	60,91±2,32	26,12±1,88	12,97±1,19
P1	40,93±2,29	17,63±1,14	9,22±0,99	60,38±2,23	26,06±1,86	13,56±1,26
P2	41,33±2,41	17,42±1,11	8,75±0,91	61,19±2,13	25,84±1,85	12,97±1,33
P vrijednost	0,836	0,754	0,078	0,378	0,843	0,117
	14 dana jaja čuvana u hladnjaku (g)			14 dana jaja čuvana u hladnjaku (%)		
K	40,39±2,15	17,97±1,13	8,03±0,69	60,84±1,98	27,08±1,73	12,08±0,98
P1	40,94±1,69	17,39±1,96	8,46±0,66	61,29±2,32	26,05±2,47	12,66±0,87
P2	40,59±2,33	17,76±1,71	8,34±0,83	60,87±2,77	26,62±2,36	12,51±1,22
P vrijednost	0,616	0,400	0,062	0,711	0,179	0,086
	28 dana jaja čuvana u hladnjaku (g)			28 dana jaja čuvana u hladnjaku (%)		
K	38,29±2,23	18,22±1,28	7,96±0,51	59,38±2,25	28,26±2,09	12,36±0,76
P1	38,77±2,01	18,35±1,51	8,29±0,67	59,27±1,75	28,05±1,75	12,68±0,91
P2	39,37±1,99	17,84±1,25	8,23±0,57	60,14±1,76	27,28±1,69	12,58±1,01
P vrijednost	0,139	0,322	0,086	0,163	0,095	0,381

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja; $\bar{x}$ =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; n.s P>0,05

5.5. Profil masnih kiselina u jajima

U Tablici 18. prikazani su profili masnih kiselina (mg/100g) u žumanjcima K, P1 i P2 skupine, odnosno tretmana. Rezultati kemijskih analiza sadržaja Σ SFA pokazali su da između skupina postoje značajne razlike ($P=0,036$). Također su utvrđene značajne razlike između skupina u sadržaju miristinske (C14:0; $P=0,001$), pentadeksanske (C15:0; $P=0,002$), palimitinske (C16:0; $P=0,005$) i heneikozanoične (C21:0; $P=0,001$) masne kiseline. Σ SFA bila je veća kod P1 i P2 skupina jaja za 5,22% odnosno 3,77% u odnosu na K skupinu jaja.

Sadržaj Σ MUFA značajno se razlikovao između K, P1 i P2 skupina jaja ($P=0,001$). Jaja iz P1 i P2 skupine sadržavala su značajno više miristoleinske (C14:1; $P=0,001$), palmitoleinske (C16:1; $P=0,001$) i cis- 10-heptadekanske (C17:1; $P=0,005$). Σ MUFA bila je veća kod P1 i P2 skupine jaja za 11,30% odnosno 12,29% od kontrolne skupine jaja.

Sadržaj Σ n-6 PUFA u lipidima žumanjaka značajno je smanjen u P1 i P2 skupinama u odnosu na K skupinu ($P=0,002$). Smanjenje sadržaja odnosi se također i na linolnu (C18:2,n-6; $P=0,002$) i arahidonsku masnu kiselinu (C20:4,n-6; $P=0,001$). Relativno smanjenje Σ n-6 PUFA iznosi kod P1 27,41%, a kod P2 skupine 25,98%.

Rezultati analize sadržaja ALA, EPA i DHA pokazuju da su jaja P1 i P2 skupina značajno obogaćena s n-3 PUFA u odnosu na K skupinu jaja ($P=0,001$). Alfa-linolenska kiselina (C18:3,n-3) povećana je od 65,48 mg/100 g kod kontrolne skupine na 370,27 kod P1, odnosno 358,21 mg/100 g jestivog dijela jaja kod P2 skupine ($P=0,001$). U K skupini jaja nije ustanovljen sadržaj EPA (C20:5, n-3), a kod P1 skupine jaja iznosio je 29,41 i P2 skupine jaja 31,06 mg/100 g jestivog dijela ($P=0,001$). Značajno povećanje sadržaja DHA (C22:6,n-3) utvrđeno je kod P1 i P2 skupina jaja (199,18 i 191,44 mg/100 g) u komparaciji s kontrolnom skupinom (84,40 mg/100 g jaja; $P=0,001$). Relativno povećanje ALA i DHA u P1 i P2 skupinama jaja bilo je 4,66%, odnosno 4,48%. Povećanje Σ n-3 PUFA bilo je kod P1 skupine 3,99, a kod P2 skupine jaja 3,87 puta veće u odnosu na K skupinu jaja.

Σ n-3 PUFA u kontrolnoj skupini jaja iznosila je 149,88, u P1 skupini 598,59 i u P2 skupini 580,71 mg/100 g jaja. Rezultati naših istraživanja pokazuju da je Σ n-3 PUFA značajno manje zastupljena u lipidima žumanjaka kontrolne skupine (konvencionalna jaja) od P1 i P2 skupina i u suglasnosti je s navodima Nimalaratne i Wu (2015.) u postupku obogaćivanja jaja s n-3 PUFA.

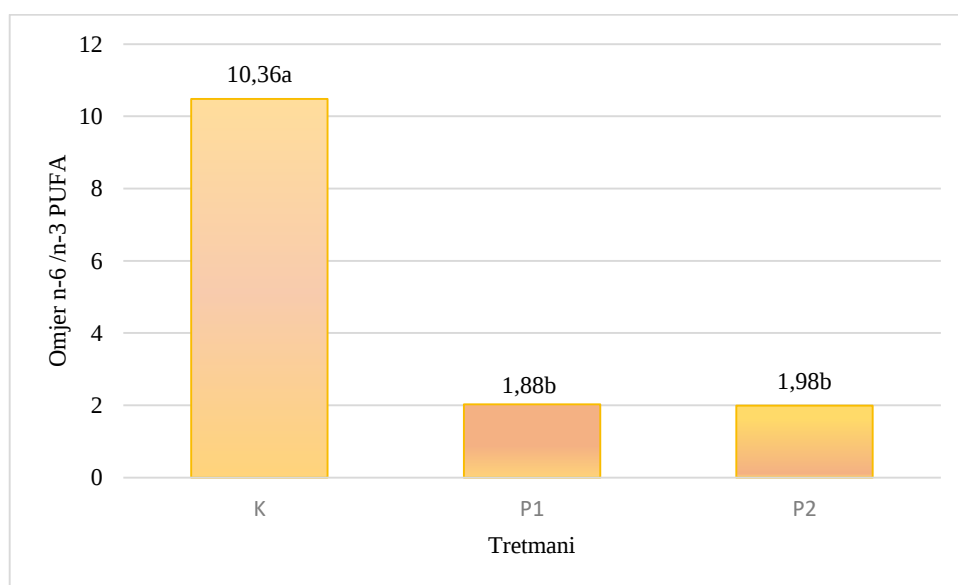
Tablica 18. Profil masnih kiselina u žumanjcima (mg FA/100 g jestivog djela jaja)

Masna kiselina	K	P1	P2	P vrijednosti
Miristinska C14:0	16,55±1,64 ^b	25,18±1,16 ^a	25,44±2,10 ^a	0,001
Pentadeksnska C15:0	3,39±0,88 ^b	5,74±0,96 ^a	6,13±1,07 ^a	0,002
Palmitinska C16:0	1455,86±52,70 ^b	1572,55±46,11 ^a	1551,85±44,88 ^a	0,005
Heptadeksnska C17:0	13,52±2,76	15,57±1,51	16,77±1,72	0,081
Stearinska C18:0	575,15±41,73	562,58±16,57	552,03±24,16	0,482
Heneikozanoična C21:0	15,67±5,05 ^a	7,18±1,10 ^b	6,42±0,49 ^b	0,001
SFA	2080,14±79,76^b	2188,80±40,88^a	2158,64±51,65^{ab}	0,036
Miristoleinska C14:1	1,46±0,42 ^b	3,89±0,89 ^a	3,32±0,21 ^a	0,001
Palmitoleinska C16:1	106,86±19,47 ^b	194,86±13,58 ^a	187,07±9,91 ^a	0,001
cis-10-heptadekanska C17:1	10,71±1,29 ^b	16,86±1,53 ^a	18,35±2,09 ^a	0,001
Oleinska C18:1 cis + trans	2502,17±72,02 ^b	2700,72±113,39 ^a	2734,25±102,08 ^a	0,005
cis-11-eikozenska C20:1	13,29±2,07	16,02±1,71	15,29±1,89	0,102
MUFA	2634,49±72,23^b	2932,35±103,27^a	2958,31±95,32^a	0,001
Linolna C18:2 n-6	1408,22±216,61 ^a	1057,95±48,28 ^b	1079,92±60,96 ^b	0,002
γ-linolenska C18:3 n-6	7,32±1,08 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,001
Eikozadienska C20:2 n-6	10,46±2,03	8,17±1,34	8,32±1,07	0,064
Arahidonska C20:4 n-6	127,51±10,25 ^a	61,59±5,91 ^b	61,58±5,88 ^b	0,001
Σ n-6 PUFA	1553,51±225,91^a	1127,71±52,27^b	1149,82±66,57^b	0,002
α-linolenska C18:3 n-3	65,48±17,54 ^b	370,27±42,25 ^a	358,21±41,41 ^a	0,001
EPA	0,00±0,00 ^b	29,14±3,72 ^a	31,06±1,86 ^a	0,001
DHA	84,40±8,96 ^b	199,18±18,17 ^a	191,44±24,74 ^a	0,001
Σ n-3 PUFA	149,88±26,34^b	598,59±46,60^a	580,71±57,44^a	0,001

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja; $\bar{x}$ =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; Prosječne vrijednosti u redovima označeni različitim slovima ^{a,b} su statistički značajno različiti na razini P<0,05; P<0,01 i P<0,001.

Jaja kokoši nesilica koje su hranjene standardnom krmnom smjesom u odnosu na pokusne skupine sadrže viši udio $\sum$ n-6 PUFA, a manji udio $\sum$ n-3 PUFA utvrdili su također Khan i sur. (2017.) kao i Grčević i sur. (2011.). Linolenska masna kiselina u jajima povećala se linearno s količinom dodatnog lanenog ulja u hranu (Altaçlı i sur., 2022.). Naša istraživanja potvrdila su navode Kralik i Lovreković (2018.) da se sastav masnih kiselina u žumanjcima jaja može modificirati ako se u hranu nesilica dodaju krmiva koja sadrže poželjne n-3 PUFA. Dodatkom lanenog i ribljeg ulja u smjese P1 skupine (3,5% laneno + 1,5% riblje ulje) i P2 skupine (3% laneno + 2% riblje ulje) nesilice su putem svog metabolizma ugradile n-3 PUFA u lipide žumanjaka, tj. obogatile jaja s n-3 PUFA pri čemu je postignut omjer $\sum$ n-6/n-3 PUFA kod P1 1,88:1, a P2 skupine 1,98:1. U jajima kontrolne skupine omjer $\sum$ n-6/n-3 PUFA iznosio je 10,36:1. Ovi rezultati u skladu su sa navodima Alagawany i sur. (2019.) te Kralik i sur. (2022.). Yalcin i Unal (2010.) su pri korištenju 4,5% ribljeg ulja te kombinaciji ribljeg ulja i lanenog sjemena (1,5% + 10%) u smjesama za nesilice postigli 9,72% $\sum$ n-3 PUFA, a omjer $\sum$ n-6/n-3 PUFA je iznosio 2,28:1.

Kazempoor i sur. (2021.) su modificirali sastav smjesa za nesilice na sljedeći način: 1. skupina kontrola, 2. skupina kontrola + laneno ulje 3%, odnosno 4%. U žumanjcima jaja druge skupine povećana je koncentracija ALA, EPA i DHA, a smanjen je omjer $\sum$ n-6/n-3 PUFA u odnosu na kontrolnu skupinu. Smanjenje omjera $\sum$ n-6/n-3 PUFA postignuto je i u našem istraživanju kod P1 i P2 skupina u komparaciji s kontrolnom skupinom. U našem radu omjer $\sum$ n-6/n-3 PUFA kretao se sljedećim redoslijedom: K skupina jaja 10,36:1, P1 skupina 1,88:1 i P2 skupina 1,98:1 (Grafikon 4.).



Grafikon 4. Omjer n-6 PUFA/n-3 PUFA u žumanjcima ispitivanih skupina

Attia i sur. (2022.) istraživali su utjecaj omjera n-6/n-3 PUFA:16,7:1, 9,3:1 i 5,5:1 u hrani nesilica na proizvodnost, kvalitetu jaja, profil masnih kiselina te aterogenog (AI) i trombogenog (TI) pokazatelja. Nesilice koje su hranjenje s najvećim omjerom n-6/n-3 PUFA postigle su povećani prirast. Pri omjeru 9,3:1 nesilice su proizvodile više jaja povećane mase i postigle bolju konverziju hrane. Međutim, nesilice koje su konzumirale hranu s najnižim omjerom n-6/n-3 PUFA nesle su jaja s poboljšanim vrijednostima AI, TI i hipo/hiperkolesterolemičnih (HHI) indeksa.

Rezultate slične našima u pogledu obogaćivanja jaja s n-3 PUFA postigli su Stupin i sur. (2018.) pri uporabi biljnih i ribljeg ulja u smjesama za nesilice. Zamjena ribljeg ulja s mikroalgama (0,5%, 1% i 1,5%) pokazala se također uspješnom pri obogaćivanju jaja s n-3 PUFA (321,07 : 346,25; 361,60 : 346,17 i 399,34 : 369,02 mg/100 g jaja; Kralik i sur., 2020.).

Promila i sur. (2017.) su pri uporabi lanenog ulja u hranidbi nesilica od 1% do 4% utvrdili da se sadržaj ALA u ukupnim masnim kiselinama povećao za 6,44 puta, a u našem radu kod P1 skupine ALA se povećala 5,65 puta i P2 skupine 5,47 puta. Ako se u hranu nesilica dodaje riblje ulje, ALA se može povećati u jajima 4 do 8 puta (Kralik i sur., 2008.), a $\sum$ n-3 PUFA 2 do 6 puta (Zotte i sur., 2015; Ehr i sur., 2017.; Kralik i sur., 2018.). U ovom radu $\sum$ n-3 PUFA povećana je 3,99 puta u P1 odnosno 3,87 puta u P2 skupini jaja u komparaciji s kontrolnom skupinom jaja. Također je potvrđena pretpostavka da kokoši nesilice mogu sintetizirati EPA i DHA ako hrana sadrži dovoljno ALA. Naši rezultati slažu se s navodom Ceylan i sur. (2011.) da ako hrana sadrži laneno ulje odlaže se više ALA, a ako prevladava riblje ulje u hrani u žumanjcima jaja odlaže se više DHA. Naši rezultati također su u skladu sa navodima Hudečková i sur. (2012.) i Aguillón-Páez (2020.) da se pri povećanju sadržaja n-3 PUFA smanjuje sadržaj n-6 PUFA. Isto tako rezultati su suglasni da se s povećanjem ribljeg ulja, pri povećanju sadržaja DHA, smanjuje sadržaj AA (Lawlor i sur., 2010.; Ceylan i sur., 2011.; Cachaldora i sur., 2006.; Kralik i sur., 2021.). Visoka razina ALA smanjuje sintezu AA te se smanjuje i njihovo odlaganje u žumanjke jaja. Petrović i sur. (2012.) su ustanovili da se povećanjem lanenog ulja 1% do 4% u hranu nesilica, povećava sadržaj n-3 PUFA i smanjuje omjer n-6/n-3 PUFA. Naša istraživanja potvrdila su njihove rezultate u pogledu sadržaja n-3 PUFA i AA, kao i omjera n-6 kroz n-3 PUFA. Hargis i sur. (1991.) navode da se uporabom ribljeg ulja (3%) obogaćuju jaja s n-3 PUFA više od 180 mg/jajetu. Wang i sur. (2017.) upozoravaju na ograničenu uporabu ribljeg ulja u hrani nesilica zbog pojave nepoželjnog mirisa u jajima. Senzorna ocjena K, P1 i P2 skupina jaja u našem radu pokazala je lošiju ocjenu za dopadljivost onih jaja koja su potjecala od druge skupine nesilica (veći udio ribljeg ulja). Coorey i sur. (2015.) kao i Antruejo i sur. (2011.) te Laca i sur. (2009.) ustanovili su da

kombinacija lanenog ulja (sjemena) i ribljeg ulja u hranidbi nesilica obogaćuje jaja s EPA i DHA za 2 odnosno 3 puta kod eksperimentalnih u odnosu na kontrolnu skupinu. Petrović i sur. (2012.) su pri uporabi lanenog ulja ustanovili da omjer n-6/n-3 PUFA u lipidima žumanjaka iznosi 12:1 što je značajno širi omjer od omjera 2,02:1 i 1,98:1 koji su ostvareni u našem radu. Uporabom lanenog ulja u hrani nesilica povećavaju se udjeli nezasićenih masnih kiselina u lipidima žumanjaka, posebice LA kao i EPA i DHA koje su metabolički derivati ALA. Laneno sjeme i ulje sadrže visoke koncentracije ALA (>50%; Trautwein, 2001.) i zbog povećane koncentracije ALA u hrani, povećava se sadržaj te masne kiseline u žumanjcima jaja. Nadalje, u jetri peradi može se konvertirati ALA u dugolančane n-3 PUFA, tj. EPA i DHA. Ova konverzija i transport EPA i DHA u žumanjke odvijaju se u malim koncentracijama. Ehr i sur. (2017.) navode da konverzija ALA u EPA i DHA te njihovo deponiranje u žumanjke ovisi o dobi nesilica. Nadalje, istraživanja Zotte i sur. (2015.) su pokazala da ekstrudirano laneno sjeme povećava sadržaj EPA u žumanjcima, što ukazuje da se ekstrudirani oblik lanenog sjemena brže apsorbira iz hrane od neprerađenog oblika sjemena lana. Ovu činjenicu potvrdila su istraživanja Thacker i sur. (2005.), Sari i sur. (2002.) i Yalcin i sur. (2007.). Omjer LA:ALA značajan je pri konverziji ALA u EPA i DHA jer se ALA i LA natječu za iste enzime u procesu desaturacije i elongacije. Utvrđeno je da njihov smanjeni omjer povećava sintezu dugolančanih PUFA (Goldberg i sur., 2013.).

Omri i sur. (2019.) su koristili laneno ulje (4,5%) i kombinaciju lanenog ulja, 1% suhe rajčice i 1% slatkog papra u hranidbi nesilica. Uporaba lanenog ulja značajno je snizila sadržaj palimitinske kiseline od 25,41% (kontrola) na 23,43% (eksperimentalna skupina) i stearinske masne kiseline od 14,75% na 12,52%. Uključenje lanenog ulja značajno je povisilo u žumanjcima DHA (od 1,94 do 2,73). U našem radu u P1 i P2 tretmanima samo je smanjen udio stearinske masne kiseline.

Pri definiranju indikatora kvalitete lipida za ljudsko zdravlje koristi se razvrstavanje masnih kiselina prema strukturnoj formuli (SFA, MUFA, PUFA). Upotrebljavaju se aterogeni (AI), trombogeni (TI) indeksi kao i indeks omjera hipokolesterolemičnih i hiperkolesterolemičnih masnih kiselina (HHI) (Omri i sur., 2019.; Untea i sur., 2020.).

U Tablici 19. prikazani su navedeni indikatori kvalitete u lipidima žumanjaka jaja u našem istraživanju.

Tablica 19. Indikatori zdravstvene kvalitete lipida žumanjaka (eng. „Egg health indexes“)

Pokazatelji	K	P1	P2
Aterogeni indeks (AI)	0,498	0,471	0,470
Trombogeni indeks (TI)	0,833	0,555	0,556
Hipo/hiperkolesterolemični indeks (HHI)	2,755	2,843	2,824

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja

Kvaliteta lipida žumanjaka sadržanih u jajima sa zdravstvenog aspekta prikazana je pomoću AI, TI i HH indeksa. Vrijednost AI i TI najveća je kod kontrolne skupine jaja (0,498 i 0,833), a manje vrijednosti ostvarene su kod P1 i P2 skupina jaja (0,471 i 0,470 odnosno 0,555 i 0,556). AI indeks pokazuje omjer između glavnih zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. Smatra se da nezasićene masne kiseline imaju anti-aterogeno djelovanje (inhibiranjem agregacije plakova) i smanjeni sadržaj esterificiranih masnih kiselina, kolesterola i fosfolipida pri čemu preveniraju pojavu koronarnih bolesti. TI indeks pokazuje omjer pro-trombogenih (zasićenih) i anti-trombogenih (nezasićenih) masnih kiselina (Omri i sur., 2019.). AI indeks smatra se značajnim jer uključuje uz MUFA i miristinsku masnu kiselinu (C14:0) za koju se smatra da ima najštetnije kardiovaskularno djelovanje (Higgs, 2002.). TI pokazuje rizik za zgrušavanje krvi. Za HHI uzimaju se u obzir učinci određenih masnih kiselina uključenih u metabolizam kolesterola i poželjna je što veća vrijednost. Oleinska masna kiselina kao i općenito MUFA masne kiseline te linolna kiselina ukoliko se zamjene s ESFA mogu utjecati na smanjenje ukupnog i LDL kolesterola, te smanjuju rizik od pojave srčano-žilnih bolesti (Calder, 2015.; Lešić i sur., 2017.).

Konzumacija određenih masnih kiselina ima utjecaja na stimuliranje ili preveniranje ateroskleroze i tromboze koje su pod utjecajem sadržaja ukupnog i LDL kolesterola (Ulbricht, 1991.). Smatra se da AI i TI indeksi mogu bolje karakterizirati aterogeni i trombogeni potencijal lipida žumanjaka jaja, nego primjerice omjer PUFA/SFA. AI i TI indeksi uzimaju u obzir različite utjecaje pojedinih masnih kiselina na povećanje patogenih pojava kao što su ateromi i/ili trombi koji utječu na ljudsko zdravlje. Jaja s nižim omjerom SFA/PUFA pokazuju niže vrijednosti AI, TI i HH indeksa (Omri i sur., 2019.; Untea i sur., 2020.; Panaite i sur., 2020.). Panaite i sur. (2020.) su komparirali utjecaj lanenog (E1 skupina) i kombinaciju lanenog i repičinog (E2 skupina) kao i lanenog i rižinog brašna (E3 skupina) s kontrolnom skupinom (C) na AI, TI, HH indekse i ustanovili da se AI vrijednost značajno smanjila u E2 skupini (0,53) u

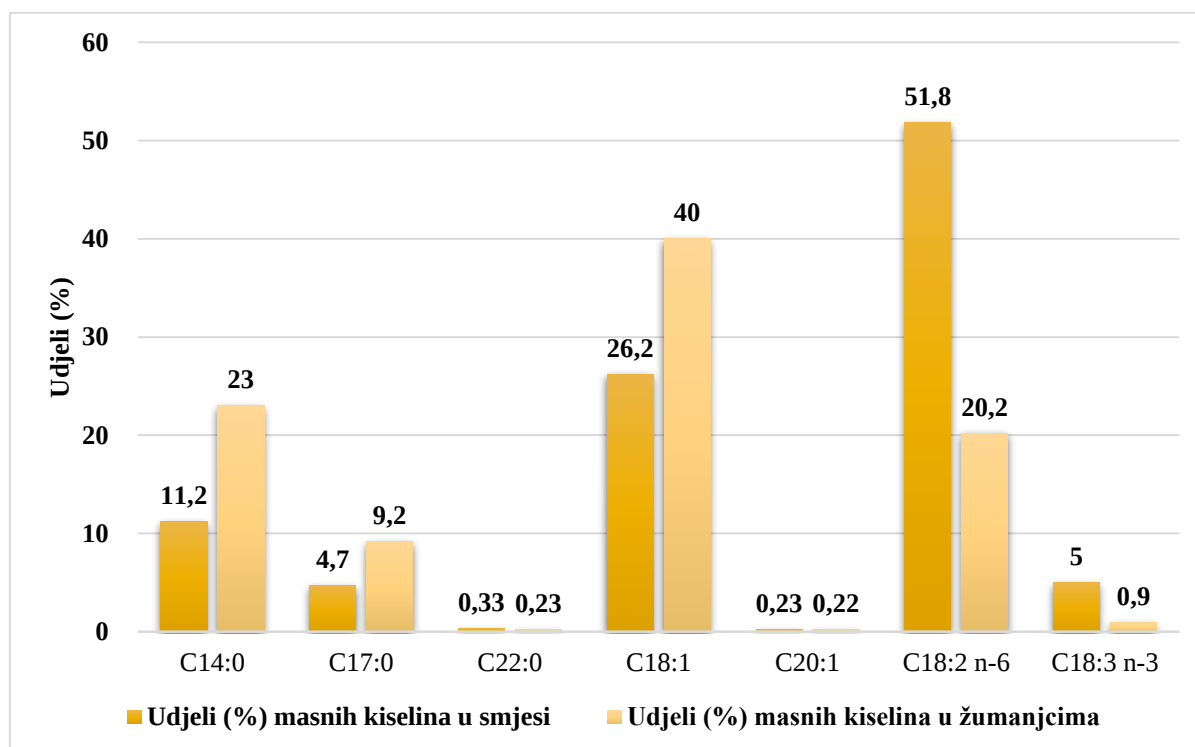
odnosu na C skupinu (0,57). Također su se smanjili omjeri $\sum$ SFA/ $\sum$ PUFA i $\sum$ n-6/n-3 PUFA. Istovremeno smanjene su TI vrijednosti (1 do 0,78), a povećane HH vrijednosti (2,45 do 2,60) u žumanjcima jaja. Slične rezultate kao prethodni autori postigli su Untea i sur., 2020. te Omri i sur., 2019. Vrijednosti indeksa u našem radu pokazuju iste trendove (AI i TI smanjenje; HHI-povećanje) kao što navode citirani autori.

Attia i sur. (2015.) su istraživali sadržaj masnih kiselina i omjer n-6/n-3 PUFA, te aterogeni i trombogeni indeks kao i antioksidativni status jaja nabavljenih u različitim maloprodajnim marketima (A,B,C,D). Ustanovili su sljedeće omjere n-6/n-3 PUFA: 15,72, 14,64, 17,22 i 19,09:1). AI vrijednosti istim redoslijedom su iznosile 0,458, 0,463, 0,434 i 0,533, a TI vrijednosti iznosile su 0,393, 0,397, 0,389, 0,784. Jaja obogaćena s PUFA podložna su peroksidaciji što se sprječava dodavanje antioksidanata (Laudadio i sur., 2015., Surai i Sparks 2001.). El-Wakf i sur. (2010.) navode da jaja s nižim AI i TI vrijednostima smanjuju pojavu ateroskleroze, a Hosseini-Vashan i sur. (2010.) i Watson i sur. (2009.) navode da niski TI indeks smanjuje fibrilaciju atrijsa.

Jaja s nižim omjerom SFA/PUFA pokazuju niže aterogene i trombogene indekse i preporučuju se u zdravoj prehrani (Mutungi i sur., 2008.; Grela i sur., 2014.). Miristinska i palmitinska masna kiselne smatraju se aterogenim dok neki autori palmitinsku masnu kiselinu smatraju neutralnom u pogledu aterogenosti te joj se pripisuju trombogene svojstva (Laudadio i Tufarelli, 2011.; Hosseini-Vashan i sur. 2010.; Popa i sur., 2012.).

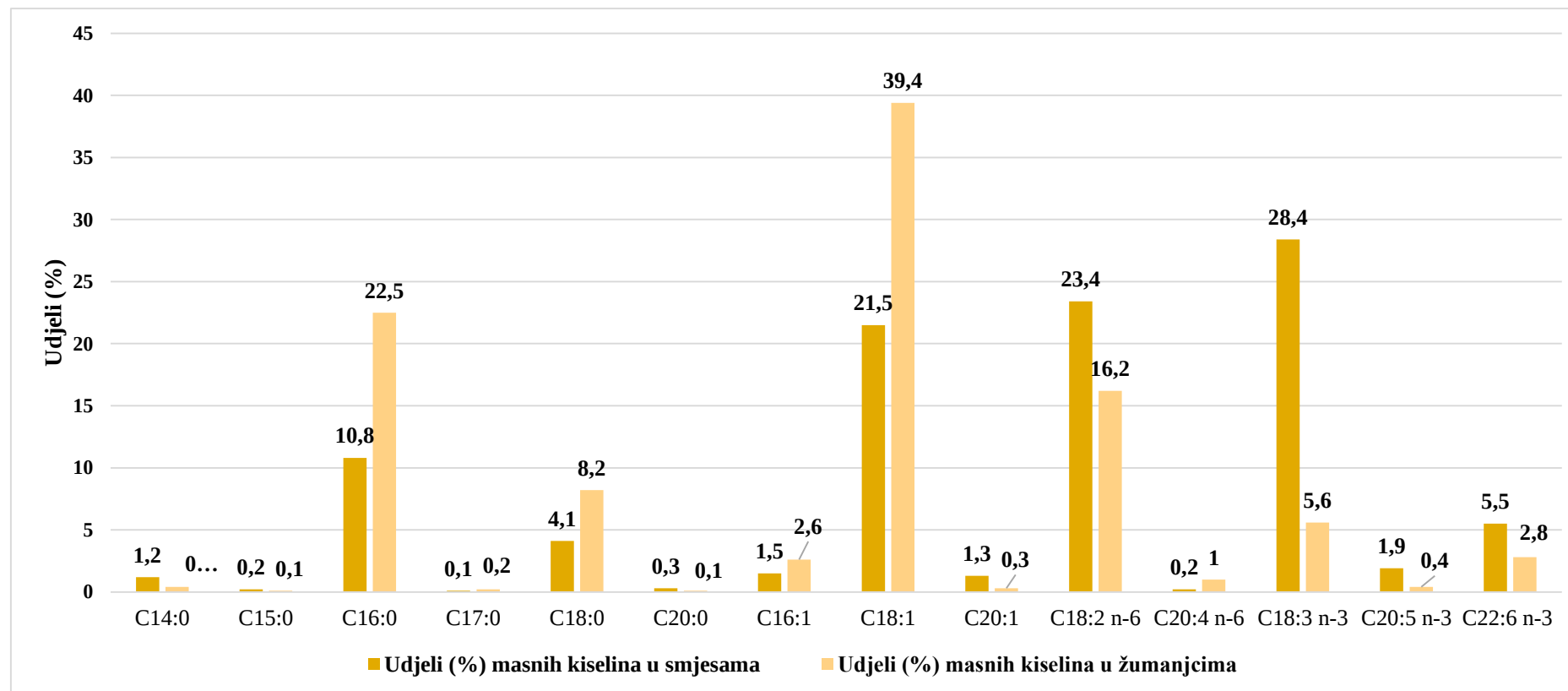
Na Grafikonima 5., 6. i 7. prikazani su relativni udjeli pojedinih masnih kiselina u smjesama za nesilice i u lipidima žumanjaka jaja tretmana K, P1 i P2.

Na Grafikonu 5. zamjetno je da je smjesa K tretmana bila bogata s linolnom (51,84%) i oleinskom (26,24%) masnom kiselinom, a iz skupine n-3 PUFA smjesa je sadržavala samo α -linolensku masnu kiselinu (5,04%). Jaja tretmana K sadržavala su 20,20% linolne (n-6 PUFA) i 0,9% α -linolenske (n-3 PUFA).

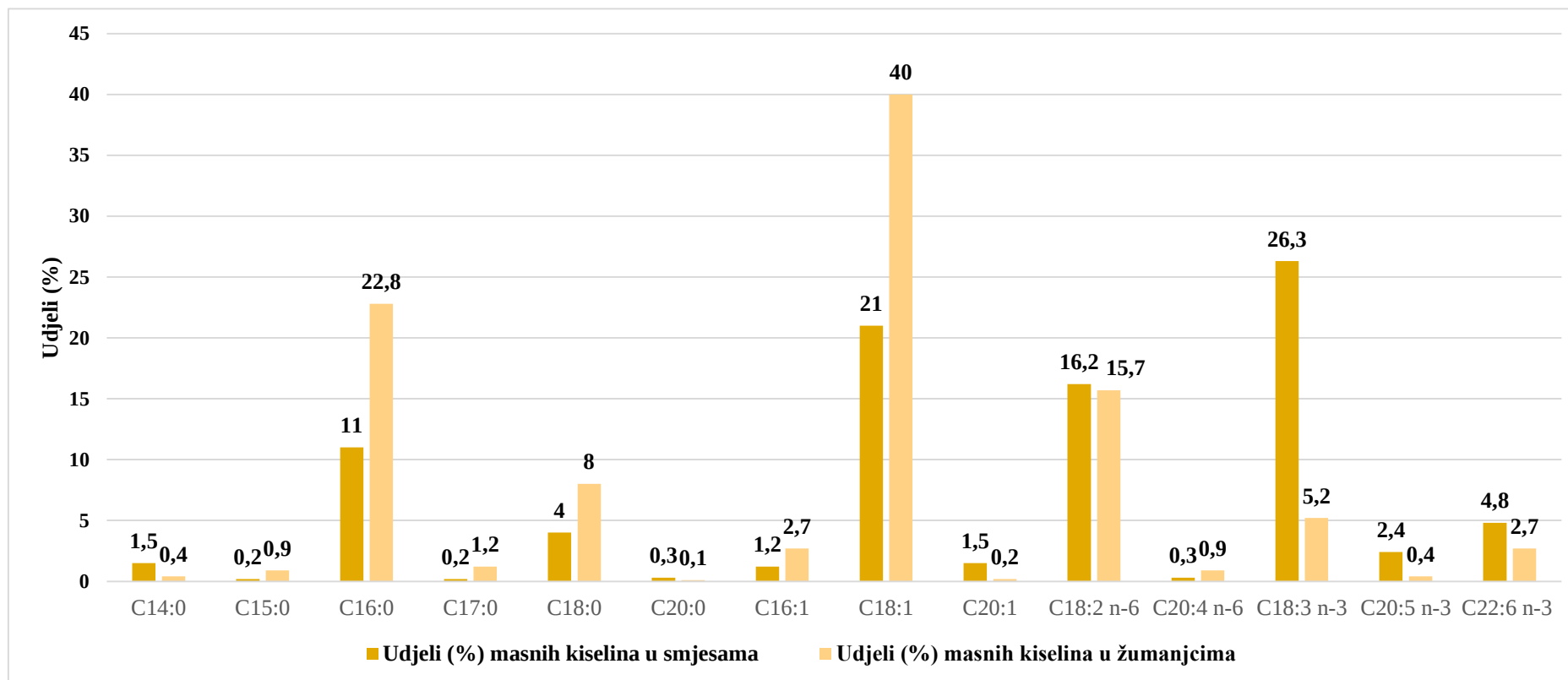


Grafikon 5. Udjeli (%) masnih kiselina u smjesi i žumanjcima jaja K tretmana

Grafikoni 6. i 7. slični su prema profilima masnih kiselina u smjesama kao i u žumanjcima jaja, na što je utjecao sastav smjesa za nesilice.



Grafikon 6. Udjeli (%) masnih kiselina u smjesi i lipidima žumanjaka jaja P1 tretmana



Grafikon 7. Udjeli (%) masnih kiselina u smjesi i lipidima žumanjaka jaja P2 tretmana

Prema postavljenom cilju istraživanja jaja P1 i P2 tretmana uspješno su obogaćena s n-3 PUFA i to: ALA (5,6 % i 5,2%), EPA (0,4% i 0,4%) i DHA (2,8% i 2,7%).

Biomedicinska ispitivanja obavljena su s jajima K i P1 tretmana obzirom na povoljniji sastav n-3 PUFA i senzornu ocjenu jaja.

5.6. Senzorna analiza jaja

U Tablici 20. prikazani su rezultati senzorne analize jaja provedene pomoću trianl testa. Ocjenjivači (n = 52) su utvrdili da postoji statistički značajna razlika ($P < 0,05$) u parovima tretmana K : P1 i K : P2, dok statistički značajna razlika u paru tretmana P1 : P2 nije utvrđena. Temeljem tog zaključujemo da su ocjenjivači utvrdili razlike između kontrolne skupine (K) i pokusnih skupina (P1 i P2), dok razlika između pokusnih skupina nije utvrđena.

Tablica 20. Rezultati senzorne analize jaja pomoću trianl testa

Parovi tretmana	Broj točnih odgovora ²	Postotak točnih odgovora (%)	P vrijednost
K : P1	31	59,62	$P < 0,05$
K : P2	33	63,46	$P < 0,05$
P1 : P2	24	46,15	$P > 0,05$

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja

² Minimalan broj točnih odgovora potrebnih za odbacivanje H_0 hipoteze i donošenje zaključka da postoji osjetilna razlika na temelju trianl testa za n = 52 i $\alpha = 0,05$ iznosi 25.

U Tablici 21. prikazana je učestalost (frekvencija) svojstva koji su percipirani razlikovnicima kada su ocjenjivači točno odabrali različit uzorak. Najčešće utvrđena razlika između parova tretmana bila je u okusu (32,79-46,81%), zatim u boji (19,15-27,95 %), mirisu (18,18-22,95%), dok je razlika u teksturi između parova bila najrjeđa (14,89-18,18 %).

Primijećeno je da je pri ocjenjivanju kontrolne i pokusnih skupina došlo do pomaka u frekvenciji razlikovnih svojstava okusa i mirisa. Pritom je utvrđeno povećanje učestalosti razlika u mirisu (+4,77 %), a do smanjenja učestalosti razlika u okusu (-5,39 %) kako se povećavao udio ribljeg ulja u smjesi za nesilice. Navedeno bi se moglo tumačiti pojavom da je kod nižih razina dodatka ribljeg ulja veća učestalost razlika u okusu, jer je zbog zagrijavanja, ovlaživanja i mehaničke obrade uzorka došlo do izraženijeg podražaja u ustima. S druge strane, pri dodatku većeg udjela ribljeg ulja došlo je do povećanja uočavanja razlika u mirisu zbog intenzivnije percepcije mirisa uvjetovane većim dodatkom ribljeg ulja. Navedeno upućuje na zaključak da se s povećanjem dodatka ribljeg ulja povećava utjecaj na percepciju mirisa, a smanjuje utjecaj na percepciju okusa.

Iako ocjenjivači nisu utvrdili značajnu razliku između pokusnih tretmana, vrijedno je uočiti da je najčešće percipirana razlika između uzoraka bila u okusu (gotovo 50 % svih percipiranih razlika). Iz tog se može zaključiti da se razlike između pokusnih skupina mogu češće percipirati tek nakon mehaničke manipulacije, ovlaživanja i zagrijavanja uzorka u ustima.

Tablica 21. Učestalost iskazivanja razlike u svojstvima pri provedbi triangl testa (%)

Parovi tretmana	Svojstvo			
	Boja	Miris	Okus	Tekstura
K : P1	25,45	18,18	38,18	18,18
K : P2	27,87	22,95	32,79	16,39
P1 : P2	19,15	19,15	46,81	14,89

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja

U Tablici 22. prikazani su osnovni statistički pokazatelji svojstava dopadljivosti jaja pri provedbi hedonističkog testa, odnosno prosjeci, medijani i koeficijent varijacije izražen u postotku. Uočljivo je blago umanjeno prosjeka dopadljivosti boje i mirisa kako se povećava udio ribljeg ulja. Međutim, nije utvrđena promjena medijana te medijan svih tretmana za oba svojstva iznosi 7, što upućuje na ujednačenost tog svojstva između tretmana. Kod svojstva dopadljivosti okusa uočljivo je izrazito smanjenje prosjeka kao i samog medijana od 7 kod kontrolne skupine K, preko medijana 6 kod pokusne skupine P-1 do medijana 5 kod pokusne skupine P2. Navedeno upućuje na mogući utjecaj dodatka ribljeg ulja na dopadljivost okusa jaja s nepovoljnim efektom.

Nadalje, uočljivo je povećanje koeficijenta varijacije kako se povećava udio ribljeg ulja što bi se moglo objasniti s približavanjem graničnim vrijednostima skale (vrijednosti bliže 0 i 9). Najveći iznosi koeficijenta varijacije utvrđeni su kod dopadljivosti okusa, pri čemu kod skupine P2 iznosi 46,97 % sugerirajući veliko odstupanje između ocjenjivača.

Tablica 22. Osnovni statistički pokazatelji svojstava dopadljivosti jaja pri provedbi hedonističkog testa

Tretman	Dopadljivost boje		
	$\bar{x}$	Med.	Vk, %
K	7,23	7	19,10
P1	6,96	7	26,07
P2	6,67	7	26,83
	Dopadljivost mirisa		
	$\bar{x}$	Med.	Vk, %
K	6,94	7	23,07
P1	6,54	7	27,34
P2	6,29	7	31,07
	Dopadljivost okusa		
	$\bar{x}$	Med.	Vk, %
K	6,71	7	31,13
P1	5,69	6	40,20
P2	4,94	5	46,97

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja;
 $\bar{x}$ =srednja vrijednost; Med=medijalna vrijednost; Vk= koeficijent varijacije

U Tablici 23. i Grafikonu 8. prikazani su prosjeci i standardne devijacije svojstava jaja dobiveni provedbom hedonističkog testa dopadljivosti. Statističkom obradom podataka nisu utvrđene značajne razlike ($P>0,05$) između tretmana u svojstvima dopadljivosti boje i mirisa, iako je uočeno smanjenje prosječnih vrijednosti s većim dodatkom ribljeg ulja. Svojstvo dopadljivosti okusa bilo je statistički značajno različito između tretmana ($P<0,05$). Pritom je utvrđeno da je dopadljivost okusa tretmana K bilo ocijenjeno sa statistički značajno većom vrijednošću od pokusnih tretmana P1 i P-2. Razlike između pokusnih tretmana P1 i P2 nisu bile utvrđene. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima triangl testa kojim su utvrđene značajne razlike u parovima kontrolnog i pokusnih tretmana, a pri čemu je svojstvo okusa bilo najčešće označeno kao razlikovno svojstvo.

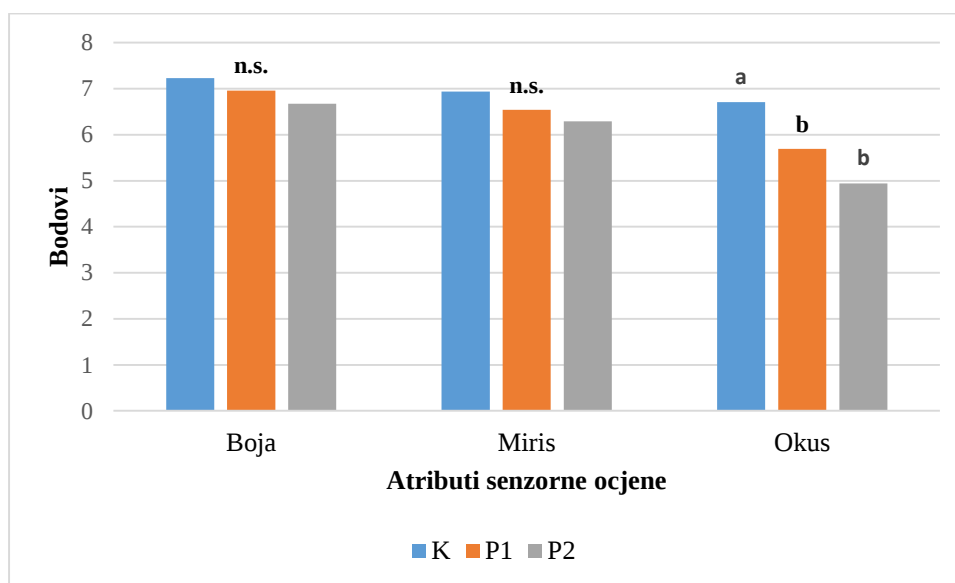
Tablica 23. Prosjeci i standardne devijacije tretmana po svojstvima dopadljivosti

Svojstvo	Tretman		
	K	P1	P2
Dopadljivost boje	7,23 ± 1,38	6,96 ± 1,81	6,67 ± 1,79
Dopadljivost mirisa	6,94 ± 1,60	6,54 ± 1,79	6,29 ± 1,95
Dopadljivost okusa	6,71 ± 2,09 ^a	5,69 ± 2,29 ^b	4,94 ± 2,32 ^b

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja

Prosječne vrijednosti u redovima označeni različitim slovima ^{a,b} su statistički značajno različiti na razini $P < 0,05$

Iz navedenog se može zaključiti da je utvrđen utjecaj dodatka ribljeg ulja u krmnu smjesu za nesilice na senzorna svojstva pomoću triangl testa te da je taj utjecaj uglavnom uzrokovan promjenama u okusu jaja što je rezultiralo statistički značajnim smanjenjem dopadljivosti okusa. Daljnja istraživanja mogla bi biti usmjerena na istraživanja potrošača i utvrđivanje spremnosti za kupnju prilikom informiranja o prednostima konzumacije takvih jaja.



Grafikon 8. Prosječne vrijednosti svojstava dopadljivosti jaja dobivene hedonističkim testom

Pojavu „ribljeg“ mirisa i okusa pri većoj koncentraciji n-3 PUFA u jajima ustanovili su Gonzalez-Esquerria i Leeson (2000.), Lawlor i sur. (2010.) te Škrčić i sur. (2007.). Ispitivači u triangl testu ustanovili su najčešću razliku između tretmana u okusu, boji i mirisu, a najrjeđu u teksturi. Također su ustanovili da su udjeli ulja u smjesama (P1 1,5% i P2 2%) utjecali najvećim dijelom na percepciju mirisa. Povezanost nepoželjnih senzornih svojstava jaja i količine ribljeg ulja u smjesama za nesilice istakli su također Schreiner i sur. (2004.) te Carrillo-Dominguez i

sur. (2005.). Međutim, neki istraživači poput Cloughley i sur. (1997.), Marshall i sur. (1994.) kao i Yalcin (2017.) navode da se dodavanjem ribljeg ulja do 1,5% u hranu za nesilice, mogu postići zadovoljavajuća senzorna svojstva jaja. Petrović i sur. (2016.) su istakli da dodatak lanenog ulja (1% do 4%) u hranu nesilica ne utječe loše na senzorna svojstva što također navode Scheideler i sur. (1997.) kao i Mazalli i sur. (2004.). Autori su analizirali boju, okus, miris teksturu i opću prihvatljivost što se djelomično poklapa s analizom senzornih atributa u ovom radu. Prema Škrtiću i sur. (2007.) kombinacija ribljeg i lanenog ulja kao i ribljeg i repičinog ulja utječe na ocjenu opće prihvatljivosti jaja. Povezanost ribljeg ulja u hrani nesilica s nepoželjnim senzornim svojstvima jaja tumači se započetim oksidativnim procesima, odnosno stvaranjem produkata koji utječu na pojavu okusa „užglosti“ i mirisa na „ribu“. Komparacija naših rezultata s rezultatima citiranih autora o senzornoj ocjeni jaja poklapa se u dijelu koji se odnosi na prihvatljivost manje koncentracije ribljeg ulja u hrani nesilica.

5.7. Oksidativni procesi u jajima

U Tablici 24. prikazuju se rezultati istraživanja oksidacije masnih kiselina u lipidima žumanjaka. TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) vrijednosti ($\mu\text{g MDA/g}$ žumanjka) u K, P1 i P2 skupinama jaja povećavale su se tijekom vremena čuvanja u hladnjaku na 4°C . Nisu ustanovljene značajne razlike između skupina svježih niti hlađenih jaja ($P > 0,05$) iako se uočava trend povećanja TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) vrijednosti ovisno o trajanju čuvanja kod svih skupina.

Tablica 24. Vrijednosti lipidne oksidacije (TBARS) u žumanjcima jaja ispitivanih skupina ($\mu\text{g MDA/g}$ žumanjka)

Vrijeme čuvanja	K	P1	P2	P vrijednost
1 dan	0,847 $\pm$ 0,11	0,859 $\pm$ 0,25	0,831 $\pm$ 0,08	0,938
14 dana	0,781 $\pm$ 0,15	0,834 $\pm$ 0,17	0,869 $\pm$ 0,10	0,413
28 dana	0,851 $\pm$ 0,10	0,911 $\pm$ 0,21	0,937 $\pm$ 0,15	0,491
P vrijednost	0,400	0,721	0,148	

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja, P2 = 2% ribljeg + 3% lanenog ulja; n.s $P > 0,05$

Znači da hranidbeni tretmani nisu utjecali na oksidativnu stabilnost lipida u žumanjcima što je potvrđeno i statističkom analizom. Do istih rezultata došli su Ao i sur. (2015.) pri obogaćivanju jaja s DHA pomoću mikrolagi. Međutim Hayat i sur. (2010.) ustanovili su povećane TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) vrijednosti u žumanjcima jaja porijeklom od nesilica koje su hranjenje smjesom s lanenim sjemenom. King i sur. (2012.) došli su do iste spoznaje o povećanju TBARS-a (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) uporabom ribljeg ulja u hranidbi nesilica. Kralik i sur. (2014.) navode da je oksidacija lipida kod konvencionalnih i jaja obogaćenih n-3 PUFA bila značajno viša kod jaja koja su čuvana 28 dana na 4°C u usporedbi sa svježim jajima ($P < 0,05$). Iako mi nismo utvrdili značajne razlike u rezultatima oksidacije lipida u žumanjcima ispitivanih skupina, možemo primjetiti da su i naši rezultati pokazali povećanje TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) vrijednosti kod jaja čuvanih 14 odnosno 28 dana u hladnjaku u odnosu na svježe analizirana jaja.

Oksidacija lipida je biokemijski proces u kojem slobodni radikali preuzimaju elektrone iz masnih kiselina u staničnim membranama pri čemu ih oštećuju. U nedostatku antioksidansa razvija se lančana lipidna oksidacija (faze: inicijacije, propagacije i terminacije). Sprječavanje ove pojave postiže se pomoću djelovanja antioksidansa u fazi inicijacije (Štefan i sur. 2007.; Adams, 1999.). Lipidna oksidacija predstavlja veliki problem u prehrambenoj industriji i proizvodnji hrane koja sadrže lipide i vitamine topive u mastima u smislu roka uporabe i nutritivne vrijednosti takvih proizvoda (Ahmed i sur., 2016.). Nutritivna vrijednost narušava se smanjenjem sadržaja visokovrijednih polinezasićenih masnih kiselina (Böttcher i sur., 2015.), a nastali produkti lipidne oksidacije smatraju se štetnim po ljudsko zdravlje zbog izraženih mutagenih, kancergenih i citotoksičnih svojstava (Keller i sur., 2015.).

Pretpostavlja se da je vitamin E iz premiksa u smjesama djelovao antioksidativno, te razlike u TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) vrijednostima nisu bile statističke značajne ($P > 0,05$) kod čuvanih u odnosu na svježja jaja.

5.8. Klinička ispitivanja na ispitanicima

5.8.1. Profil n-3 PUFA u krvi ispitanika

U Tablici 25. prikazani su profili masnih kiselina u serumu osoba koje su konzumirale konvencionalna jaja (K skupina) i jaja obogaćena s n-3 PUFA (P skupina). Ustanovljena je značajna razlika u sadržaju palmitinske kiseline (C16:0; $P=0,031$) kao i u ukupnim zasićenim masnim kiselinama (Σ SFA, $P=0,041$). Razlika u Σ MUFA u serumu između skupina ispitanika nije bila značajna ($P=0,130$).

Tablica 25. Učinak konzumacije konvencionalnih jaja (K skupina) i konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA (P1 skupina) na profil masnih kiselina u serumu

Masna kiselina	K	P1	P vrijednost
Miristinska, C14:0	29,72±8,75	38,63±10,25	0,136
Palmitinska, C16:0	796,23±145,7 ^a	533,93±210,8 ^b	0,031
Stearinska, C:18:0	219,34±33,89	157,10±69,39	0,076
Σ SFA	1045,31±181,4^a	729,68±275,9^b	0,041
Palmitoleinska, C16:1	57,81±23,4	46,67±18,1	0,379
Oktadekanska, C18:1	534,54±121,2	377,98±190,5	0,120
Σ MUFA	592,26±139,8	424,65±206,1	0,130
Linolna, C18:2 n-6	1013,21±101,3	869,22±322,3	0,321
γ -linolenska, C18:3 n-6	18,91±4,0	16,96±4,8	0,487
Eikosadienska, C20:2	7,21±0,5	7,93±0,4	0,324
Dihomogamalinolenska, C20:3n-6	50,44±12,3 ^a	30,94±9,67 ^b	0,012
Arahidonska, C20:4 n-6	359,49±79,1 ^a	234,32±94,2 ^b	0,031
Σ n-6 PUFA	1449,26±155,1	1159,37±427,7	0,142
α -linolenska, C18:3 n-3	10,39±2,3 ^b	16,18±3,1 ^a	0,010
Eikozapentaenska, C20:5 n-3	10,11±2,0	12,49±3,4	0,264
Dokhozaheksaenska, C22:6 n-3	44,94±10,7	43,28±19,45	0,858
Σ n-3 PUFA	65,44±14,3	71,95±29,4	0,861

K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja

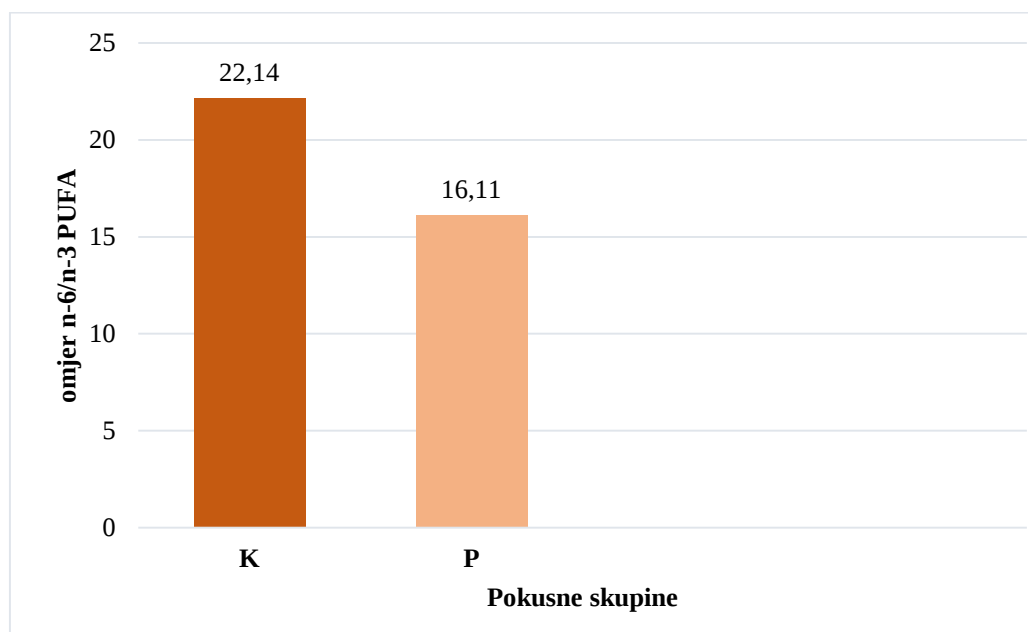
Prosječne vrijednosti u redovima označeni različitim slovima ^{a,b} su statistički značajno različiti na razini $P<0,05$

Utvrđena je značajna razlika u sadržaju dihomogamalinolenske kiseline (C20:3, n-6; $P=0,012$) i arahidonske kiseline (C20:4, n-6; $P=0,031$). Serum ispitanika K skupine sadržavao je više Σ n-6 PUFA ($P>0,142$) od seruma ispitanika P skupine. Komparirajući sadržaje masnih kiselina unutar n-3 PUFA utvrđena je značajna razlika između skupina ispitanika samo u sadržaju ALA

($P=0,010$). Iako su ispitanici P1 skupine u serumu imali veći sadržaj $\sum$ n-3 PUFA od ispitanika K skupine (71,95:65,44), razlika nije bila značajna ($P=0,861$).

Osim apsolutnih vrijednosti sadržaja ALA, EPA i DHA kao i $\sum$ n-3 PUFA s nutricionističkog stanovišta, važan je omjer $\sum$ n-6 PUFA/ $\sum$ n-3 PUFA koji u našem istraživanju iznosi 22,44:1 kod K skupine, a smanjen je na 16,11:1 kod P skupine ispitanika. Smanjenje navedenog omjera od 27% smatra se posljedicom povoljnog djelovanja konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja. Pregledom dosadašnjih istraživanja o utjecaju konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja i profila masnih kiselina u serumu ispitanika u našem istraživanju vidljivo je kako se dnevnom konzumacijom 3 jaja obogaćena s n-3 PUFA, razreda L tijekom 21 dana, može postići poboljšanje profila masnih kiselina u krvi kod mladih zdravih osoba (1056 mg n-3 PUFA/dan). Stupin i sur. (2020.) su ustanovili pri konzumaciji 3 regularna jaja (249 mg n-3 PUFA/ dan) i 3 n-3 PUFA jaja (1053 mg n-3 PUFA/dan) kroz 3 tjedna mogu postići promjene u koncentraciji masnih kiselina u krvnom serumu kod pokusne ($n=21$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($n=19$). Skupina ispitanika koja je konzumirala n-3 PUFA jaja sadržavala je značajno manje palmitinske, stearinske, dihomolinolenske masne kiseline ($P<0,05$) u krvnom serumu u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Analiza koncentracije n-3 PUFA pokazala je povećanje ALA, EPA i DHA kod ispitanika prije i poslije konzumacije (ALA= 11,9:19,3; EPA=10,4:16,0 i DHA=33,7:52,8 $\mu\text{mol/litri}$). Stupin i sur. (2018.) su zaključili da je u njihovom istraživanju kao rezultat konzumacije n-3 PUFA jaja, smanjen omjer n-6 PUFA/n-3 PUFA za 30% u krvnom serumu. Njihovo istraživanje sukladno je našem jer smo također ostvarili smanjenje omjera n-6 PUFA/n-3 PUFA u P1 skupini ispitanika. S našim rezultatima sukladna su zapažanja u istraživanju Kolar i sur. (2021.) koji su uočili smanjenje omjera n-6/n-3 PUFA kod skupine ispitanika koja je konzumirala n-3 PUFA jaja na kraju perioda konzumacije u odnosu na početak pokusa. Navedeni autori ističu da je pokusna n-3 PUFA skupina ispitanika unosila dnevne količine n-3 PUFA putem obogaćenih jaja približno iste kao u našem istraživanju (1053 mg n-3 PUFA/dan). Također u svom istraživanju navode kako je utvrđeno statistički značajno povećanje ALA i DHA u serumu ispitanika koji su konzumirali n-3 PUFA jaja na kraju pokusa dok razlike između skupina nisu bile statistički značajne. Isto tako nije utvrđena statistički značajna razlika u profilu masnih kiselina u serumu ispitanika između skupina, osim u ostvarenim nižim razinama arahidonske kiseline (AA, C20:4, n-6) kod n-3 PUFA skupine u odnosu na kontrolnu. Mihalj i sur. (2020.) su ustanovili pri konzumaciji n-3 PUFA jaja (pokusna skupina) povećanje oleinske kao i ALA i DHA u krvnom serumu u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (0,08:0,00, 1,09:0,91; $P>0,05$).

Pojedina istraživanja utvrdila su povezanost učestalosti kardiovaskularnih bolesti i smanjenog udjela n-3 PUFA u serumu pri čemu je utvrđena snažna korelacija između smanjenog udjela EPA i AA (EPA/AA) u serumu i pojave akutnog koronarnog simptoma te visoke prevalencije kompleksnih koronarnih lezija (Amano i sur., 2011., Hayakawa i sur., 2012., Hara i sur., 2013.) Međutim zapadni način prehrane obiluje s n-6 PUFA i deficitiran je u sadržaju n-3 PUFA (Keten, 2019.).



K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja; n.s. $P>0,05$

Grafikon 9. Omjer n-6/n-3 PUFA u krvnom serumu ispitanika

Omjer antiinflamatornih n-3 PUFA (EPA i DHA) i proinflamatorne n-6 PUFA (AA) u serumu može se koristiti kao marker kardiovaskularnih događaja s potencijalnim djelovanjem na smanjenje upale kod pacijenata s kardiovaskularnim bolestima. Niski omjeri EPA/AA i DHA/AA u serumu mogu se potencijalno koristiti za identifikaciju pacijenata kojima je potreban dodatak n-3 PUFA (Takahashi i sur., 2017.). Svakodnevna konzumacija funkcionalnih proizvoda može doprinijeti prevenciji nastanka kardiovaskularnih bolesti kod zdravih osoba. Djuricic i Calder (2021.) navode kako su upravo nezarazne bolesti koje uključuju kardiovaskularne bolesti, rak, neinfektivne respiratorne bolesti i metaboličke bolesti najveći uzrok smrtnosti u svijetu, a najznačajniji prepoznati rizici od nastanka istih su oksidativni stres i upala.

Veliko kliničko ispitivanje JELIS (Japanska EPA intervencijska studija lipida) provedeno u Japanu ispitalo je utjecaj EPA na kardiovaskularne događaje pri čemu je utvrđeno značajno smanjenje kardiovaskularnih događaja kao i nefatalnih ishoda kod grupe ispitanika koja je konzumirala suplemente n-3 PUFA a koja se povezuju s utvrđenim visokim koncentracijama EPA u serumu ispitanika kao i visokim EPA/AA udjelom (Yokoyama i sur., 2007.).

Vrlo niske razine n-3 PUFA u krvi (omega-3 indeks $< 4\%$) primijećene su diljem Sjeverne Amerike, Srednje i Južne Amerike, Europe, Bliskog Istoka, Jugoistočne Azije, i Afrike. Optimalne razine n-3 PUFA u krvi (omega-3 indeks $\geq 8\%$) uočene su u Japanu i Skandinaviji u područjima s autohtonim stanovništvom koje nije u potpunosti prilagođeno zapadnjačkim prehranbenim navikama. Međutim, nekoliko istraživačkih studija provedenih u Japanu utvrdilo je učestalost pojave kardiovaskularnih bolesti kod mladih i osoba srednje životne dobi koji žive u urbanim područjima Japana, a koja se dovodi u korelaciju s trendom zapadnjačkog načina prehrane i pojačanog unosa nezdravih masnoća uz istovremeni sjedalački način života. S tim u vezi Yanagisawa i sur. (2010.) proveli su ispitivanje utjecaja dodatka PUFA na razine u serumu i crvenim krvnim zrnima. Naime, dijetetski unos n-3 PUFA direktno se reflektira na sadržaj n-3 PUFA u serumu tijekom relativno kratkog vremenskog perioda, dok primjerice sadržaj PUFA u eritrocitima može poslužiti kao dugoročni biljeg unosa n-3 PUFA u organizam budući da je promet ovih krvnih stanica sporiji u odnosu na promet serumskih lipida. Autori zaključuju kako je nužno poticati konzumaciju n-3 PUFA obogaćenih proizvoda u prehrani stanovnika kako bi se smanjili rizici od nastanka kardiovaskularnih bolesti kod mlađe populacije.

5.8.2. Biokemijski pokazatelji krvi ispitanika

U Tablici 26. prikazane su opće karakteristike ispitanika u istraživanju utjecaja konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja na zdravlje mlade populacije. U istraživanju su sudjelovali muškarci i žene u prosjeku stari 21 godinu. U istraživanju je sudjelovalo 20 ispitanika, od čega ih je u svakoj grupi K i P1 bilo po 10, pola ih je bilo muškog, a pola ženskog spola. U kontrolnoj skupini tjelesna masa muškaraca iznosila je u prosjeku 83,00 kg, a žena 65,75 kg, dok je u pokusnoj skupini tjelesna masa muškaraca u prosjeku bila 82,40 kg a žena 56,60 kg. Vrijednosti BMI (Body Mass Index) bile su ujednačene i kod muškaraca su iznosile 23,76 kg/m² (K) odnosno 24,25 kg/m² (P1), a kod žena 22,06 kg/m² (K) i 21,27kg/m² (P1). Omjer struka i bokova (WHR; Waist To Hip ratio) nešto je veći kod muškaraca (K=0,85 i P1=0,81) nego kod žena (K=0,78 i P1=0,79).

Tablica 26. Opće karakteristike ispitivane populacije na početku istraživanja

Pokazatelji	Skupine ispitanika			
	K		P1	
n	10		10	
Spol, M/Ž	5/5		5/5	
Godine	21±1		21±1	
	M	Ž	M	Ž
Tjelesna masa	83,00±6,7	65,75±10,0	82,40±6,2	56,60±6,5
BMI kg/m ²	23,76±1,5	22,06±1,6	24,25±0,91	21,27±1,8
WHR	0,85±0,04	0,78±0,02	0,81±0,04	0,79±0,04

$\bar{x}$ =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija

M=muškarci; Ž=žene; BMI=indeks tjelesne mase; WHR=omjer struka i bokova

Kvalitetna, uravnotežena i optimalna prehrana, uz svakodnevnu fizičku aktivnost doprinosi zdravlju i normalnom razvoju organizma. S druge strane neuravnotežena prehrana, siromašna hranjivim tvarima popraćena slabom fizičkom aktivnošću i štetnim navikama, može dovesti do većeg rizika od razvoja niza kroničnih bolesti poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i raka (Ma i sur. 2009.). Iako je zdravlje pojedinca određeno nizom značajki kao što su biološki (genetski) aspekt, ponašanje, sociokulturni i okolišni utjecaji, prehrana predstavlja važnu determinatnu zdravlja i općeg stanja čovjeka (Simopoulos, 2001.). Viši indeks tjelesne mase ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) i problemi s težinom u mladosti, obično su povezani s neuravnoteženom i lošom prehranom, te slabom tjelesnom aktivnošću. Procjenjuje se da na temelju indeksa tjelesne mase (BMI), 1,5 mlrd ljudi u svijetu ima prekomjernu tjelesnu težinu ($\text{BMI} \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$) dok je 500 milijuna klasificiranom kao pretilo ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (Simopoulos i DiNicolantonio, 2016.).

Ispitanici u našem istraživanju imali su dobar BMI (Body Mass Index) koji se kretao u rasponu od 21,27 do 24,25 kg/m^2 . BMI naših ispitanika bio je manje od 25 kg/m^2 što se smatra gornjom granicom za normalno razvijenu mladu osobu. Povišeni BMI (Body Mass Index) kod djece i mladeži, vjerojatno će uzrokovati hipertenziju i druge kardiovaskularne probleme što će posljedično biti uzrok smanjene kvalitete života u starijoj dobi (Wade i sur. 2018.). Lupi i sur. (2015.) u svom istraživanju koje se bavilo procjenom načina života i prehrambenih navika studentske populacije u Italiji, uvidjeli su promjene u prehrambenim navikama mladih odraslih osoba koje žive izvan obitelji. Upravo radi toga kvalitetna prehrana mora biti navika svakog

pojedince još od najranije vrtićke dobi, jer će na taj način mladi čovjek kada se osamostali i dalje kupovati i konzumirati kvalitetne namirnice.

Nekoliko provedenih meta-analiza ispitalo je utjecaj n-3 PUFA na razine krvnog tlaka pri čemu je u pojedinim istraživanjima utvrđeno kako n-3 PUFA može doprinjeti smanjenju krvnog tlaka (Campbell i sur., 2013.; Miller i sur., 2014.). U provedenim randomiziranim kontroliranim ispitivanjima n-3 PUFA je najčešće konzumirana u vidu suplemenata. S obzirom na različite rezultate provedenih studija, uloga n-3 PUFA kod hipertenzije još uvijek je predmet znanstvene rasprave. Općenito, arterijski krvni tlak predstavlja pritisak krvi na stijenku arterije, a mjerenjem krvnog tlaka određuju se dvije vrijednosti: sistolički i dijastolički krvni tlak. Prva vrijednost (SBP, Systolic Blood Pressure) pokazuje koliki je pritisak krvi na stijenke arterije kada srce kuca dok druga vrijednost (DBP, Diastolic Blood Pressure) iskazuje pritisak krvi na stijenke arterija dok se srce odmara između dva otkucaja. Vrijednosti krvnog tlaka manje od 120/80 mm Hg smatraju se normalnim. Američko udruženje za srce (AHA) i Europsko kardiološko društvo (ESC) navode kako se povećani krvni tlak očituje kod osoba kod koji se vrijednosti sistoličkog krvnog tlaka kreću od 120 do 129 mm Hg, a dijastoličkog manje od 80 mm Hg, dok se kod kronično povišenog arterijskog krvnog tlaka (hipertenzija) očituje trajno povišen sistolički tlak iznad 140 mmHg i/ili dijastolički iznad 90 mmHg. Povišene razine arterijskog krvnog tlaka mogu doprinjeti nastanku srčanog i moždanog udara, aritmiji i uzrokovati preranu smrt (Oras i sur., 2020.; Fuchs i sur., 2020.). Ukoliko osobe koje imaju povećani krvni tlak ne kontroliraju stanje vjerojatno će razviti kroničnu bolest hipertenziju zbog čega se preporučuje prevencija koja podrazumijeva zdravu i optimalnu prehranu, redovno vježbanje i ograničenu konzumaciju alkohola i soli (Dickinson, 2006.).

U Tablici 27. prikazani su podaci krvnog tlaka ispitivanog uzorka. Iz podataka u tablici je vidljivo da su razine krvnog tlaka kod ispitanika obje skupine (K i P1) bile u optimalnim vrijednosnim granicama (<120/80 mm Hg) što odgovara profilu ispitanika, budući da je ispitivanje provedeno na mladim zdravim osobama. Rezultati istraživanja nisu utvrdili statistički značajne razlike u vrijednostima krvnog tlaka između ispitanika koji su konzumirali konvencionala odnosno n-3 PUFA jaja. Također nisu utvrđene značajne razlike u vrijednostima krvnog tlaka prije pokusa i na kraju pokusnog razdoblja od tri tjedna konzumacije 3 kuhana jaja dnevno unutar i između skupina.

Tablica 27. Arterijski krvni tlak ispitivanog uzorka ($\bar{x} \pm sd$)

Skupina/ Pokazatelji	K		P vrijednost	P1		P vrijednost
	Početak	Kraj		Početak	Kraj	
n	10			10		
SBP, mmHg	104,2±16,7	104,8±13,4	0,927	108,1±11,2	106,6±12,1	0,785
DBP, mmHg	68,2±11,4	67,6±4,3	0,873	73,4±6,6	73,7±6,7	0,917
MAP, mmHg	80,2±11,7	80,0±6,5	0,961	85,0±5,8	85,1±6,2	0,965

$\bar{x}$ =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija

SBP - eng. „systolic blood pressure“, sistolički krvni tlak; DBP - eng. „diastolic blood pressure“, dijastolički krvni tlak; MAP- eng. „mean arterial pressure“, srednji arterijski tlak

Početak=početak istraživanja utjecaja konzumacije jaja na različite zdravstvene pokazatelje

Kraj=kraj istraživanja u kojemu je svaki volonter konzumirao dnevno 3 kuhana jaja L razreda kroz tri tjedna

Naši rezultati u skladu su sa rezultatima istraživanja koje su na mladim i zdravim osobama proveli Stupin i sur. (2020.) koji nisu ustanovili statistički značajne razlike u izmjenjenim vrijednostima SBP (Systolic Blood Pressure; mm Hg), DBP (Diastolic Blood Pressure; mm Hg) i MAP (Mean Arterial Pressure; mm Hg) između kontrolne skupine koja je konzumirala konvencionala jaja i unosila 249 mg n-3 PUFAs/dan i skupine ispitanika koja je konzumirala n-3 PUFA obogaćena jaja (1053 mg n-3 PUFA/dan), osim u vrijednostima sistoličkog tlaka u kontrolnoj skupini gdje je uočeno statistički značajno smanjenje SBP na kraju pokusnog razdoblja u odnosu na početak ($P < 0,05$). Iste rezultate potvrdili su Mihalj i sur. (2020.) u svom istraživanju također na mladim, zdravim osobama pri čemu su ostvarene slične vrijednosti arterijskog krvnog tlaka na početku i na kraju istraživanja u obje skupine koje su konzumirale dva jaja dnevno kroz tri tjedna (kontrolna skupina- 75 mg n-3 PUFA/dan; n-3 PUFA skupina- 470 mg n-3 PUFA/dan). Također nije utvrđena statistički značajna razlika u izmjenjenim vrijednostima SBP, DBP i MAP između skupina. Međutim, rezultati istraživanja (Stupin i sur., 2018.) o utjecaju konzumacije n-3 PUFA jaja na arterijski krvni tlak u kojem su mladi, zdravi ispitanici unosili n-3 PUFA dnevno u količinama manjim u odnosu na naše istraživanje (777 mg n-3 PUFA/dan) utvrdili su statistički značajno smanjenje krvnog tlaka (SBP, DBP, MAP mm Hg; $P < 0,05$) na kraju pokusa u skupini ispitanika koja je konzumirala n-3 PUFA jaja u odnosu na početak pokusa, dok razlike u vrijednostima arterijskog krvnog tlaka između skupina nisu utvrđene (K i P1). Smanjene razine arterijskog krvnog tlaka konzumacijom n-3 PUFA

obogaćenih jaja također je utvrdilo više studija koje su provedene na ispitanicima koji boluju od različitih bolesti.

Minihane i sur. (2016.) su istraživali konzumaciju 700 mg n-3 PUFA/dan kod pacijenata s visokim tlakom. Nakon tri tjedna konzumacije smanjen je arterijski krvni tlak na normalnu razinu. Clark i sur. (2016.) nisu polučili smanjenje krvnog tlaka nakon povećane konzumacije n-3 PUFA. Klinička studija koju su proveli Stanton i sur. (2020.) ispitala je učinke konzumacije n- PUFA obogaćenih proizvoda (mesa i jaja) na razine krvnog tlaka i otkucaje srca. Konzumacija n-3 PUFA jaja i mesa rezultirala je klinički značajnim smanjenjem dijastoličkog krvnog tlaka i srčanih otkucaja koji su potencijalni biomarkeri kardiovaskularnog zdravlja. U istraživanju su također kvantificirani učinci redovne konzumacije n-3 PUFA jaja i mesa na razine DHA i EPA u plazmi i tkivu (eritrocita ili membrana crvenih krvnih stanica). Značajno ($P<0,05$) smanjenje krvnog tlaka za 8,34/8,67 mm/Hg i razine inzulina konzumacijom n-3 PUFA jaja utvrđeni su u istraživanju Shakoor i sur. (2020.). Konzumacijom dva n-3 PUFA jaja dnevno smanjeni su dijastolički i sistolički tlakovi za 13,6%, odnosno 6% kod ispitanika sa metaboličkim sindromom. Također je utvrđeno kako n-3 PUFA jaja značajno poboljšavaju razinu glukoze i inzulina za 4%, odnosno 14% što ukazuje na poboljšanje inzulinske osjetljivosti.

Osim ispitivanja antropometričkih i hemodinamičkih parametara kod ispitanika su istraživani i biokemijski pokazatelji.

U Tablici 28. prikazane su referentne vrijednosti biokemijskih pokazatelja koji su promatrani u našem istraživanju.

Tablica 28. Referentne vrijednosti biokemijskih pokazatelja (DZZŽ, Ispostava Samobor, 2016.; Kattula i sur., 2017.)

Pokazatelj	Referentni intervali (odrasli)
Leukociti (10 ⁹ /L)	3,4 – 9,7 (M i Ž ≥ 20 god.)
Eritrociti (10 ¹² /L)	4,34 – 5,72 (M ≥ 20. god.), 3,86 – 5,08 (Ž ≥ 20. god.)
Hemoglobin g/L	138 – 175 (M ≥ 20. god), 119 – 157 (Ž ≥ 20 god.)
Hematokrit (L/L)	0,415 – 0,530 (M ≥ 20 god.), 0,356 – 0,470 (Ž ≥ 20 god.)
MCV (fl)	83,0 – 97,2 (M i Ž ≥ 20 god)
MCH (pg)	27,4- 33,9 (M i Ž ≥ 20 god)
MCHC (g/L)	320 – 345 (M i Ž ≥ 20 god)
RDW-CV (%)	9,0 – 15,0 (M i Ž ≥ 20 god)
Trombociti (10 ⁹ /L)	158 – 424 (M i Ž ≥ 20 god)
MPv (fl)	6,8 – 10,4 (M i Ž ≥ 20 god)
Sedimentacija eritrocita (mm/3,6 KS)	2-13 (M 20-50 god.), 4-24 (Ž 20-50 god.)
Fibrinogen (g/L)	2-5 mg/ml
Glukoza (mmol/L)	4,2 - 6,0 (M,Ž 20-30 g.); 4,4 - 6,4 (M,Ž >30 g.)
Urea (mmol/L)	2,8-8,3
Kreatinin (μmol/L)	79-125 (M ≥ 20. god), 63-107 (Ž ≥ 20 god.)
Urati (μmol/L)	182 – 403 (M ≥ 20. god), 134 -337 (Ž ≥ 20. god)
hsCRP (mg/L)	< 5,0
Željezo ((μmol/L)	11 – 32 (M ≥ 20 god.), 8-30 (Ž ≥ 20 god.)
Transferin (g/l)	2,00 – 3,60
Kolesterol (mmol/L)	<5,0
Trigliceridi (mmol/L)	<1,7
HDL-kolesterol (mmol/L)	>1,0 Ž; >1,2 M
LDL-kolesterol ((μmol/L)	< 3,0

MCV-prosječni volumen eritrocita, MCH – prosječna količina hemoglobina u eritrocitima, MCHC- prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima, MPv- prosječni volumen trombocita, RDW-CV – raspodjela eritrocita po volumen, hsCRP- C-reaktivni protein

U Tablici 29. prikazani su biokemijski pokazatelji krvi kontrolne skupine ispitanika (K, n=10) koji su konzumirali jaja konvencionalnog sastava i pokusne skupine (P, n=10) koja je konzumirala jaja obogaćena s n-3 PUFA. Rezultati se odnose na biokemijske pokazatelje prije i poslije konzumiranja jaja.

Leukociti, eritrociti, hemoglobin, hematocrit, MCV (Mean Corpuscular Volume), MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), RDW-CV (Red blood cell Distribution Width) i MPV (Mean Platelet Volume) nalaze se u normalnim granicama kod svih skupina ispitanika. Razina hsCRP (High Sensitivity C-Reactive Protein) bila je niža kod ispitanika koji su konzumirali n-3 PUFA jaja (1,34 mg/L) u odnosu na ispitanike koji su konzumirali konvencionalna jaja (3,4 mg/L). Ustanovljeno je također da je razina željeza bila veća kod P u odnosu na K skupinu nakon završetka protokola (20,55:13,00) iako se obje vrijednosti nalaze u referentnim granicama. Razine kolesterola, triglicerida, HDL kolesterola kao i LDL kolesterola kod svih skupina ispitanika nalaze se u regularnim granicama. Ovi rezultati u skladu su sa navodima Stupin i sur. (2018.), Stupin i sur. (2020.), Kolobarić i sur. (2021.) te Breškić-Ćurić i sur. (2021.).

Kako bi se egzaktnije odredila povezanost između unosa funkcionalnih proizvoda i zdravstvenog ishoda, nutricionistička istraživanja preporučuju identifikaciju potencijalnih biomarkera putem kliničkih ispitivanja pri čemu se najčešće promatra krvna slika (plazma ili serum) ispitanika (Münger i sur., 2018.). Znanstvenici su zaključili da se smanjenje pojave kardiovaskularnih bolesti dovodi u vezu s povećanim sadržajem EPA i DHA u prehrani. Mehanizam djelovanja n-3 PUFA u prevenciji kardiovaskularnih bolesti povezuje se sa smanjenjem rizika od nastanka ateroskleroze, atrijskih i ventrikularnih aritmija, hiperlipidemije, bolesti perifernih arterija i moždanog udara (Yagi i sur., 2017.; Kaur i sur., 2014.).

Tablica 29. Učinak konzumacije konvencionalnih (K) i jaja obogaćenih n-3 PUFA (P1) na biokemijske pokazatelje u krvi ispitanika ($\bar{x} \pm sd$)

Pokazatelj	K		P1	
	Prije	Poslije	Prije	Poslije
Leukociti ($10^9/L$)	7,02 $\pm$ 1,32	7,40 $\pm$ 2,71	7,34 $\pm$ 2,32	7,23 $\pm$ 0,99
Eritrociti ($10^{12}/L$)	4,77 $\pm$ 0,34	4,85 $\pm$ 0,39	4,85 $\pm$ 0,48	4,81 $\pm$ 0,50
Hemoglobin g/L	142,56 $\pm$ 14,21	143,78 $\pm$ 15,42	144,90 $\pm$ 14,12	143,70 $\pm$ 14,82
Hematokrit (L/L)	0,40 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,04
MCV (fl)	83,32 $\pm$ 2,61	83,57 $\pm$ 3,60	85,46 $\pm$ 1,80	83,87 $\pm$ 2,51*
MCH (pg)	29,89 $\pm$ 1,67	29,59 $\pm$ 1,45	29,96 $\pm$ 0,69	29,92 $\pm$ 0,78
MCHC (g/L)	358,56 $\pm$ 14,16	354,44 $\pm$ 6,97	349,60 $\pm$ 5,70	356,70 $\pm$ 2,79*
RDW-CV (%)	12,93 $\pm$ 0,91	12,78 $\pm$ 0,68	12,67 $\pm$ 0,45	12,72 $\pm$ 0,42
Trombociti ($10^9/L$)	269,11 $\pm$ 62,30	268,70 $\pm$ 57,90	251,62 $\pm$ 62,69	245,70 $\pm$ 54,29
MPV (fl)	8,32 $\pm$ 1,46	8,68 $\pm$ 1,73	10,45 $\pm$ 1,03	8,30 $\pm$ 1,11*
Sedimentacija eritrocita (mm/3,6 KS)	8,67 $\pm$ 8,63	9,67 $\pm$ 10,14	7,20 $\pm$ 4,44	5,80 $\pm$ 4,10
Fibrinogen (g/L)	3,01 $\pm$ 0,75	3,01 $\pm$ 0,62	2,98 $\pm$ 0,74	2,65 $\pm$ 0,59
Glukoza (mmol/L)	4,99 $\pm$ 0,37	4,86 $\pm$ 0,28	4,96 $\pm$ 0,69	4,93 $\pm$ 0,69
Urea (mmol/L)	4,74 $\pm$ 1,78	5,10 $\pm$ 1,60	5,68 $\pm$ 1,33	5,25 $\pm$ 1,23
Kreatinin (μ mol/L)	79,22 $\pm$ 17,29	77,11 $\pm$ 16,10	80,10 $\pm$ 19,34	76,80 $\pm$ 17,31
Urati (μ mol/L)	305,56 $\pm$ 85,16	278,67 $\pm$ 59,17	329,6 $\pm$ 75,98	302,20 $\pm$ 76,10*
hsCRP (mg/L)	3,28 $\pm$ 3,33	3,40 $\pm$ 4,29	2,15 $\pm$ 2,24	1,34 $\pm$ 1,02
Željezo (μ mol/L)	15,02 $\pm$ 5,42	13,00 $\pm$ 6,78	17,14 $\pm$ 8,45	20,55 $\pm$ 7,07
Transferin (g/l)	2,59 $\pm$ 0,43	2,68 $\pm$ 0,10	2,59 $\pm$ 0,44	2,66 $\pm$ 0,48
Kolesterol (mmol/L)	4,80 $\pm$ 0,87	4,63 $\pm$ 0,68	5,10 $\pm$ 0,69	5,24 $\pm$ 0,86
Trigliceridi (mmol/L)	0,96 $\pm$ 0,35	0,97 $\pm$ 0,39	0,91 $\pm$ 0,30	0,88 $\pm$ 0,25
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,53 $\pm$ 0,38	1,48 $\pm$ 0,43	1,43 $\pm$ 0,31	1,45 $\pm$ 0,36
LDL-kolesterol (μ mol/L)	2,80 $\pm$ 0,60	2,69 $\pm$ 0,59	3,14 $\pm$ 0,54	3,13 $\pm$ 0,62
HDL-C/kolesterol (%)	32,56 $\pm$ 9,49	32,11 $\pm$ 9,66	28,30 $\pm$ 5,77	28,10 $\pm$ 7,36

$\bar{x}$ =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; K=5% sojinog ulja; P1=1,5% ribljeg ulja + 3,5% lanenog ulja; * označava statistički značajnu razliku između početka i kraja tretmana u skupini K ili P1 na razini P<0,05. MVC=prosječni volumen eritrocita; MCH=prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitu; MCHC=prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu; RDW-CV=prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu; MPV – prosječni volumen trombocita; hsCRP=C-reaktivni protein

PUFA imaju ulogu u regulaciji genske ekspresije proteina povezanih s metabolizmom lipida pri čemu PUFA imaju izraženu ulogu u smanjenju triglicerida dok je utjecaj n-3 PUFA na smanjenje LDL kolesterola u plazmi neznatan i pripisuje se istiskivanjem zasićenih masnih kiselina iz prehrane primjenom n-3 PUFA suplementata ili obogaćenih proizvoda (Zuliani i sur., 2009.; Mori, 2014.; Yagi i sur., 2017.). Većina egzogenog kolesterola i kolesterol estera u krvi se prenosi putem LDL-a, a razine LDL-a u krvi mogu poslužiti za mjerenje unosa kolesterola u organizam (Münger i sur., 2018.). Prehrambeni kolesterol čini u prosjeku jednu trećinu ukupnog tjelesnog kolesterola dok ostatak čini kolesterol koji se sintetizira u organizmu (Kapourchali i sur., 2016.). Razine kolesterola u krvi smatraju se važnim čimbenikom kardiovaskularnog rizika kod ljudi. Kolesterol sudjeluje u izgradnji staničnih membrana, sintezi spolnih hormona kao i hormona nadbubrežne žlijezde i vitamina D, a prekursor je žučnih kiselina. LDL kolesterol (lipoproteini male gustoće) prenose kolesterol iz jetre u stanice, a višak se taloži na stjenkama arterija stvarajući plak koji može izazvati začepljenje krvnih žila. HDL kolesterol (lipoproteini velike gustoće) sakupljaju višak kolesterola iz krvi i tkiva i prenose ga u jetru. Time se smanjuje rizik razvoja kardiovaskularnih bolesti (Attia i sur., 2015.)

Potencijalni mehanizmi djelovanja n-3 PUFA uključuju: utjecaj na gensku ekspresiju proteina koji vežu regulatorne elemente sterola (SREBP-1) što dovodi do smanjenja lipogeneze i sekrecije VLDL-a, pojačan jetreni klirens lipoproteina kroz povećanje ekspresija lipoprotein lipaze (LPL), smanjenje razine apoC-III i povećan povratni transport kolesterola (Balić i sur., 2020.; Fernandez i West, 2005.). Na smanjenu sintezu VLDL i LDL kolesterola u jetri utjecaj imaju smanjene koncentracije triglicerida u cirkulaciji posredstvom n-3 PUFA (Buckley i sur. 2004.). Nedavno objavljeno zajedničko smjernice Američkog društva kardiologa (ACC) i Američkog udruženja za srce (AHA) kao rizike od nastanka aterosklerotske kardiovaskularne bolesti uključuju trajno povišene razine triglicerida (>175 mg/dL) (Arnett i sur., 2019., Van Dael, 2021.).

Rezultati našeg istraživanja nisu utvrdili značajne razlike u lipidnom profilu u serumu ispitanika unosom n-3 PUFA obogaćenih jaja što je u suglasnosti s dosadašnjim istraživanjima koja upućuju na to da EPA i DHA imaju utjecaj na smanjenje triglicerida (9-26%) ukoliko se unose funkcionalnim proizvodima u velikim dozama (>4 g/dan) (Leslie i sur., 2015.). Bovet i sur. (2007.) su ustanovili da konzumacija pet n-3 PUFA obogaćenih kokošnjih jaja (241 mg n-3 PUFA/jaje) kroz 3 tjedna značajno smanjuje razinu triglicerida u serumu (16-18%) kod zdravih osoba. Studije koju su izveli Stupin i sur. (2018.), Oh i sur. (1991.) i Burns-Whitmore i sur. (2014.) su također pokazale da konzumacija n-3 PUFA obogaćenih jaja potencijalno može smanjiti trigliceride u serumu zdravih osoba.

Jacobson i sur. (2015.) i Kris-Etherton i sur. (2002.) navode da povećani sadržaji EPA i DHA mogu smanjiti koncentraciju triglicerida što je bio slučaj i u našem istraživanju ($P > 0,05\%$). Kliničke studije i meta-analize kod hiperlipidemičnih individua izvještavaju da dodatak EPA i DHA može smanjiti koncentraciju lipida, uglavnom triglicerida (Zehr i Walker, 2018.).

Stupin i sur. (2018.) su dokazali da konzumacija n-3 PUFA obogaćenih jaja 777 mg n-3 PUFA/dan potiče mikrovaskularnu reaktivnost, a smanjuje trigliceride kao i vrijednost hsCRP (C-reaktivnog proteina) kod mladih zdravih osoba. hsCRP ima funkcionalnu ulogu u upalnom procesu i služi kao akutni marker upale budući da njegova koncentracija raste u cirkulaciji tijekom upalnih procesa (Sproston i Ashworth, 2018.). U istraživanju citiranih autora utvrđeno je statistički značajno smanjenje vrijednosti hsCRP (C-reaktivnog proteina) kod ispitanika koji su konzumirali n-3 PUFA jaja u odnosu na vrijednosti izmjerene prije protokola kao i manje vrijednosti hsCRP kod n-3 PUFA skupine u odnosu na kontrolnu skupinu. Potonje je u suglasnosti s rezultatima našeg istraživanja i dobivene manje vrijednosti ovog antiinflamatornog markera kod n-3 PUFA skupine u odnosu na izmjerene vrijednosti prije protokola te na izmjerene vrijednosti u kontrolnoj skupini.

Antiinflamatorni i antiaritmični učinci n-3 PUFA dokazani su u studijama provedenim na životinjama i na ljudima (Elagizi i sur., 2021.). Prepoznati benefiti konzumacije n-3 PUFA u smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti povezuju se s antiinflamatornim lipidnim medijatorima izvedenim iz PUFA. Primjerice resolvin serije E koji nastaje iz EPA aktivno sudjeluje u smanjenju migracije leukocita do mjesta upale, pospješuje čišćenje upalnih stanica i potiskuje proizvodnju citokina (Serhan, 2014.).

Kolobarić i sur. (2021.) su prikazali studiju o utjecaju dodatka n-3 PUFA (1053 mg/dan) putem jaja na pro i anti-inflamatorne parametre kod zdravih osoba $23,08 \pm 2,57$ godina starosti. Autori su ustanovili različiti utjecaj standardnih jaja ($n=21$; W/M=10/11) i n-3 PUFA obogaćenih jaja ($n=19$; W/M=10/9) pri konzumaciji kroz 21 tjedan na razinu medijatora lipida i funkcionalni kapacitet sekrecije citokina. Rezultati istraživanja pokazali su značajnu ulogu n-3 PUFA pri imunoregulaciji ako se konzumiraju kao funkcionalna hrana.

Antiinflamatorno djelovanje konzumacije n-3 PUFA jaja potvrđeno je u kliničkim istraživanjima Stupin i sur. (2020.). Autori su ispitivali utjecaj konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja u komparaciji s konvencionalnim jajima na biomedicinske pokazatelje u krvi mladih zdravih osoba. Kontrolna skupina ($n=21$) konzumirala je 3 konvencionalna jaja i unijela u organizam 249 miligrama n-3 PUFA/dan kroz 21 dan. Eksperimentalna skupina ispitanika konzumirala je također 3 jaja kroz 21 dan i unijela u organizam 1.053 miligrama n-3 PUFA/dan.

Analize krvi ispitanika pokazale su signifikantno povećanu koncentraciju n-3 PUFA u serumu i smanjenje interferona- γ (proinflamatorno djelovanje) dok je interleucin-10 (protuupalno djelovanje) signifikantno povećan kod mladih ispitanika eksperimentalne skupine u odnosu na ispitanike kontrolne skupine.

n-3 PUFA utječe na smanjenje aritmije inhibicijom sarkolemalnih ionskih kanala što može stabilizirati električnu aktivnost i produljiti relativno refraktorno razdoblje kardiomiocita, dok je produljena refraktornost atriya uočena kod ljudi koji su konzumirali n-3 PUFA suplemente (6 g/dan EPA + DHA tijekom najmanje 1 mjeseca) sa smanjenom ranjivošću na induciranje fibrilacije atriya (Tribulova i sur., 2017.; Kumar i sur., 2011.). Unos n-3 PUFA također poboljšava funkciju endotela povećanjem proizvodnje dušikovog oksida izravnom stimulacijom genske i proteinske ekspresije endotelne sinteze dušikovog oksida. Benefit konzumacije n-3 PUFA jaja u endotelnoj funkciji dokazalo je više autora (Stupin i sur., 2018.; Stupin i sur., 2020.; Kolar i sur., 2021.; Mihalj i sur., 2020.).

Mihalj i sur. (2020.) su istraživali utjecaj konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja kod mladih osoba. Dvadeset ispitanika oba spola konzumirali su dva jaja/dan kroz 3 tjedna tj. 407 mg/dan n-3 PUFA, a druga skupina ispitanika konzumirala je također 2 jaja/dan, kroz 3 tjedna, tj. ukupno 75 mg/dan n-3 PUFA. Rezultati su pokazali signifikantnu razliku u markerima aktivacije leukocita (CD11a/LFA-1) i antioksidativnu zaštitu što se dovodi u vezu s konzumacijom jaja obogaćenih s n-3 PUFA. Odsustvo signifikantnih promjena makrovaskularne reaktivnosti dovodi se u vezu s manjim unosom n-3 PUFA u organizam. Autori smatraju da dnevni unos n-3 PUFA treba iznositi 750 mg/dan.

Istraživanja Fraeye i sur. (2012.), Maki i sur. (2003.) i Lewis i sur. (2000.) su pokazala da konzumacija n-3 PUFA obogaćenih jaja može smanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti. Procjenjuje se da u svijetu milijun ljudi svakodnevno koriste n-3 PUFA nadomjestke (AHA, 2017.).

Naše istraživanje provedeno je na mladim zdravim osobama pri čemu rezultati biokemijskih pokazatelja u krvi ispitanika koji su konzumirali n-3 PUFA jaja ukazuju kako konzumacija ovog funkcionalnog proizvoda doprinosi optimalnoj prehrani i održavanju zdravlja te na taj način prevenira rizik od razvoja bolesti srca i drugih zdravstvenih poremećaja povezanih s kardiovaskularnim bolestima.

Dio dosadašnjih kliničkih ispitivanja konzumacije n-3 PUFA jaja usmjeren je na ispitivanje utjecaja konzumacije obogaćenih jaja na različite zdravstvene biomarkere kod ispitanika s više različitih bolesti kao što su koronarne bolesti i metabolički poremećaji. Rezultati istraživanja

ukazali su kako konzumacija n-3 PUFA jaja može imati povoljno zdravstveno djelovanje i kod ispitanika koji su već razvili akutni ili kronični oblik bolesti, odnosno kojima je zdravlje već narušeno.

Breškić-Ćurić i sur. (2021.) istražili su utjecaj n-3 PUFA obogaćenih jaja na koncentraciju lipida i profil slobodnih masnih kiselina, biomarkere inflamatornog i oksidativnog stresa te mikrovaskularnu aktivnost u pacijenata s koronarnom arterijskom bolesti (CAD; n=40). Od ukupnog broja 20 pacijenata je imalo akutni oblik bolesti (Ac-CAD) i 20 pacijenata imalo je kronični oblik bolesti (Ch-CAD). Kontrolna skupina (n=20) konzumirala je svakodnevno 3 jaja. Unos n-3 PUFA kod eksperimentalnih skupina bio je 1053 miligrama n-3 PUFA/dan, a kod kontrolne 249 miligram/dan. Konzumacija n-3 PUFA jaja utjecala je na profil masnih kiselina i smanjila omjer n-6/n-3 PUFA u krvi ispitanika eksperimentalnih skupina prema poželjnim granicama i postigla umjereno anti-inflamatorno djelovanje kod CAD pacijenata.

Poboljšani profil masnih kiselina konzumacijom n-3 PUFA jaja utvrdili su i Shakoar i sur. (2020.) kod ispitanika s razvijenim metaboličkim sindromom.

U prethodnim znanstvenim istraživanjima dokazano je kako primjena ribljeg ulja u obliku suplemenata može smanjiti razine fibrinogena u plazmi i tako utjecati na modifikaciju nelipidnih faktora rizika od nastanka kardiovaskularnih bolesti (Radack i sur., 1990.; Schmidt i sur., 1990.). U zdravih osoba fibrinogen cirkulira u plazmi u visokim koncentracijama (2-5 mg/ml), a tijekom akutne upale razina fibrinogena u plazmi doseže razine veće od 7 mg/ml (Kattula i sur., 2017.). Fibrinogen je protein akutne faze, razine u plazmi povećavaju se tijekom upalnih procesa te ima važnu ulogu u procesu zgrušavanja krvi. Nakon inicijalne faze formiranje trombocitnog čepa u procesu zaustavljanja krvarenja slijedi koagulacija. Tijekom faze koagulacije dolazi do formiranja trombina koji se pretvara u fibrinogen koji se dalje pretvara u netopljiv fibrin. Fiziološka uloga fibrinogena u homeostazi i trombozi povezuje se sa stabilizacijom trombocitnog čepa ili hemostatskog ugruška. Isti procesi adhezije, agregacije trombocita i koagulacije mogu dovesti do razvoja atrijske tromboze i okluzije (Adili i sur., 2018.; Kattula i sur., 2017.). Ove komponente homeostatskog sustava (trombociti, koagulacijski i fibrinolitički sustav, stijenke krvnih žila i endotel) imaju važnu ulogu u regulaciji funkcije krvožilnog i imunološkog sustava (Golanski i sur., 2021.). Znanstveno su dokazana antiagregacijska i antiinflamatorna svojstva n-3 PUFA. Masne kiseline EPA i DHA ugrađuju se u staničnu membranu i mogu utjecati na njenu fluidnost te zbog ove fiziološke uloge imaju značaj u održavanju homeostaze i stvaranju trombina (Larson i sur. 2013.). U istraživanjima se ispituje utjecaj n-3 PUFA na fibrinolitičke parametre kao što su fibrinogen,

aktivnost inhibitora aktivatora plazminogena (PAI-1) (Vanschoonbeek i sur., 2003.), faktor VIII (FVIII) i Von Willebrandov faktor (vWF; marker oštećenja endotela) (Rietveld i sur., 2019.). U našem istraživanju ispitan je utjecaj konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja na razine fibrinogena u serumu ispitanika. Izmjerene vrijednosti fibrinogena u n-3 PUFA skupini bili su niže u odnosu na kontrolnu skupinu prije i nakon provedenih istraživanja. U skupini ispitanika razine fibrinogena bile su iste prije i nakon pokusa, dok je u n-3 PUFA skupini uočeno smanjenje razine fibrinogena nakon 3 tjedna konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja, iako ono nije bilo statistički značajano. Manda i sur. (2008.) utvrdili su statistički značajno smanjenje razina fibrinogena ($P < 0,001$) i triglicerida ($P = 0,002$) konzumacijom jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama (ALA) kod mladih zdravih ispitanika. Kolar i sur. (2021.) u svom istraživanju utjecaja konzumacije n-3 PUFA obogaćenih jaja na mikrovaskularnu funkciju endotela nisu utvrdili statistički značajne razlike u izmjerenim vrijednostima faktora Von Willebrandova faktora između skupina ispitanika ($n=9$) koja je konzumirala konvencionalna jaja i pri tom unijela 249 mg n-3 PUFA/dan i skupine koja je konzumirala n-3 PUFA obogaćena jaja ($n=14$) i unosila 1.053 mg n-3 PUFA/dan kroz period od tri tjedna. Jaček i sur. (2020.) proveli su kliničko ispitivanje na mladim zdravim osobama muškog spola koji su konzumirali n-3 PUFA obogaćena jaja proizvedena od nesilica hranjenih s dodatkom 1% lanenog ulja pri čemu je ostvareno povećanje udjela ukupnih n-3 PUFA u 100 g jaja sa 110 mg na 190 mg (73%). Autori nisu utvrdili značajne razlike u vrijednostima promatranih hematoloških parametara zgrušavanja krvi (agregacija trombocita izazvana ristocetinom (AgRisto, %), kolagenom (AgCollag, %), ADP-om (AgADP, %), epinefrinom (AgEpi, %) i arahidonskom kiselinom (AgAra, %) kod skupine koja je konzumirala n-3 PUFA jaja u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati kliničkog ispitivanja korelacije konzumacije ribe i vrijednosti fibrinogena, faktora FVIII i vWF provedenog na mladim zdravim ispitanicima koji ne konzumiraju riblje proizvode redovno (CARDIA) nisu utvrdili pozitivan učinak unosa n-3 PUFA na promatrane hemostatske faktore. S druge strane, više provedenih klinički studija utvrdilo je da konzumacija n-3 PUFA suplemenata utječe na smanjenja adhezije trombocita (Li i Steiner, 1991.), inhibira agregaciju trombocita (Gao i sur., 2013.; Andrioli i sur., 1999.). Općenito klinička ispitivanja preporučuju kako unos n-3 PUFA putem nadomjestaka prehrani za povoljan zdravstveni učinak, ne bi trebao biti manji od 4g/dan s minimalnim trajanjem konzumacije nadomjestaka od 6 tjedana (Adili i sur., 2018.; Li i Steiner, 1991.; Andrioli i sur., 1999.; Bhatt i sur., 2020., Souza i sur., 2020.).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja obogaćivanja konzumnih jaja s n-3 PUFA, kvalitete obogaćenih jaja, oksidativnog statusa jaja, organoleptičkih svojstava jaja i biokliničkih ispitivanja s volonterima, mogu se sažeti sljedeći zaključci.

- U istraživanju obogaćivanja konzumnih jaja s n-3 PUFA nesilice su hranjene 28 dana modificiranim krmnim smjesama. Smjese su sadržavale 5% ulja. U sastavu kontrolne krmne smjese korišteno je sojino ulje, a pokusne smjese P1 i P2 sadržavale su kombinaciju ribljeg i lanenog ulja. Sadržaj Σ n-3 PUFA bio je veći u P1 i P2 smjesama (33,86% i 33,59%) u odnosu na kontrolnu smjesu (5,04%). Sukladno sadržaju Σ n-3 PUFA kretao se i omjer Σ n-6/n-3 PUFA ($K=10,28 : 1 > P1= 0,69:1 > P2 0,68:1$).
- Prosječne žive mase nesilica na početku istraživanja (K 2063,36 g, P1 2094,05 g, P2 2070,13 g) i kraju istraživanja (K 2066,11 g, P1 2099,91 g, P2 2076,16 g) nisu se značajno razlikovale na početku ($P=0,069$) niti na kraju istraživanja ($P=0,086$). Tijekom 3 tjedna pokusa nesivost jaja je kod sve 3 skupine iznosila 94,5%.
- Pokazatelji vanjske kvalitete svježih i čuvanih jaja u hladnjaku na $+4^{\circ}\text{C}$ kroz 14 i 28 dana nisu se razlikovali između tretmana kod svježih niti čuvanih jaja ($P>0,005$).
- Statistička analiza je pokazala da su hranidbeni tretmani utjecali samo na pH vrijednosti bjelanjaka ($P=0,001$), vrijeme čuvanja jaja utjecalo je na visinu bjelanjaka, boju žumanjaka, Haugh jedinice te pH vrijednosti bjelanjaka i žumanjaka ($P=0,001$). Interakcija tretmana i vremena čuvanja jaja bila je značajna za boju žumanjaka ($P=0,018$) te pH vrijednosti bjelanjaka ($P=0,001$) i žumanjaka ($P=0,013$).
- Razlike u osnovnim dijelovima jaja u apsolutnim i relativnim pokazateljima K, P1 i P2 tretman jaja i vremena čuvanja u hladnjaku nisu bile značajne ($P>0,05$).
- Profili masnih kiselina u lipidima jaja ovisili su o hranidbenim tretmanima. Sadržaj ALA bio je u K, P1 i P2 skupinama jaja 65,48, 370,27 i 358,21 mg/100 g jestivih dijelova jaja ($P=0,001$). EPA je detektirana samo u P1 i P2 skupinama jaja i to 29,14 i 31,06 mg/100 g jaja. DHA je u K, P1 i P2 skupinama jaja iznosila 84,40, 199,17 i 191,40 mg/100 g jaja. Σ n-3 PUFA istim redosljedom je iznosila 149,88, 598,59 i 580,71 mg/100 g jaja, a omjeri Σ n-6/ Σ n-3 PUFA bili su 10,36:1, 1,88:1 i 1,98:1.
- Kvaliteta lipida žumanjaka prikazana je pomoću aterogenih, trombogenih i hipo/hiperkolesterolemičnih indeksa koji su pokazali prednost P1 i P2 tretmana u odnosu na K tretman.

- Senzorna analiza jaja (boja, miris, okus i tekstura) obavljena pomoću triangl testa pokazala je da postoji statistički značajna razlika u parovima tretmana K:P1 i tretmana K:P2. Najčešće utvrđena razlika između parova tretmana bila je u okusu, zatim u boji i mirisu, dok je najrjeđa razlika između parova bila u teksturi. Pri provedbi hedonističkog testa utvrđena je statistički značajno veća vrijednost dopadljivosti okusa tretmana K od tretmana P1 i P1 ($P < 0,05$).
- Nisu utvrđene statistički značajne razlike u TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) vrijednostima (MDA mg/100 g) između tretmana svježih niti hladjenih jaja ($P > 0,05$).
- Profili n-3 PUFA u krvi ispitanika pri konzumaciji obogaćenih i konvencionalnih jaja (tretmana K i P1) statistički su se značajno razlikovali u $\sum$ SFA ($p = 0,041$) i sadržaju ALA ($P = 0,010$). Omjer $\sum$ n-6/ $\sum$ n-3 PUFA u krvnom serumu ispitanika koji su konzumirali jaja iz K skupine, odnosno P1 skupine iznosio je 22,14:1 i 16,11:1. Ustanovljeno je smanjenje omjera $\sum$ n-6/n-3 PUFA za 27,23% što se smatra u nutritivnom pogledu znatno povoljnijim.
- Analiza biokemijskih pokazatelja u krvi ispitanika pokazala je da su u skupini koja je konzumirala jaja obogaćena s n-3 PUFA, smanjene vrijednosti MCV (fl), MVP (f) i urata ($P < 0,05$), a povećane vrijednosti MCHC (g/L) u odnosu na pokazatelje prije konzumiranja n-3 PUFA.

NAPOMENA: Ovo istraživanje financirano je sredstvima Europskih strukturnih i investicijskih fondova, dodijeljeni hrvatskom nacionalnom Znanstvenom centru izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju (KK.01.1.1.01.0010).

7. LITERATURA

1. Abeyrathne E., Ahn D.U. (2015.): Isolation of value-added components from egg white and their potential uses in food, nutraceutical and pharmaceutical industries. Handbook of eggs in human function. Wageningen Academic Publishers. Wageningen, the Netherlands. p 35–52.
2. Adams C.A. (1999.): Nutricines. Food Components in Health and Nutrition. Nottingham University Press. Thrumpton, Nottingham, UK.
3. Adili R., Hawley M., Holinstat M. (2018.): Regulation of platelet function and thrombosis by omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 139: 10-18.
4. Aguillón-Páez Y.J., Romero L.A., Diaz G.J. (2020.): Effect of full-fat sunflower or flaxseed seeds dietary inclusion on performance, egg yolk fatty acid profile and egg quality in laying hens. Animal Nutrition, 6(2): 179-184.
5. American Heart Association, AHA (2017.): Fish oil supplements provide some benefit after heart attack, heart failure, <https://www.heart.org/en/news/2018/05/01/fish-oil-supplements-provide-some-benefit-after-heart-attack-heart-failure>, pristupljeno 15.03.2023.
6. Ahmad S., Yousaf M., Kamran Z., Soheil M.U. (2013.): Effect of feeding whole linseed as a source of polyunsaturated fatty acids on performance and egg characteristics of laying hens kept at high ambient temperature. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 15(1): 21-5.
7. Ahmed M., Pickova J., Ahmad T., Liaquat M., Farid A., Jahangir M. (2016.): Oxidation of lipids in foods. Sarhad Journal of Agriculture, 32(3): 230-238.
8. Aidos I., Jacobsen C., Jensen B., Luten J.B., Padt A.V.D., Boom R.M. (2002.): Volatile oxidation products formed in crude her-ring oil under accelerated oxidative conditions. European Journal of Lipid Science and Technology, 104(12): 808-818.
9. Alagawany M., Elnesr S.S., Farag M.R., Abd El-Hack M.E., Khafaga A.F., Taha A.E., Tiwari R., Yatoo M.I., Bhatt P., Khurana S.K., Dhama K. (2019.): Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids in Poultry Nutrition: Effect on Production Performance and Health. Animals, 9(8): 573.
10. Altaçlı S. , Bingöl T., Deniz S., Bolat D., Kale Ç., Özkan F. (2022): Effects on Performance, Egg Quality Criteria and Cholesterol Level of Adding Different Ratios

- Flaxseed Oil Instead of Sunflower Oil to Compound Feed of Laying Hens. *Journal of Agricultural Sciences*, 28(1): 107-114.
11. Amano T., Matsubara T., Uetani T., Kato M., Kato B., Yoshida T., Harada K., Kumagai S., Kunimura A., Shinbo Y., Kitagawa K., Ishii H., Murohara T. (2011.): Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on coronary plaque instability: an integrated backscatter intravascular ultrasound study. *Atherosclerosis*, 218(1): 110–116.
 12. Amjad Khan W., Chun-Mei H., Khan N., Iqbal A., Lyu S.W., Shah F. (2017.): Bioengineered plants can be a useful source of omega-3 fatty acids. *BioMed Research International*, 2017:7348919.
 13. Amšel Zelenika T., Zglavnik T., Janječić Z., Bedeković D. (2020.): Tehnologija uzgoja i zaštita zdravlja peradi. Zagrebačka županija, Zagreb.
 14. Andrioli G., Carletto A., Guarini P., Galvani S., Biasi D., Bellavite P., Corrocher R. (1999.): Differential effects of dietary supplementation with fish oil or soy lecithin on human platelet adhesion. *Thrombosis and Haemostasis*, 82(5): 1522-1527.
 15. Anton M., Nau F., Guerin-Dubiard C. (2011.): Bioactive fractions of eggs for human and animal health. *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Egg Safety and Nutritional Quality (Volume 2)*. Woodhead Publishing, Cambridge, UK. p. 321–345.
 16. Antruejo A., Azcona J.O., Garcia P.T., Gallinger C., Rosmini M., Ayerza R., Coates W., Perez C.D. (2011.): Omega-3 enriched egg production: the effect of α -linolenic ω -3 fatty acid sources on laying hen performance and yolk lipid content and fatty acid composition. *British Poultry Science*, 52(6): 750-60.
 17. 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. *Journal of Applied Poultry Research*, 24(3): 394-400.
 18. Arnett D.K., Blumenthal R.S., Albert M.A., Buroker A.B., Goldberger Z.D., Hahn E.J., Himmelfarb C.D., Khera A., Lloyd-Jones D., McEvoy J.W., Michos E.D., Miedema M.D., Muñoz D., Smith S.C. Jr., Virani S.S., Williams K.A. Sr., Yeboah J., Ziaeian B. (2019): ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 140(11): 596-646.

19. Artan S., Durmuş İ. (2015.): Comparison of egg quality characteristics of produced in village, free range and cage systems. *Akademik Ziraat Dergisi*, 4: 89-97.
20. Attia Y.A., Al-Harhi M.A., Al-Sagan A.A., Alqurashi A.D., Korish M.A., Abdulsalam N.M., Olal M.J., Bovera F. (2022.): Dietary Supplementation with Different ω -6 to ω -3 Fatty Acid Ratios Affects the Sustainability of Performance, Egg Quality, Fatty Acid Profile, Immunity and Egg Health Indices of Laying Hens. *Agriculture* 12(10): 1712.
21. Attia Y.A., Al-Harhi M.A., Korish M.M., Shiboob M.M. (2015.): Fatty acid and cholesterol profiles and hypocholesterolemic, atherogenic, and thrombogenic indices of table eggs in the retail market. *Lipids in Health and Disease*, 14: 136.
22. Ayerza R., Coates W. (2000.): Dietary levels of chia: influence on yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. *Poultry science*, 79(5): 724-39.
23. Bagga D., Anders K.H., Wang H.J., Glaspy J.A. (2002.): Long-chain n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratios in breast adipose tissue from women with and without breast cancer. *Nutrition and cancer*, 42(2): 180-185.
24. Balić A., Vlašić D., Žužul K., Marinović B., Bukvić Mokos Z. (2020.): Omega-3 Versus Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids in the Prevention and Treatment of Inflammatory Skin Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3): 741.
25. Basmacioglu H., Cabuk M., Unal K., Ozkan K., Akkan S., Yalcin H. (2003.): Effects of dietary fish oil and flax seed on cholesterol and fatty acid composition of egg yolk and blood parameters of laying hens. *South African Journal of Animal Science*, 33(4): 266-273.
26. Baucells M.D., Crespo N., Barroeta A.C., López-Ferrer S., Grashorn M.A. (2000.): Incorporation of different polyunsaturated fatty acids into eggs. *Poultry Science*, 79(1): 51-59.
27. Bazinet R.P., Layé S. (2014.): Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(12): 771–785.
28. Beheshti Moghadam M.H., Shehab A., Cherian G. (2020.): Production Performance, Quality and Lipid Composition of Eggs from Laying Hens Fed Heated Flaxseed with Carbohydrase Enzymes. *Journal of Applied Poultry Research*, 29(1): 121-129.
29. Beltrán-Sánchez H., Harhay M.O., Harhay M.M., McElligott S. (2013.): Prevalence and trends of metabolic syndrome in the adult US population, 1999–2010. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(8): 697–703.

-
30. Bentsen H. (2017.): Dietary polyunsaturated fatty acids, brain function and mental health. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 28(1): 1281916.
31. Bertechini A.G., Mazzucco H. (2013.): The table egg: A review. *Ciência e Agrotecnologia*, 37(2): 115-122.
32. Bhardwaj K., Verma N., Trivedi R., Bhardwaj S., Shukla N. (2016.): Significance of ratio of omega-3 and omega-6 in human health with special reference to flaxseed oil. *International Journal of Biological Chemistry*, 10(1-4): 1– 6.
33. Bhatt D.L., Miller M., Brinton E.A., Jacobson T.A., Steg P.G., Ketchum S.B., Doyle R.T., Juliano R.A., Jiao L., Granowitz C., Tardif J.C., Olshansky B., Chung M.K., Gibson C.M., Giugliano R.P., Budoff M.J., Ballantyne C.M. (2020.): REDUCE-IT USA: Results from the 3146 Patients Randomized in the United States. *Circulation*, 141(5): 367-375.
34. Blesso C. N. (2015.): Egg phospholipids and cardiovascular health. *Nutrients*, 7(4): 2731-2747.
35. Bobetić B. (2019.): Izazovi i očekivanja EU i peradarstva Hrvatske u srednjoročnom razdoblju do 2030. godine. Zbornik radova Peradarski dani 2019. Hrvatski veterinarski institute, Zagreb. str. 17- 24.
36. Böttcher S., Steinhäuser U., Drusch S. (2015.): Off-flavour masking of secondary lipid oxidation products by pea dextrin. *Food Chemistry*, 169(1): 492-498.
37. Bovet P., Faeh D., Madeleine G., Viswanathan B., Paccaud F. (2007.): Decrease in blood triglycerides associated with the consumption of eggs of hens fed with food supplemented with fish oil. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17: 280–287.
38. Brenna J.T. (2016.): Long-chain polyunsaturated fatty acids and the preterm infant: a case study in developmentally sensitive nutrient needs in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 103(2): 606S-15S.
39. Breškić-Ćurić Ž., Masle A.M., Kibel A., Selthofer-Relatić K., Stupin A., Mihaljević Z., Jukić I., Stupin M., Matić A., Kozina N., Šušnjara P., Juranić B., Kolobarić N., Šerić V., Drenjančević I. (2021.): Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid- Enriched Hen Egg Consumption on the Inflammatory Biomarkers and Microvascular Function in Patients with Acute and Chronic Coronary Syndrome—A Randomized Study. *Biology*, 10(8): 774.
-

-
40. Buckley R., Shewring B., Turner R., Yaqoob P., Minihane A. M. (2004.): Circulating triacylglycerol and apoE levels in response to EPA and docosahexaenoic acid supplementation in adult human subjects. *British Journal of Nutrition*, 92: 477–483.
 41. Burns-Whitmore B., Haddad E., Sabaté J., Rajaram S. (2014.): Effects of supplementing n-3 fatty acid enriched eggs and walnuts on cardiovascular disease risk markers in healthy free-living lacto-ovo-vegetarians: A randomized, crossover, free-living intervention study. *Nutrition Journal*, 13: 29.
 42. Cachaldora P., García-Rebollar P., Alvarez C., Blas J. D., Méndez J. (2006.): Effect of type and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids retention efficiency in laying hens. *British Poultry Science*, 47(1): 43-49.
 43. Calder P.C. (2015.): Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 39: 18S-32S.
 44. Campbell F., Dickinson H.O., Critchley J.A., Ford G.A., Bradburn M.A. (2013.): Systematic review of fish-oil supplements for the prevention and treatment of hypertension. *European Journal of Preventive Cardiology*, 20(1): 107-20.
 45. Campos A. M., Ricardo F., Alves E., Reis A., Couto D., Domingues P., Domingues M. R. M. (2016.): Lipidomic investigation of eggs' yolk: Changes in lipid profile of eggs from different conditions. *Food Research International*, 89: 177-185.
 46. Candela C.G., López L. B., Kohen V. L. (2011.): Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. *Nutritional recommendations. Nutricion hospitalaria*, 26(2): 323-329.
 47. Carrillo-Dominguez S., Carranco-Jauregui M.E., Castillo-Dominguez R.M., Castro-Gonzalez M.I., Avila-Gonzalez E., Perez-Gil F. (2005.): Cholesterol and n-3 and n-6 Fatty Acid Content in Eggs from Laying Hens Fed with Red Crab Meal (*Pleuroncodes planipes*). *Poultry Science*, 84(1): 167–172.
 48. Caston L.J., Squires E.J., Leeson S. (1994.): Hen performance, egg quality and the sensory evaluation of eggs from SCWL hens fed dietary flax. *Canadian journal of animal science*, 74: 347–353.
 49. Celebi S., Utlu N. (2006.): Influence of animal and vegetable oil in layer diets on performance and serum lipid profile. *International Journal of Poultry Science*, 5: 370–373.

-
50. Ceylan N., Ciftçi I., Mizrak C., Kahraman Z., Efil H. (2011.): Influence of different dietary oil sources on performance and fatty acid profile of egg yolk in laying hens. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20(1): 71-83.
 51. Chen P.H., Common R.H., Nikolaiczuk N., Macrae H.F. (1965): Some Effects of Added Dietary Fats on the Lipid Composition of hen's Egg Yolk. *Journal of Food Science*, 30: 838-845.
 52. Clark C.M., Monahan K.D., Drew R.C. (2016.): Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation attenuates blood pressure increase at onset of isometric handgrip exercise in healthy young and older humans. *Physiological Reports*, 4(14): 12875.
 53. Cloughley J., Noble R., Speake B., Sparks N. (1997.): Manipulation of docosahexaenoic (22: 6 n-3) acid in chicken's egg. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 57: 222.
 54. Coorey R., Novinda A., Williams H., Jayasena V. (2015.): Omega-3 fatty acid profile of eggs from laying hens fed diets supplemented with chia, fish oil, and flaxseed. *Journal of Food Science*, 80(1): S180-7.
 55. Csapó J., Sugár L., Horn A., Kiss Z.C. (1986.): Chemical composition of milk from red deer roe and fallow deer kept in captivity. *Acta Agronomica Hungarica*, 3(4): 359-372.
 56. Das U.N. (2000.): Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how? *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 63(6): 351- 362.
 57. De Carvalho C.C.C.R., Caramujo M.J. (2018): The various roles of fatty acids. *Molecules*, 23(10): E2583.
 58. Deckelbaum R.J. (2010.): n-6 and n-3 Fatty acids and atherosclerosis: ratios or amounts? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(12): 2325-6.
 59. Díaz L.D., Fernández-Ruiz V., Cámara M. (2020.): An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. *Journal of Functional Foods*, 68: 103896.
 60. Dickinson H.O., Mason J.M., Nicolson D.J., Campbell F., Beyer F.R., Cook J.V., Williams B., Ford G.A. (2006.): Lifestyle interventions to reduce raised blood pressure: a systematic review of randomized controlled trials. *Journal of Hypertension* 24(2): 215-233.
 61. Djuricic I., Calder P.C. (2021.): Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health. *Nutrients*, 13(7): 2421.

-
62. Duvall M.G., Levy B.D. (2016.): DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 785: 144–155.
63. Dylla S.C., Balas L., Bazan N.G., Brenna J.T., Chiang N., da Costa Souza F., Dalli J., Durand T., Galano J.M., Lein P.J., Serhan C.N., Taha A.Y. (2022.): Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions. *Progress in Lipid Research*, 86: 101165.
64. DZZŽ, Ispostava Samobor. MBL- Katalog pretraga. Verzija:1.0., 2016.
65. Ebeid T.A. (2011): The impact of incorporation of n-3 fatty acids into eggs on ovarian follicular development, immune response, antioxidative status and tibial bone characteristics in aged laying hens. *Animal*, 10: 1554-1562.
66. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) (2010.): Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*, 8(3): 1461.
67. Ehr I.J., Persia M.E., Bobeck E.A. (2017.): Comparative omega-3 fatty acid enrichment of egg yolks from first-cycle laying hens fed flaxseed oil or ground flaxseed. *Poultry Science*, 96(6): 1791-1799.
68. Elagizi A., Lavie C.J., O'Keefe E., Marshall K., O'Keefe J.H., Milani R.V. (2021.): An Update on Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health. *Nutrients*, 13(1): 204.
69. Elsayed N.K., AlAfifi S.F. (2020.): Fatty acid pattern and productive performance of laying hens fed dietary flaxseed oil. *Egyptian Poultry Science*, 40(4): (819-829).
70. El-Wakf A.M., Ebraheem H.A., Serag H.A., Hassan H.A., Gumaih H.S. (2010.): Association between inflammation and the risk of cardiovascular disorders in atherogenic male rats: Role of virgin and refined olive oil. *Journal of American Science*, 6(12): 807–817.
71. Feng J., Long S., Zhang H.J., Wu S.G., Qi G.H., Wang J. (2020.): Comparative effects of dietary microalgae oil and fish oil on fatty acid composition and sensory quality of table eggs. *Poultry Science*, 99(3): 1734-1743.
72. Feng J., Zhang H., Wu S., Min Y., Qi G., Wang J., Gao Y. (2018.): Effect of dietary flaxseed oil supplementation on yolk fatty acid composition and sensory profile of eggs. *Journal of Veterinary Science. The Korean Society of Veterinary Science*, 45: 89–98.
-

-
73. Fernández M., Ordóñez J.A., Cambero I., Santos C., Pin C., De la Hoz L. (2007.): Fatty acid compositions of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. *Food Chemistry*, 9: 107–112.
74. Fernandez M.L., West, K.L. (2005.): Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *The Journal of Nutrition*, 135(9): 2075–2078.
75. Ferrier L.K., Leeson S., Holub B.J., Caston L., Squires D.J. (1994.): High Linolenic Acid Eggs and their influence on Blood Lipids in Man. *Egg Uses and Processing Technologies: New Developments*. CAB International, Oxford, UK. p. 362-373.
76. Fraeye I., Bruneel C., Lemahieu C., Buyse J., Muylaert K., Foubert I. (2012.): Dietary enrichment of eggs with omega-3 fatty acids: A review. *Food Research International*, 48(2): 961-969.
77. Friganović E., Čalić S., Maleš V., Mustapić A. (2011.): Funkcionalna hrana i potrošači. *Praktični menadžment: stručni časopis za teoriju i praksu menadžmenta*, 2(1): 51-57.
78. Fuchs F.D., Whelton P.K. (2020.): High Blood Pressure and Cardiovascular Disease. *Hypertension*, 75(2): 285-292.
79. Fuller N.R., Sainsbury A., Caterson I.D., Markovic T.P. (2015.): Egg consumption and human cardiometabolic health in people with and without diabetes. *Nutrients*, 7(9): 7399-7420.
80. Gao L.G., Cao J., Mao Q.X., Lu X.C., Zhou X.L., Fan L. (2013.): Influence of omega-3 polyunsaturated fatty acid-supplementation on platelet aggregation in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis*, 226(2): 328-34.
81. Gao Z., Zhang J., Li F., Zheng J., Xu G. (2021.): Effect of Oils in Feed on the Production Performance and Egg Quality of Laying Hens. *Animals*, 11(12): 3482.
82. Golanski J., Szymanska P., Rozalski M. (2021.): Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Metabolites on Haemostasis—Current Perspectives in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5): 2394.
83. Goldberg E.M., Ryland D., Gibson R.A., Aliani M., House J.D. (2013.): Designer laying hen diets to improve egg fatty acid profile and maintain sensory quality. *Food Science and Nutrition*, 1(4): 324–335.
84. Gonzalez-Esquerria R., Leeson S. (2000.): Effect of feeding hens regular or deodorized menhaden oil on production parameters, yolk fatty acid profile, and sensory quality of eggs. *Poultry Science*, 79(11): 1597-602.

-
85. Grčević M., Gajčević-Kralik Z., Kralik G., Ivanković S. (2011.): Kokošje jaje kao funkcionalna namirnica. *Krmiva*, 53(2): 93-100.
86. Grela E.R., Ognik K., Czeck A., Matras J. (2014.): Quality assessment of eggs from laying hens fed a mixture with Lucerne protein concentrate. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 23(3): 236–43.
87. Grobas S., Mendez J., Lazaro R., De Blas C., Mateo G. G. (2001.): Influence of source and percentage of fat added to diet on performance and fatty acid composition of egg yolks of two strains of laying hens. *Poultry Science*, 80(8): 1171-9.
88. Guedes L.L.M., Souza C.M.M., Saccomani A.P. de O., Faria Filho D.E. de, Suckeveris D., Faria D.E. de. (2016.): Internal quality of laying hens' commercial eggs according to storage time, temperature and packaging. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 38(1): 87-90.
89. Hara M., Sakata Y., Nakatani D., Suna S., Usami M., Matsumoto S., Hamasaki T., Doi Y., Nishino M., Sato H., Kitamura T., Nanto S., Hori M., Komuro I. (2013.): Osaka Acute Coronary Insufficiency Study (OACIS) Investigators. Low levels of serum n-3 polyunsaturated fatty acids are associated with worse heart failure-free survival in patients after acute myocardial infarction. *Circulation Journal*, 77(1): 153-162.
90. Hargis P.S., Van Elswyk M.E., Hargis B.M. (1991.): Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. *Poultry Science*, 70(4): 874-883.
91. Harwood J.L. (2019.): Algae: Critical Sources of Very Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Biomolecules*, 9(11): 708.
92. Hayakawa S., Yoshikawa D., Ishii H., Tanaka M., Kumagai S., Matsumoto M., Hayashi M., Sugiura T., Hayashi K., Ando H., Amano T., Murohara T. (2012.): Association of plasma ω -3 to ω -6 polyunsaturated fatty acid ratio with complexity of coronary artery lesion. *Internal Medicine*, 51(9): 1009–1014.
93. Hayat Z., Cherian G., Pasha T.N., Khattak F.M., Jabbar M.A. (2009.): Effect of feeding flax and two types of antioxidants on egg production, egg quality, and lipid composition of eggs. *Journal of Applied Poultry Research*, 18(3): 541-551.
94. Hayat Z., Cherian G., Pasha T.N., Khattak F.M., Jabbar M.A. (2010.): Oxidative stability and lipid components of eggs from flax-fed hens: effect of dietary antioxidants and storage. *Poult Science*, 89(6): 1285-1292.

-
95. Herkel R., Galik B., Biro D., Rolinec M., Šimko M., Juraček M., Majlat M., Arpašova H. (2014.): The effect of pumpkin and flaxseed oils on selected parameters of laying hens performance. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 17(03): 96-99.
96. Hester P.Y. (2017.): "Effects of Temperature and Storage Conditions on Eggs." *Egg Innovations and Strategies for Improvements*. Purdue University School of Agriculture. West Lafayette, Indiana, USA. p. 125–134.
97. Higgs J. (2002): The nutritional quality of meat. *Meat processing - Improving quality*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England. p. 64-92.
98. Hosseini-Vashan S.J., Sarir H., Afzali N., Mallekaneh M., Allahressani A., Esmaeilinasab P. (2010.): Influence of different layer rations on atherogenesis and thrombogenesis indices in egg yolks. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 17(4): 265–273.
99. Hudečková P., Rusníková L., Straková E., Suchý P., Marada P., Macháček M. (2012.): The effect of linseed oil supplementation of the diet on the content of fatty acids in the egg yolk. *Acta Veterinaria Brno*, 81(2): 159-162.
100. Irawan A., Ningsih N., Hafizuddin H., Rusli R.K., Suprayogi W.P.S., Akhirini N., Hadi R.F., Setyono W., Jayanegara A. (2022.): Supplementary n-3 fatty acids sources on performance and formation of omega-3 in egg of laying hens: a meta-analysis. *Poultry Science*, 101(1): 101566.
101. Jacob J., Pescatore T. (2013.): *Avian female reproductive system*. University of Kentucky College of Agriculture, Food and Environment, Lexington.
102. Jacobson T.A., Ito M.K., Maki K.C., Orringer C.E., Bays H.E., Jones P.H., McKenney J.M., Grundy S.M., Gill E.A., Wild R.A., Wilson D.P., Brown W.V. (2015.): National lipid association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia: part 1--full report. *Journal of Clinical Lipidology*, 9(2): 129-69.
103. Jaček M., Hrnčířová D., Rambousková J., Dlouhý P., Tůma P. (2020.): Effect of Food with Low Enrichment of N-3 Fatty Acids in a Two-Month Diet on the Fatty Acid Content in the Plasma and Erythrocytes and on Cardiovascular Risk Markers in Healthy Young Men. *Nutrients*, 12(8): 2207.
104. Jia W., Slominski B.A., Guenter W., Humphreys A., Jones, O. (2008): The effect of enzyme supplementation on egg production parameters and omega-3 fatty acid deposition in laying hens fed flaxseed and canola seed. *Poultry Science*, 87, 2005-2014.
-

-
105. Jones C.N., Dalli J., Dimisko L., Wong E., Serhan C.N., Irimia D. (2012.): Microfluidic chambers for monitoring leukocyte trafficking and humanized nanopresolving medicines interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50): 20560-5.
106. Jones D.R., Ward G.E., Regmi P., Karcher D.M. (2018.): Impact of egg handling and conditions during extended storage on egg quality. *Poultry Science*, 97(2): 716–723.
107. Kalish B.T., Fallon E.M., Puder M. (2012.): A tutorial on fatty acid biology. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36(4): 380-388.
108. Kapourchali F.R., Surendiran G., Goulet A., Moghadasian M.H. (2016.): The Role of Dietary Cholesterol in Lipoprotein Metabolism and Related Metabolic Abnormalities: A Mini-review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(14): 2408-15.
109. Karolyi D. (2007.): Polinezasićene masne kiseline u prehrani i zdravlju ljudi. *Meso: Prvi hrvatski časopis o mesu*, 9(3): 151-158.
110. Kartikasari L.R., Geier M.S., Hughes R.J., Bastian S.E.P., Gibson R.A. (2021.): Omega-3 fatty acid levels and sensory quality of eggs following consumption of alpha-linolenic acid enriched diets. *Food Research*, 5: 57-64.
111. Kattula S., Byrnes J.R., Wolberg A.S. (2017.): Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 37(3): e13–e21.
112. Kaur N., Chugh V., Gupta A.K. (2014.): Essential fatty acids as functional components of foods- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10): 2289-303.
113. Kazempoor R., Ghorbanzadeh A., Mokhtarian M., Rasoulinezhad S. (2021.): Laying hens' diet modification with flaxseed and fish oils to enrich egg yolks with omega-3 fatty acids and vitamin D3. *Food and Health*, 4(3): 1-6.
114. Keller J., Camaré C., Bernis C., Astello-García M., de la Rosa A.P., Rossignol M., del Socorro Santos Díaz M., Salvayre R., Negre-Salvayre A., Guéraud F. (2015.): Antiatherogenic and antitumoral properties of *Opuntia cladodes*: inhibition of low density lipoprotein oxidation by vascular cells, and protection against the cytotoxicity of lipid oxidation product 4-hydroxynonenal in a colorectal cancer cellular model. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 71(3): 557-587.
115. Kerr B.J., Kellner T.A., Shurson G.C. (2015.): Characteristics of lipids and their feeding value in swine diets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1): 30.

-
116. Ketten M. (2019.): Review on the beneficial effects of omega-3 enriched eggs by dietary flaxseed oil supplementation. *Journal of Istanbul Veterinary Sciences*, 3(3): 89-94.
117. Khan S.A., Khan A., Khan S.A., Beg M.A., Ali A., Damanhour G. (2017.): Comparative study of fatty-acid composition of table eggs from the Jeddah food market and effect of value addition in omega-3 bio-fortified eggs. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(4): 929- 935.
118. Kim J., Magnuson A., Tao L., Barcus M., Lei X.G. (2016.): Potential of combining flaxseed oil and microalgal biomass in producing eggs-enriched with n-3 fatty acids for meeting human needs. *Algal Research*, 17: 31–37.
119. Kim J.E., Campbell W.W. (2018.): Dietary Cholesterol Contained in Whole Eggs Is Not Well Absorbed and Does Not Acutely Affect Plasma Total Cholesterol Concentration in Men and Women: Results from 2 Randomized Controlled Crossover Studies. *Nutrients*, 10(9): 1272.
120. King E.J., Hugo A., de Witt F.H., van der Merwe H.J., Fair M.D. (2012.): Effects of dietary fat source on fatty acid profile and lipid oxidation of eggs. *South African Journal of Animal Science*, 42(1): 503–506.
121. Kolar L., Stupin M., Stupin A., Šušnjara P., Mihaljević Z., Matić A., Jukić I., Kolobarić N., Drenjančević I. (2021.): Does the Endothelium of Competitive Athletes Benefit from Consumption of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Hen Eggs? *Preventive Nutrition and Food Science*, 26(4): 388-399.
122. Kolobarić N., Drenjančević I., Matić A., Šušnjara P., Mihaljević Z., Mihalj M. (2021.): Dietary Intake of n-3 PUFA-Enriched Hen Eggs Changes Inflammatory Markers' Concentration and Treg/Th17 Cells Distribution in Blood of Young Healthy Adults-A Randomised Study. *Nutrients*, 13(6): 1851.
123. Kovacs-Nolan J., Phillips M., Mine Y. (2005.): Advances in the value of eggs and egg components for human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22): 8421–8431.
124. Kralik G., Gajčević Z., Škrtić Z. (2008): The effect of different oil supplementations on laying performance and fatty acid composition of egg yolk. *Italian Journal of Animal Science*, 7(2): 173-183.
125. Kralik G., Grčević M., Gajčević-Kralik Z. (2010.): Animalni proizvodi kao funkcionalna hrana. *Krmiva*, 52(1): 3-13.

-
126. Kralik G., Kralik Z., Grčević M., Kralik I., Gantner V. (2018.): Enrichment of table eggs with functional ingredients. *Journal of Central European Agriculture*, 19(1): 72-82.
127. Kralik G., Kralik Z., Grčević M., Galović O., Hanžek D., Biazik E. (2021.): Fatty acid profile of eggs produced by laying hens fed diets containing different shares of fish oil. *Poultry Science*, 100(10): 101379.
128. Kralik G., Kralik Z., Košević M., Gvozdanović K., Kralik I. (2022.): Modulacija hranidbenih tretmana pri obogaćivanju konzumnih jaja s n-3 polinezasićenim masnim kiselinama. *Krmiva*, 64(1): 41-51.
129. Kralik Z., Kralik G., Grčević M., Galović D. (2014.): Effect of storage period on the quality of table eggs. *Acta Agraria Kaposváriensis*, 18(1): 200-206.
130. Kralik Z., Grčević M., Radišić Ž., Škrtić Z., Kralik G., Pavičić N. (2015.): Effect of different storage conditions and age of hens on quality of table eggs. *Proceedings and Abstract Book of the International Symposium on Animal Science (ISAS)*. Faculty of Agriculture in Novi Sad, Novi Sad. str. 326-331.
131. Kralik Z., Lovreković M. (2018.): Utjecaj hranidbe na kvalitetu i obogaćivanje jaja funkcionalnim sastojcima. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu*, 20(1): 58-65.
132. Kralik Z., Kralik G., Grčević M., Hanžek D., Margeta P. (2020.): Microalgae *Schizochytrium limacinum* as an alternative to fish oil in enriching table eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2): 587-594.
133. Kris-Etherton P.M., Harris W.S., Appel L.J. (2002.): American Heart Association. Nutrition Committee. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation*, 106(21): 2747–2757.
134. Kuang H., Yang F., Zhang Y., Wang T., Chen G. (2018.): The impact of egg nutrient composition and its consumption on cholesterol homeostasis. *Cholesterol*, 2018: 6303810.
135. Küçükersan K., Yesilbag D., Küçükersan S. (2010.): Influence of different dietary oil sources on performance and cholesterol content of egg yolk in laying hens. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 4: 117-122.
136. Kumar S., Sutherland F., Rosso R., Teh A.W., Lee G., Heck P.M., Feldman A., Medi C., Watt S., Garg M.L., Sparks P.B. (2011.): Effects of chronic omega-3
-

- polyunsaturated fatty acid supplementation on human atrial electrophysiology. *Heart Rhythm*, 8(4): 562-8.
137. Laca A., Paredes B., Díaz M. (2009.): Quality characteristics of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched eggs. *Journal of Animal and Feed Sciences* 18(1): 101-112.
138. Larson M.K., Tormoen G.W., Weaver L.J., Luepke K.J., Patel I.A., Hjelmén C.E., Ensz N.M., McComas L.S., Mccarty O.J.T. (2013.): Exogenous modification of platelet membranes with the omega-3 fatty acids EPA and DHA reduces platelet procoagulant activity and thrombus formation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 304(3): C273 - C279.
139. Laudadio V., Lorusso V., Lastella N.M.B., Dhama K., Karthik K., Tiwari R., Alam G.A., Tufarelli V. (2015.): Enhancement of nutraceutical value of table eggs through poultry feeding strategies. *International Journal of Pharmacology*, 11: 201-212.
140. Laudadio V., Tufarelli V. (2011.): Influence of substituting dietary soybean meal for dehulled-micronized lupin (*Lupinus albus* cv. Multitalia) on early phase laying hens production and egg quality. *Livestock Science*, 140: 184-188.
141. Lawless, H. T. i Heymann, H. (2010): *Sensory Evaluation of Food Principles and Practices*. Chapter 1, 2nd Edition. Springer, Ithaca, New York, USA.
142. Lawlor J.B., Gaudette N., Dickson T., House J.D. (2010.): Fatty acid profile and sensory characteristics of table eggs from laying hens fed diets containing microencapsulated fish oil. *Animal Feed Science and Technology*, 156(3–4): 97-103.
143. Lee M.H., Cho E.J., Choi E.S., Sohn S.H. (2016): The Effect of Storage Period and Temperature on Egg Quality in Commercial Eggs. *Korean Journal of Poultry Science*, 43(1):31-38.
144. Lee S.H., Kim Y.B., Kim D.H., Lee D.W., Lee H.G., Jha R., Lee K.W. (2021.): Dietary soluble flaxseed oils as a source of omega-3 polyunsaturated fatty acids for laying hens. *Poultry Science*, 100(8): 101276.
145. Leeson S., Caston L., MacLaurin T. (1998.): Organoleptic evaluation of eggs produced by laying hens fed diets containing graded levels of flaxseed and vitamin E. *Poultry Science*, 77(9): 1436-40.
146. Leeson S., Summers J.D., Caston L.J. (2000.): Response of layers to dietary flaxseed according to body weight classification at maturity. *The Journal of Applied Poultry Research*, 9(3): 297-302.

-
147. Lemahieu C., Bruneel C., Ryckebosch E., Muylaert K., Buyse J., Foubert I. (2015.): Impact of different omega-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) sources (flaxseed, Isochrysis galbana, fish oil and DHA Gold) on n-3 LC-PUFA enrichment (efficiency) in the egg yolk. *Journal of functional foods*, 19: 821-827.
148. Leslie M.A., Cohen D.J., Liddle D.M., Robinson L.E., Ma D.W. (2015.): A review of the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on blood triacylglycerol levels in normolipidemic and borderline hyperlipidemic individuals. *Lipids in Health Disease*, 14: 53.
149. Lešić T., Krešić G., Kolarić Kravar S., Pleadin J. (2017.): Nutritivna kvaliteta masti industrijskih kobasica. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu*, 19(6): 496-503.
150. Lešić T., Vulić A., Cvetnić L., Kudumija N., Škrivanko M., Pleadin J. (2015.): Udio masti i sastav masnih kiselina u kokošjim jajima hrvatskih proizvođača. *Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis*, 46(5): 349-358.
151. Lewis N.M., Schalch K., Scheideler S.E. (2000.): Serum Lipid Response to n-3 Fatty Acid Enriched Eggs in Persons with Hypercholesterolemia. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 100(3): 365-7.
152. Li X.L., Steiner M. (1991.): Dose response of dietary fish oil supplementations on platelet adhesion. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, 11(1): 39-46.
153. Li-Chan E.C.Y., Kim H.O. (2008.): *Structure and Chemical Compositions of Eggs. Egg bioscience and biotechnology*. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. p. 1-97.
154. Liu C., Fan D., Lei Q., Lu A., He X. (2022.): Roles of Resolvins in Chronic Inflammatory Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23): 14883.
155. López Sobaler A.M., Aparicio Vizuite A., Ortega R.M. (2017.): Role of the egg in the diet of athletes and physically active people. *Nutricion*, 34 (4): 31-35.
156. Lupi S., Bagordo F., Stefanati A., Grassi T., Piccinni L., Bergamini M., Donno A.D. (2015.): Assessment of lifestyle and eating habits among undergraduate students in northern Italy. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 51(2): 154-161.
157. Ma Y., Olendzki B.C., Pagoto S.L., Hurley T.G., Magner R.P., Ockene I.S., Schneider K.L., Merriam P.A., Hébert J.R. (2009.): Number of 24-hour diet recalls needed to estimate energy intake. *Annals of epidemiology*, 19(8): 553-559.

-
158. Maki K.C., Van Elswyk M.E., McCarthy D., Seeley M.A., Veith P.E., Hess S.P., Ingram K.A., Halvorson J.J., Calaguas E.M., Davidson M.H. (2003.): Lipid responses in mildly hypertriglyceridemic men and women to consumption of docosahexaenoic acid-enriched eggs. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 73(5): 357-68.
159. Manda D., Giurcaneanu M., Ionescu L., Criste R.D., Panaite T.D., Popa O., Vladioiu S.V., Ianăș O. (2008.): Lipid profile after alpha-linolenic acid (ALA) enriched eggs diet: a study on healthy volunteers. *Archiva Zootechnica*, 11(2): 35-41.
160. Mariamenatu A.H., Abdu E.M. (2021.): Overconsumption of Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) versus Deficiency of Omega-3 PUFAs in Modern-Day Diets: The Disturbing Factor for Their "Balanced Antagonistic Metabolic Functions" in the Human Body. *Journal of Lipids*, 2021: 8848161.
161. Marshall A.C., Kubena K.S., Hinton K.R., Hargis P.S., Van Elswyk M.E. (1994.): n-3 fatty acid enriched table eggs: A survey of consumer acceptability. *Poultry Science*, 73(8): 1334-1340.
162. Mazalli M. R., Faria D.E, Salvador D., Ito D.T. (2004.): A comparison of the feeding value of different sources of fat for laying hens: 2. Lipid, cholesterol, and vitamin E profiles of egg yolk. *Journal of Applied Poultry Research*, 13(2): 280-290.
163. Meluzzi A., Sirri F., Manfreda G., Tallarico N., Franchini, A. (2000.): Effects of dietary vitamin E on the quality of table eggs enriched with n-3 long-chain fatty acids. *Poultry Science*, 79(4): 539-545.
164. Mihalj M., Stupin A., Kolobarić N., Bujak I.T., Matić A., Kralik Z., Jukić I., Stupin M., Drenjančević I. (2020.): Leukocyte Activation and Antioxidative Defense Are Interrelated and Moderately Modified by n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Eggs Consumption-Double-Blind Controlled Randomized Clinical Study. *Nutrients*, 12(10): 3122.
165. Miller P.E., Van Elswyk M., Alexander D.D. (2014.): Long-chain omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Hypertension*, 27(7): 885-896.
166. Minihane A.M., Armah C.K., Miles E.A., Madden J.M., Clark A.B., Caslake M.J., Packard C.J., Kofler B.M., Leitz G., Curtis P.J., Mathers J.C., Williams C.M., Calder P.C. (2016.): Consumption of fish oil providing amounts of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid that can be obtained from the diet reduces blood pressure in adults
-

- with systolic hypertension: a retrospective analysis. *Journal of Nutrition*, 146(3): 516-523.
167. Ministarstvo poljoprivrede: Godišnje izvješće o stanju poljoprivrede u 2021. godini (Zeleno izvješće). Zagreb, prosinac 2022. godine
168. Miranda J.M., Anton X., Redondo-Valbuena C., Roca-Saavedra P., Rodriguez J.A., Lamas A., Franco C.M., Cepeda A. (2015.): Egg and egg-derived foods: effects on human health and use as functional foods. *Nutrients*, 7(1): 706-29.
169. Mori T.A. (2014.): Dietary n-3 PUFA and CVD: a review of the evidence. *Proceedings of the Nutrition Society*, 73(1): 57-64.
170. Münger L.H., Garcia-Aloy M., Vázquez-Fresno R., Gille D., Rosana A.R.R., Passerini A., Soria-Florido M.T., Pimentel G., Sajed T., Wishart D.S., Andres Lacueva C., Vergères G., Praticò G. (2018.): Biomarker of food intake for assessing the consumption of dairy and egg products. *Genes and Nutrition*, 13: 26.
171. Mutungi G., Ratliff J., Puglisi M., Torres-Gonzalez M., Vaishnav U., Leite J.O., Quann E., Volek J.S., Fernandez M.L. (2008.): Dietary cholesterol from eggs increases plasma HDL cholesterol in overweight men consuming a carbohydrate-restricted diet. *The Journal of Nutrition*, 138(2): 272-276.
172. Neijat M., Ojekudo O., House J.D. (2016.): Effect of flaxseed oil and microalgae DHA on the production performance, fatty acids and total lipids of egg yolk and plasma in laying hens. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 115: 77-88.
173. Nikolova N., Kocevski D. (2006.): Forming egg shape index as influenced by ambient temperatures and age hens. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 22(1-2): 119-125.
174. Nimalaratne C., Wu J. (2015.): Hen Egg as an Antioxidant Food Commodity: A Review. *Nutrients*, 7(10): 8274-93.
175. Oh S.Y., Ryue J., Hsieh C.H., Bell D.E. (1991.): Eggs enriched in omega-3 fatty acids and alterations in lipid concentrations in plasma and lipoproteins and in blood pressure. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54(4): 689-95.
176. Ohira T., Arita M., Omori K., Recchiuti A., Van Dyke T.E., Serhan C.N. (2010.): Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 285(5): 3451–3461.
177. Oliveira B.L., Oliveira D.D. (2013.): Egg quality and technology. Lavras, UFLA. p. 223.

-
178. Omri B., Chalghoumi R., Izzo L., Ritieni A., Lucarini M., Durazzo A., Abdouli H., Santini A. (2019.): Effect of dietary incorporation of linseed alone or together with tomato-red pepper mix on laying hens' egg yolk fatty acids profile and health lipid indexes. *Nutrients*, 11(4): 813.
179. Oras P., Häbel H., Skoglund P.H., Svensson P. (2020.): Elevated Blood Pressure in the Emergency Department: A Risk Factor for Incident Cardiovascular Disease. *Hypertension*, 75(1): 229-236.
180. Palmquist D.L. (2009.): Omega-3 Fatty Acids in Metabolism, Health, and Nutrition and for Modified Animal Product Foods, *The Professional Animal Scientist*, 25(3): 207-249.
181. Panaite T.D., Turcu R.P., Soica C., Visinescu P. (2020.): Nutritional parameters of eggs from laying hens fed with flaxseed meal or mixture with rapeseed meal or rice bran. *Journal of Applied Animal Research*, 48(1): 566–574.
182. Pardio V.T., Landin L.A., Waliszewski K.N., Perez-Gil F., Diaz L., Hernandez B. (2005.): The effect of soybean soapstock on the quality parameters and fatty fat acid composition of hen egg yolk. *Poultry Science*, 84(1): 148- 157.
183. Parpinello G. P., Meluzzi A., Sirri F., Tallarico N., Versari A. (2006.): 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(1): 47-52.
184. Patel A., Sawant Desai S., Kelkar Mane V., Enman J., Rova U., Christakopoulos P., Matsakas L. (2022.): Futuristic food fortification with a balanced ratio of dietary ω -3/ ω -6 omega fatty acids for the prevention of lifestyle diseases. *Trends in food science and technology*, 120: 140-153.
185. Perić J., Drinić M., Mičić N. (2019.): Fatty acids in feed of laying hens on the production parameters and the ratio of omega-6 and omega-3 fatty acids. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 35(4): 377-386.
186. Petrović M., Gačić M., Karačić V., Gottstein Z., Mazija H., Medić H. (2012.): Enrichment of eggs in n-3 polyunsaturated fatty acids by feeding hens with different amount of linseed oil in diet. *Food Chemistry*, 135(3): 1563-1568.
187. Petrović M., Karačić V., Mazija H., Vahčić N., Medić H. (2016.): Stability and sensory evaluation of eggs produced by addition of different amount of linseed oil into feed.
-

- Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 11(1-2): 41-48.
188. Pinstrup-Andersen P. (2013.): Nutrition-sensitive food systems: From rhetoric to action. *Lancet*, 382(9890): 375-376.
189. Pires P.G.D.S., Leuven A.F.R., Franceschi C.H., Machado G.S., Pires P.D.D.S., Moraes P.D.O., Kindlein L., Andretta I. (2020.): Effects of rice protein coating enriched with essential oils on internal quality and shelf life of eggs during room temperature storage. *Poultry science*, 99(1): 604-611.
190. Popa C.D., Arts E., Fransen J., van Riel P.L. (2012.): Atherogenic index and high-density lipoprotein cholesterol as cardiovascular risk determinants in rheumatoid arthritis: the impact of therapy with biologicals. *Mediators of Inflammation*, 2012: 785946.
191. Pravilniku o tržišnim standardima za jaja (NN 90/2021).
192. Promila N.K., Sajjan S., Jyoti S., Rakesh V., Saurabh B. (2017.): Effect of linseed oil supplementation on hen day egg production, body weight, egg shape index, economics and egg quality in layers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11): 2005-2016.
193. Puglisi M.J., Fernandez M.L. (2022.): The Health Benefits of Egg Protein. *Nutrients*, 14(14): 2904.
194. Radack K., Deck C., Huster G. (1990.): The comparative effects of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on plasma fibrinogen levels: a controlled clinical trial in hypertriglyceridemic subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, 9(4): 352-357.
195. Réhault-Godbert S., Guyot N., Nys Y. (2019.): The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. *Nutrients*, 11(3): 684.
196. Rietveld I.M., Lijfering W.M., Cessie S.L., Bos M.H., Rosendaal F.R., Reitsma P.H., Cannegieter S.C. (2019.): High levels of coagulation factors and venous thrombosis risk: strongest association for factor VIII and von Willebrand factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 17(1): 99-109.
197. Roberts J.R. (2004.): Factors Affecting Egg Internal Quality and Egg Shell Quality in Laying Hens. *Journal of Poultry Science*, 41(3): 161-177.

-
198. Russo G.L. (2009.): Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical pharmacology*, 77(6): 937-946.
199. Samli H.E., Agma A., Senkoğlu N. (2005.): Effect of storage time and temperature on egg quality in old laying hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 14(3): 548 – 553.
200. Sanlier N., Üstün D. (2021.): Egg consumption and health effects: A narrative review. *Journal of Food Science*, 86(10): 4250-4261.
201. Sari M., Aksit M., Özdoğan M., Başmacıoğlu H. (2002.): Effects of addition of flaxseed to diets of laying hens on some production characteristics, levels of yolk and serum cholesterol, and fatty acid composition of yolk. *Archiv für Geflügelkunde*, 66(2): 75-79.
202. SAS Institute (2018). SAS Studio University Edition, release: 3.71.
203. Scheideler S.E., Froning G., Cuppett S. (1997.): Studies of consumer acceptance of high omega-3 fatty acid-enriched eggs. *The Journal of Applied Poultry Research*, 6(2): 137-146.
204. Scheideler S.E., Froning G.W. (1996.): The combined influence of dietary flaxseed variety, level, form, and storage conditions on egg production and composition among vitamin E-supplemented hens. *Poultry Science*, 75(10): 1221-1226.
205. Schmidt E.B., Varming K., Ernst E., Madsen P., Dyerberg J. (1990.): Dose-response studies on the effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on lipids and haemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*, 63(1): 1-5.
206. Schreiner M., Hulan H.W., Razzazi-Fazeli E., Böhm J., Iben C. (2004.): Feeding laying hens seal blubber oil: effects on egg yolk incorporation, stereospecific distribution of omega-3 fatty acids, and sensory aspects. *Poultry Science*, 83(3): 462-473.
207. Sedoski H.D., Beamer S.K., Jaczynski J., Partington S.N., Matak K.E. (2012.): Sensory evaluation and quality indicators of nutritionally-enhanced egg product with ω -3 rich oils. *Lwt - Food Science and Technology*, 47(2): 459-464.
208. Senapati S., Gragg M., Samuels I.S., Parmar V.M., Maeda A., Park P.S. (2018.): Effect of dietary docosahexaenoic acid on rhodopsin content and packing in photoreceptor cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1860(6): 1403-1413.
-

-
209. Serhan C.N., Chiang N., Dalli J., Levy B.D. (2014.): Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2): a016311.
210. Serhan C.N., Libreros S., Nshimiyimana R. (2022.): E-series resolvins: metabolism, biosynthesis and critical role of stereochemistry of specialized pro-resolving mediators (SPMs) in inflammation-resolution: Preparing SPMs for long COVID-19, human clinical trials, and targeted precision nutrition. *Seminars in immunology*, 59: 101597.
211. Serhan C.N. (2014.): Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510(7503): 92-101.
212. Shahid M.S., Raza T., Wu Y., Hussain Mangi M., Nie W., Yuan J. (2020.): Comparative Effects of Flaxseed Sources on the Egg ALA Deposition and Hepatic Gene Expression in Hy-Line Brown Hens. *Foods*, 9(11): 1663.
213. Shakoor H., Khan M.I., Sahar A., Khan M.K.I., Faiz F., Basheer Ahmad H. (2020.): Development of omega-3 rich eggs through dietary flaxseed and bioevaluation in metabolic syndrome. *Food Science and Nutrition*, 8(6): 2619-2626.
214. Sim J.S., Cherian G. (1994.): α -Linolenic acid for designing poultry products for human consumption: Canadian designer eggs and nutritional significance. 55th Flax Institute of the United State, North Dakota.
215. Simopoulos A.P. (2002.): The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56(8): 365-379.
216. Simopoulos A.P. (2008.): The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental biology and medicine*, 233(6): 674-688.
217. Simopoulos A.P. (2010.): Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. *Experimental biology and medicine*, 235(7): 785-795.
218. Simopoulos A.P. (2016.): An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 8(3): 128.
219. Simopoulos A.P., DiNicolantonio J.J. (2016.): The importance of a balanced ω -6 to ω -3 ratio in the prevention and management of obesity. *Open Heart*, 3(2): e000385.
220. Simopoulos A.P. (2001.): The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. *Journal of Nutrition*, 131(11 Suppl): 3065S-73S.
221. Singh V.P., Sachan N., Singh R. (2010.): Egg as a nutraceutical. *Hind Poultry*, 9: 15-18.
-

-
222. Souza P.R., Marques R.M., Gomez E.A., Colas R.A., De Matteis R., Zak A., Patel M., Collier D.J., Dalli J. (2020.): Enriched Marine Oil Supplements Increase Peripheral Blood Specialized Pro-Resolving Mediators Concentrations and Reprogram Host Immune Responses: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Circulation Research*, 126(1): 75-90.
223. Sproston N.R., Ashworth J.J. (2018.): Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology*, 9: 754.
224. Stadelman W.J., Cotterill O.J. (1995.): *Egg Science and Technology*. 4th Edition, The Haworth Press, New York, USA.
225. Stanton A.V., James K., Brennan M.M., O'Donovan F., Buskandar F., Shortall K., El-Sayed T., Kennedy J., Hayes H., Fahey A.G., Pender N., Thom S.A.M., Moran N., Williams D.J., Dolan E. (2020.): Omega-3 index and blood pressure responses to eating foods naturally enriched with omega-3 polyunsaturated fatty acids: a randomized controlled trial. *Scientific Reports*, 10(1): 15444.
226. Stark K.D., Van Elswyk M.E., Higgins M.R., Weatherford C.A., Salem N. (2016.): Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. *Progress in lipid research*, 63: 132-152.
227. Stupin A., Mihalj M., Kolobarić N., Šušnjara P., Kolar L., Mihaljević Z., Matić A., Stupin M., Jukić I., Kralik Z., Grčević M., Kralik G., Šerić V., Drenjančević I. (2020.): Anti-Inflammatory Potential of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Enriched Hen Eggs Consumption in Improving Microvascular Endothelial Function of Healthy Individuals-Clinical Trial. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11): 4149.
228. Stupin A., Rasic L., Matic A., Stupin M., Kralik Z., Kralik G., Drenjancevic I. (2018.): Omega-3 polyunsaturated fatty acids-enriched hen eggs consumption enhances microvascular reactivity in young healthy individuals. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 43(10): 988-995.
229. Surai P.F., Sparks N.H.C. (2001.): Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Science and Technology*, 12(1):7-16.
230. Świątkiewicz S., Arczewska-Włosek A., Szczurek W., Calik J., Bederska-Łojewska D., Orczewska-Dudek S., Muszyński S., Tomaszewska E., Józefiak, D. (2020.): Algal Oil as Source of Polyunsaturated Fatty Acids in Laying Hens Nutrition: Effect on Egg Performance, Egg Quality Indices and Fatty Acid Composition of Egg Yolk Lipids. *Annals of Animal Science*, 20(3): 961-973.
-

-
231. Szöllősi L. (2021.): Current State and Future Prospects of the Egg Sector – an International Outlook. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 86(2): 95-105.
232. Škrtić Z., Kralik G., Gajčević Z., Bogut I., Hanžek D. (2007.): The increase of the n-3 PUFA content in eggs. *Poljoprivreda*, 13(2): 47-52.
233. Škrtić Z., Kralik G., Gajčević Z., Hanžek D., Bogut I. (2008.): Effect of different source of oils on fatty acid profile and organoleptic traits of eggs. *Acta Agriculturae Slovenica*, 92(2): 213-217.
234. Štefan L., Tepšić T., Zaviđić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007.): Lipidna peroksidacija- uzroci i posljedice. *Medicina Fluminensis*, 43(2.): 84-93.
235. Tabidi M.H. (2011.): Impact of Storage Period and Quality on Composition of Table Egg. *Advances in Environmental Biology*, 5(5): 856-861.
236. Takahashi M., Ando J., Shimada K., Nishizaki Y., Tani S., Ogawa T., Yamamoto M., Nagao K., Hirayama A., Yoshimura M., Daida H., Nagai R., Komuro I. (2017.): The ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids is associated with diabetes mellitus in patients with prior myocardial infarction: a multicenter cross-sectional study. *BMC cardiovascular disorders*, 17(1): 41.
237. Tayeb I.T. (2012.): Effects of Storage Temperature and Length on Egg Quality Parameters of Laying Hen. *Journal of Animal Scientist*, 1(2): 32-36.
238. Thacker P.A., Willing B.P., Racz V.J. (2005.): Performance of broiler chicks fed wheat-based diets supplemented with combinations of non-extruded or extruded canola, flax and peas. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(11): 902-907.
239. Trautwein E.A. (2001.): n-3 Fatty acids : physiological and technical aspects for their use in food. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103: 45-55.
240. Tribulova N., Szeiffova Bacova B., Egan Benova T., Knezl V., Barancik M., Slezak J. (2017.): Omega-3 Index and Anti-Arrhythmic Potential of Omega-3 PUFAs. *Nutrients*, 9(11): 1191.
241. Trikalinos T.A., Lee J., Moorthy D., Yu W.W., Lau J., Lichtenstein A.H., Chung M. (2012.): Effects of Eicosapentanoic Acid and Docosahexanoic Acid on Mortality Across Diverse Settings: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials and Prospective Cohorts: Nutritional Research Series, Vol. 4. Agency for Healthcare Research and Quality (US). Publication No. 12-EHC040-EF, Rockville (MD).

-
242. Untea A.E., Varzaru I., Panaite T.D., Gavris T., Lupu A., Ropota M. (2020.): The Effects of Dietary Inclusion of Bilberry and Walnut Leaves in Laying Hens' Diets on the Antioxidant Properties of Eggs. *Animals*, 10(2): 191.
243. Uredba Komisije (EZ) br. 589/2008 od 23. lipnja 2008. o utvrđivanju detaljnih pravila za provedbu Uredbe Vijeća (EZ) br. 1234/2007 u pogledu tržišnih standarda za jaja, 97-114.
244. United States Department of Agriculture (USDA), 2018.
245. Van Dael P. (2021.): Role of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in human nutrition and health: review of recent studies and recommendations. *Nutrition research and practice*, 15(2): 137–159.
246. Van Elswyk M.E. (1997.): Comparison of n–3 fatty acid sources in laying hen rations for improvement of whole egg nutritional quality: A review. *British Journal of Nutrition*, 78(1): S61-S69.
247. Vanschoonbeek K., de Maat M.P., Heemskerk J.W. (2003.): Fish oil consumption and reduction of arterial disease. *The Journal of Nutrition*, 133(3): 657-660.
248. Venegas-Calcrón M., Sayanova O., Napier J.A. (2010.): An alternative to fish oils: Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 49(2): 108-19.
249. Vishvakarma P., Mandal S., Verma A. (2023.): A review on current aspects of nutraceuticals and dietary supplements. *International Journal of Pharma Professional's Research (IJPPR)*, 14(1): 78-91.
250. Vranešić Bender D. (2011.): Omega-3 masne kiseline – svojstva i djelovanje. *Medix*, 17: 92-93.
251. Wade K.H., Chiesa S.T., Hughes A.D., Chaturvedi N., Charakida M., Rapala A., Muthurangu V., Khan T., Finan N., Sattar N., Howe L.D., Fraser A., Lawlor D.A., Davey Smith G., Deanfield J.E., Timpson N.J. (2018.): Assessing the causal role of body mass index on cardiovascular health in young adults: Mendelian randomization and recall-by-genotype analyses. *Circulation*, 138(20): 2187-2201.
252. Wang J., Yue H., Wu S., Zhang H., Qi G. (2017.): Nutritional modulation of health, egg quality and environmental pollution of the layers. *Animal Nutrition*, 3(2): 91-96.
253. Watson T., Shantsila E., Lip G.Y. (2009.): Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *Lancet*, 373(9658): 155-66.
-

-
254. Yagi S., Fukuda D., Aihara K.I., Akaike M., Shimabukuro M., Sata M. (2017.): n-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Promising Nutrients for Preventing Cardiovascular Disease. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 24(10): 999–1010.
255. Yalcin H. (2017.): Supplemental fish oil and its impact on N- 3 fatty acids in eggs. *Egg Innovations and Strategies for Improvements*. Elsevier Science, Oxford/Amsterdam, Indiana, p. 375-383.
256. Yalcin H., Unal M.K., Basmacyoolu H. (2007.): The fatty acid and cholesterol composition of enriched egg yolk lipids obtained by modifying hens' diets with fish oil and flaxseed. *Grasas Y Aceites*, 58(4), 372–378.
257. Yalcin H., Unal M.K. (2010.): The enrichment of hen eggs with omega-3 fatty acids. *Journal of Medicinal Food*, 13(3): 610-4.
258. Yanagisawa N., Shimada K., Miyazaki T., Kume A., Kitamura Y., Ichikawa R., Ohmura H., Kiyanagi T., Hiki M., Fukao K., Sumiyoshi K., Hirose K., Matsumori R., Takizawa H., Fujii K., Mokuno H., Inoue N., Daida H. (2010.): Polyunsaturated fatty acid levels of serum and red blood cells in apparently healthy Japanese subjects living in an urban area. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 17(3): 285–94.
259. Yashodhara B.M., Umakanth S., Pappachan J.M., Bhat S.K., Kamath R., Choo B.H. (2009.): Omega-3 fatty acids: a comprehensive review of their role in health and disease. *Postgraduate medical journal*, 85(1000): 84-90.
260. Yassein S.A., El-Mallah G.M., Ahmed S.M., El-Ghamry A.A., Abdel-Fattah M.M., El-Hariry D.M. (2015.): Response of laying hens to dietary flaxseed levels on performance, egg quality criteria, fatty acid composition of egg and some blood parameters. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 3(10): 27-34.
261. Yokoyama M., Origasa H., Matsuzaki M., Matsuzawa Y., Saito Y., Ishikawa Y., Oikawa S., Sasaki J., Hishida H., Itakura H., Kita T., Kitabatake A., Nakaya N., Sakata T., Shimada K., Shirato K. (2007.): Japan EPA lipid intervention study (JELIS) Investigators. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet*, 369(9567): 1090-8.
262. Zárata R., El Jaber-Vazdekis N., Tejera N., Pérez J.A., Rodríguez C. (2017.): Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and translational medicine*, 6(1): 25.
-

263. Zehr K.R., Walker M.K. (2018.): Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve endothelial function in humans at risk for atherosclerosis: A review. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*, 134: 131-140.
264. Zotte A.D, Andrighetto I., Giaccone V., Marchesini G. (2015.): Dietary enrichment of n-3 PUFA for laying hens: effect of different sources on production, composition and quality of eggs. *Animal Science Papers and Reports*, 33(4): 411-424.
265. Zuliani G., Galvani M., Leitersdorf E., Volpato S., Cavalieri M., Fellin R. (2009.): The role of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the treatment of dyslipidemias. *Current Pharmaceutical Design*, 15(36): 4087-93.

8. SAŽETAK

U disertaciji se istražuju postupci obogaćivanja konzumnih jaja s n-3 polinezasićenim masnim kiselinama i utjecaj konzumacije obogaćenih jaja u komparaciji s jajima konvencionalnog sastava, na ljudsko zdravlje. U cilju postizanja predviđenog, obrađena je dostupna literatura koja je obuhvatila: građu i nutritivna svojstva jaja, metabolizam masnih kiselina, modifikaciju hranidbenih smjesa za nesilice, proizvodne osobine nesilica i kvalitetu jaja kao i utjecaj obogaćenih jaja s n-3 polinezasićenim masnim kiselinama na biokemijske pokazatelje i profil masnih kiselina u krvi ispitanika. Za istraživanje je upotrijebljeno 480 TETRA SL nesilica koje su podijeljene u tri skupine (tretmani K, P1 i P2). Nesilice kontrolne skupine konzumirale su hranu s 5% sojinog ulja, P1 skupina nesilica konzumirala je hranu s kombinacijom 1,5% ribljeg ulja i 3,5% lanenog ulja, a P2 skupina nesilica dobivala je u hranu 2% ribljeg ulja i 3% lanenog ulja. Smjese su bile izbalansirane na razini 17% sir. proteina i 12,60% MJ/kg ME. Obavljena je senzorna analiza jaja, a na osnovi sadržaja masnih kiselina u lipidima žumanjaka prikazani su aterogeni, trombogeni i hipo/hiperkolesterolemični indeksi. Kontrolna smjesa za nesilice sadržavala je 5,04%, P1 smjesa 33,86%, a P2 smjesa 33,59% $\sum$ n-3 PUFA. Omjer $\sum$ n-6/ $\sum$ n-3 PUFA iznosio je u kontrolnoj smjesi 10,28:1, P1 smjesi 0,69:1 i P2 smjesi 0,68:1. Istraživanje je trajalo 28 dana, a hranjenje i napajanje bilo je *ad libitum*. Prosječne žive mase nesilica na početku istraživanja (K - 2063,36 g, P1 - 2094,05 g, P2 - 2070,13 g) i kraju istraživanja (K - 2066,11 g, P1 - 2099,91 g, P2 - 2076,16 g) nisu se značajno razlikovale na početku ($P=0,069$) niti na kraju istraživanja ($P=0,086$). Tijekom 3 tjedna pokusa nesivost jaja je kod sve 3 skupine iznosila 94,5%. Pokazatelji vanjske kvalitete svježih i čuvanih jaja u hladnjaku na +4°C kroz 14 i 28 dana nisu se razlikovali između tretmana kod svježih niti čuvanih jaja ($P>0,005$). Statistička je analiza pokazala da su hranidbeni tretmani utjecali samo na pH vrijednosti bjelanjaka ($P=0,001$), vrijeme čuvanja jaja utjecalo je na visinu bjelanjaka, boju žumanjaka, Haugh jedinice te pH vrijednosti bjelanjaka i žumanjaka ($P=0,001$). Interakcija tretmana i vremena čuvanja jaja bila je značajna za boju žumanjaka ($P=0,018$) te pH vrijednosti bjelanjaka ($P=0,001$) i žumanjaka ($P=0,013$). Razlike u osnovnim dijelovima jaja u apsolutnim i relativnim pokazateljima K, P1 i P2 tretmana jaja i vremena čuvanja u hladnjaku nisu bile značajne ($P>0,05$).

Senzorna analiza jaja (boja, miris, okus i tekstura) obavljena pomoću triangl testa pokazala je da postoji statistički značajna razlika u parovima tretmana K:P1 i tretmana K:P2. Najčešće utvrđena razlika između parova tretmana bila je u okusu, zatim u boji i mirisu, dok je najrjeđa

razlika između parova bila u teksturi. Pri provedbi hedonističkog testa utvrđena je statistički značajna veća vrijednost dopadljivosti okusa tretmana K od tretmana P1 i P2 ($P < 0,05$). Nisu utvrđene statistički značajne razlike u TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) vrijednostima (MDA mg/100 g) između tretmana svježih niti hlađenih jaja ($P > 0,05$).

Profili masnih kiselina u lipidima jaja ovisili su o hranidbenim tretmanima. Sadržaj ALA bio je u K, P1 i P2 skupinama jaja 65,48, 370,27 i 358,21 mg/100 g jestivih dijelova jaja ($P = 0,001$). EPA je detektirana samo u P1 i P2 skupinama jaja i to 29,14 i 31,06 mg/100 g jaja. DHA je u K, P1 i P2 skupinama jaja iznosila 84,40, 199,17 i 191,40 mg/100 g jaja. $\sum n-3$ PUFA istim redoslijedom je iznosila 149,88, 598,59 i 580,71 mg/100 g jaja, a omjeri $\sum n-6/\sum n-3$ PUFA bili su 10,36:1, 1,88:1 i 1,98:1. Kvaliteta lipida žumanjaka prikazana je pomoću aterogenih, trombogenih i hipo/hiperkolesterolemičnih indeksa koji su pokazali prednost P1 i P2 tretmana u odnosu na K tretman. Profili n-3 PUFA u krvi ispitanika pri konzumaciji obogaćenih i konvencionalnih jaja (tretmana K i P1) statistički su se značajno razlikovali u $\sum$ SFA ($p = 0,041$) i sadržaju ALA ($P = 0,010$). Omjer $\sum n-6/\sum n-3$ PUFA u krvnom serumu ispitanika koji su konzumirali jaja iz K skupine, odnosno P1 skupine iznosio je 22,14:1 i 16,11:1. Ustanovljeno je smanjenje omjera $\sum n-6/n-3$ PUFA za 27,23% što se smatra u nutritivnom pogledu znatno povoljnijim.

Analiza biokemijskih pokazatelja u krvi ispitanika pokazala je da su u skupini koja je konzumirala jaja obogaćena s n-3 PUFA, smanjene vrijednosti MCV (fl), MVP (f) i urata ($P < 0,05$), a povećane vrijednosti MCHC (g/L) u odnosu na pokazatelje prije konzumiranja n-3 PUFA. Znanstveno je dokazana mogućnost obogaćivanja jaja s n-3 PUFA. Konzumacijom n-3 PUFA jaja, unose se značajne koncentracije α -linolenske, eikosapentaenske i dokosaheksaenske masne kiseline u organizam ispitanika koje dokazano, utječu na profil masnih kiselina u krvi, te povoljno djeluju na omjer $\sum n-6/\sum n-3$ PUFA i određene biokemijske pokazatelje.

Ključne riječi: n-3 PUFA, profil masnih kiselina, indeksi zdravlja jaja, kardiovaskularne bolesti

9. SUMMARY

Enrichment of eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids and the impact of egg consumption on human health

The dissertation investigates the processes of enriching consumption eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids and the impact of consumption of enriched eggs compared to eggs of conventional composition on human health. In order to achieve the intended goals, a review of the available literature was given, which included the following: structure and nutritional properties of eggs, fatty acid metabolism, modification of feed mixtures for laying hens, production performance of laying hens and egg quality, as well as the influence of eggs enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids on biochemical indicators and blood fatty acid profile of the respondents. The study used 480 TETRA SL layers, which were divided into three groups (treatments K, P1 and P2). The laying hens of the control group consumed feed with 5% soybean oil, the P1 group of laying hens consumed feed with a combination of 1.5% fish oil and 3.5% linseed oil, and the P2 group of laying hens received in feed 2% fish oil and 3% linseed oil. The mixtures were balanced at the level of 17% raw proteins and 12.60% MJ/kg ME. A sensory analysis of the eggs was performed and atherogenic, thrombogenic and hypo/hypercholesterolemic indexes were presented based on the content of fatty acids in the yolk lipids. The control mixture for layers contained 5.04%, P1 mixture 33.86%, and P2 mixture 33.59% $\sum$ n-3 PUFA. The ratio $\sum$ n-6/ $\sum$ n-3 PUFA was 10.28:1 in the control mixture, 0.69:1 in the P1 mixture and 0.68:1 in the P2 mixture. The experimental phase of the research was conducted for 28 days and feeding was *ad libitum*. The average live body weight of laying hens at the beginning of the research (K 2063.36 g, P1 2094.05 g, P2 2070.13 g) and at the end of the research (K 2066.11 g, P1 2099.91 g, P2 2076.16 g) did not differ significantly compared to the measurements at the beginning ($P=0.069$) nor at the end of the study ($P=0.086$). During the 3 weeks of the experiment, the egg laying intensity was 94.5% in all 3 groups. External quality indicators of fresh and eggs stored in the refrigerator at +4°C for 14 and 28 days did not differ between the treatments ($P>0.005$). Statistical analysis showed that feeding treatments only affected the pH values of egg whites ($P=0.001$), the time of keeping eggs affected the height of egg whites, color of yolks, Haugh units, and pH values of egg whites and yolks ($P=0.001$). Differences in the basic parts of eggs in absolute and relative indicators of K, P1 and P2 egg treatment and storage time in the refrigerator were not significant ($P>0.05$).

The sensory analysis of eggs (color, smell, taste and texture) performed using the triangle test showed that there is a statistically significant difference in the pairs of treatment K:P1 and treatment K:P2. The most frequently determined difference between pairs of treatments was in taste, followed by color and smell, while the rarest difference between pairs was in texture. During the implementation of the hedonic test, a statistically significant higher value of taste liking of treatment K than treatments P1 and P1 was determined ($P<0.05$). No statistically significant differences in TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) values (MDA mg/100 g) were found between the treatments of fresh or chilled eggs ($P>0.05$).

Fatty acid profiles in egg lipids depended on feeding treatments. The content of ALA in K, P1 and P2 groups of eggs was 65.48, 370.27 and 358.21 mg/100 g of edible parts of eggs ($P=0.001$). EPA was detected only in P1 and P2 groups of eggs, 29.14 and 31.06 mg/100 g of eggs. DHA in K, P1 and P2 groups of eggs was 84.40, 199.17 and 191.40 mg/100 g of eggs. $\sum$ n-3 PUFA in the same order was 149.88, 598.59 and 580.71 mg/100 g of eggs, and the ratios $\sum$ n-6/ $\sum$ n-3 PUFA were 10.36:1, 1.88: 1 and 1.98:1. The quality of yolk lipids was shown using atherogenic, thrombogenic and hypo/hypercholesterolemic indexes and the results showed the advantage of P1 and P2 treatment compared to K treatment.

Profiles of n-3 PUFAs in the blood of participants consuming enriched and conventional eggs (treatments K and P1) were statistically significantly different in $\sum$ SFA ($p=0.041$) and ALA content ($P=0.010$). The ratio $\sum$ n-6/ $\sum$ n-3 PUFA in the blood serum of participants who consumed eggs from the K group respectively the P1 group was 22.14:1 and 16.11:1. A decrease in the $\sum$ n-6/n-3 PUFA ratio by 27.23% was found, which is considered significantly more favorable from a nutritional point of view. The analysis of biochemical indicators in the blood of the participants showed that in the group that consumed eggs enriched with n-3 PUFA, the values of MCV (fl), MVP (f) and urate ($P<0.05$) decreased, and MCHC (g /L) in relation to the indicators before consumption of n-3 PUFA. The possibility of enriching eggs with n-3 PUFA has been scientifically proven. By consuming n-3 PUFA eggs, significant concentrations of α -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids are introduced into the body of the participants, which have been proven to affect the profile of fatty acids in the blood and have a favorable effect on the ratio of $\sum$ n-6 PUFA/ $\sum$ n-3 PUFA and certain biochemical indicators.

Key words: n-3 PUFA, fatty acid profile, egg health indexes, cardiovascular diseases

10. PRILOG

Popis slika

- Slika 1. Građa kokošnjeg jajeta, presjek
Slika 2. Dijelovi reproduktivnog sustava kokoši
Slika 3. Kemijska struktura n-3 PUFA i n-6 PUFA
Slika 4. Biokemija omega- 6 i omega-3 masnih kiselina
Slika 5. Tri faze autoksidacije
Slika 6. Shematski prikaz utjecaja PUFA na stanične odgovore
Slika 7. Nesilice u kavezima za vrijeme pokusa
Slika 8. Egg Multi-Tester uređaj za analizu unutarnje kvalitete jaja
Slika 9. Eggshell Force Gauge Model – II uređaj za mjerenje čvrstoće ljuske jaja
Slika 10. Mjerenje debljine ljuske jaja uporabom elektronskog mikrometra Insize, USA
Slika 11. Izgled kromatograma analize jednog uzorka (Z. Kralik, 2023.)
Slika 12. Pripremljeni uzorci za senzornu analizu

Popis grafikona

- Grafikon 1. Proizvodnja kokošnjih jaja od 2016. do 2021. godine u RH
Grafikon 2. a) i b). Sastav bjelanjka i žumanjka
Grafikon 3. Standardna krivulja za izračun oksidacije lipida u žumanjcima jaja
Grafikon 4. Omjer n-6 PUFA/n-3 PUFA u žumanjcima ispitivanih skupina
Grafikon 5. Udjeli (%) masnih kiselina u smjesi i žumanjcima jaja K tretmana
Grafikon 6. Udjeli (%) masnih kiselina u smjesi i lipidima žumanjaka jaja P1 tretmana
Grafikon 7. Udjeli (%) masnih kiselina u smjesi i lipidima žumanjaka jaja P2 tretmana
Grafikon 8. Prosječne vrijednosti svojstava dopadljivosti jaja dobivene hedonističkim testom
Grafikon 9. Omjer n-6/n-3 PUFA u krvnom serumu ispitanika

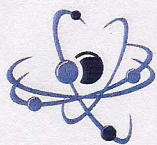
Popis tablica

- Tablica 1. Brojno stanje peradi, kokoši nesilica i samodostatnost u proizvodnji jaja u RH
Tablica 2. Nutritivni sastojci u 100 g konzumnih jaja
Tablica 3. Sastav PUFA u prehrambenim biljnim i ribljim uljima i ulju mikrolagi (g/100 g ukupnih masnih kiselina)
Tablica 4. Udio SFA i PUFA i omjer n-6: n-3 PUFA u različitim vrstama ulja
Tablica 5. Plan hranidbenih tretmana u pokusu (%)
Tablica 6. Sastav krmnih smjesa za nesilice (%)
Tablica 7. Kemijski sastav smjesa korištenih u pokusu (%)

- Tablica 8. Konzumacija n-3 PUFA prema skupinama ispitanika
- Tablica 9. Profil masnih kiselina u uljima (% od ukupnih masnih kiselina)
- Tablica 10. Profil masnih kiselina u hrani za nesilice (% od ukupnih masnih kiselina)
- Tablica 11. Živa masa nesilica na početku i na kraju istraživanja ($\bar{x} \pm \text{sd}$; g)
- Tablica 12. Proizvodni pokazatelji nesilica tijekom tri tjedna istraživanja
- Tablica 13. Pokazatelji vanjske kvalitete svježih jaja
- Tablica 14. Pokazatelji vanjske kvalitete jaja čuvanih 14 dana u hladnjaku na +4°C
- Tablica 15. Pokazatelji vanjske kvalitete jaja čuvanih 28 dana u hladnjaku na +4°C
- Tablica 16. Utjecaj hranidbenih tretmana i vremena čuvanja na pokazatelje unutarnje kvalitete jaja
- Tablica 17. Masa i udjeli osnovnih dijelova u jajima ispitivanih skupina; ($\bar{x} \pm \text{sd}$)
- Tablica 18. Profil masnih kiselina u žumanjcima (mg FA/100 g jestivog djela jaja)
- Tablica 19. Indikatori zdravstvene kvalitete lipida žumanjaka (eng. „Egg health indexes“)
- Tablica 20. Rezultati senzorne analize jaja pomoću triangl testa
- Tablica 21. Učestalost iskazivanja razlike u svojstvima pri provedbi triangl testa (%)
- Tablica 22. Osnovni statistički pokazatelji svojstava dopadljivosti jaja pri provedbi hedonističkog testa
- Tablica 23. Prosjeci i standardne devijacije tretmana po svojstvima dopadljivosti
- Tablica 24. Vrijednosti lipidne oksidacije (TBARS) u žumanjcima jaja ispitivanih skupina ($\mu\text{g MDA/g}$ žumanjka)
- Tablica 25. Učinak konzumacije konvencionalnih jaja (K skupina) i konzumacije jaja obogaćenih n-3 PUFA (P1 skupina) na profil masnih kiselina u serumu
- Tablica 26. Opće karakteristike ispitivane populacije na početku istraživanja
- Tablica 27. Arterijski krvni tlak ispitivanog uzorka ($\bar{x} \pm \text{sd}$)
- Tablica 28. Referentne vrijednosti biokemijskih pokazatelja
- Tablica 29. Učinak konzumacije konvencionalnih (K) i jaja obogaćenih n-3 PUFA (P1) na biokemijske pokazatelje u krvi ispitanika ($\bar{x} \pm \text{sd}$)

ŽIVOTOPIS

Ana Radanović (rođ. Zelić) rođena je 24.11.1989. godine u Osijeku, gdje je završila osnovno i srednjoškolsko obrazovanje. Diplomirala je na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku 2015. i stekla akademski naziv magistre inženjerka zootehnike. U prosincu 2015. godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Poljoprivredne znanosti, smjer Stočarstvo na istom fakultetu. Sudjeluje u istraživanju zadataka „Obogaćivanje jaja funkcionalnim sastojcima (omega-3 masnim kiselinama, luteinom, vitaminom E i selenom)“ i „Obogaćivanje pilećeg mesa funkcionalnim sastojcima (karnozinom, omega-3 masnim kiselinama i selenom)“ kao članica istraživačke skupine za istraživanje, proizvodnju i medicinsko ispitivanje funkcionalne hrane Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju. U 2012. godini je završila program stručnog osposobljavanja za poslove upravljanja projektnim ciklusom na Pučkom otvorenom učilištu Obrisi u Požegi i postala certificirana konzultantica za EU fondove. Od 2015. godine zaposlena je u konzultantskoj tvrtci Agro-Kovačević u Osijeku. Dosada je sudjelovala na više znanstvenih i stručnih skupova u Republici Hrvatskoj. Dobitnica je stipendije Osječko-baranjske županije za darovite učenike i studente za akademsku godinu 2013./2014. i 2014./2015., nagrade za najbolje izrađeni poster mladih znanstvenika te priznanja za postignut uspjeh u izvannastavnim aktivnostima u akademskoj godini 2013./2014. Dosada je u koautorstvu objavila dva A1 rada, dva A2 rad, četiri A3 rada, dva sažetka na međunarodnom skupu i jedan sažetak na domaćem skupu. Udana je i majka je dvoje djece.



Klasa: 602-04/19-09/7

Broj: 383-60-01-19-12

Osijek, 08.11. 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

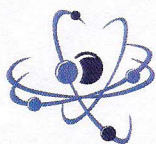
Primljeno: 12.11.2019		
Klasifikacijska oznaka	Ustroj. jed.	
643-02/19-04/01		
Urudžbeni broj	Pril.	Vrij.
1158-94-02-19-98		

PREDMET: Zamolba izv.prof.dr.sc. Zlate Kralik za mišljenje Etičkog povjerenstva u svrhu provođenja istraživanja u sklopu projekta „Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju“ za potrebe doktorske disertacije Ane Zelić, mag.ing.agr., pod nazivom **“Obogaćivanje jaja s n-3 polinezasićenim masnim kiselinama i utjecaj konzumacije jaja na ljudsko zdravlje”**

Mišljenje Etičkog povjerenstva Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku 2/2019

Temeljem zamolbe i uvida u zamolbu s priloženom dokumentacijom koju je ovom Povjerenstvu predala **dr.sc. Zlata Kralik**, izv.prof., a u svrhu provođenja istraživanja vezanog uz projekt “Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju” za potrebe doktorske disertacije Ane Zelić, mag.ing.agr., pod nazivom **“Obogaćivanje jaja s n-3 polinezasićenim masnim kiselinama i utjecaj konzumacije jaja na ljudsko zdravlje”** koje će biti provedeno na farmi “Marijančanka” u Marijanskim Ivanovcima u svrhu proizvodnje n-3 PUFA jaja – istraživanja se provode na nesilicama hibrida TETRA SL. Drugi dio istraživanja obavljat će se u kliničkim uvjetima na Medicinskom fakultetu u Osijeku. Ispitivanja će se obavljati na volonterima, a istražiti će se djelovanje obogaćenih n-3 PUFA jaja na ljudski organizam. Etičko povjerenstvo Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku na svojoj 2. sjednici održanoj do 06.-08.11.2019. godine zaključilo je da:

- Izv.prof.dr.sc. Zlata Kralik, kao voditelj projekta i istraživanja posjeduje odgovarajuće stručne i znanstvene preduvjete za korektnu i uspješnu realizaciju predloženog istraživanja;
- da predloženo istraživanje glede svrhe i ciljeva istraživanja može rezultirati novim znanstvenim/stručnim spoznajama u tome području;
- da su plan rada i metode istraživanja u skladu s etičkim i znanstvenim standardima;
- da su plan rada i metode istraživanja, ukupan broj, odabir, uključivanje, obaviještenost i suglasnost ispitanika/zakonskih zastupnika, u skladu s etičkim i znanstvenim standardima;
- da su predvidivi rizici i opasnosti u odnosu prema pretpostavljenoj znanstvenoj koristi, osmišljeni uz najmanje moguće izlaganje riziku i /ili opasnosti po zdravlje istraživača, suradnika u istraživanju i opće populacije, u skladu s inauguriranim temeljnim etičkim principima i ljudskim pravima u biomedicinskim



istraživanjima u području medicine i zdravstva, uključujući standarde korištenja i postupka s humanim biološkim materijalom u znanstvenim i stručnim biomedicinskim istraživanjima

Temeljem gore navedenog, *Etičko povjerenstvo Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku izražava mišljenje:*

da su tema i predložen znanstveno-istraživački projekt voditelja izv.prof.dr.sc. Zlate Kralik multidisciplinarno etički prihvatljivi, s napomenom da za svako eventualno odstupanje od najavljenog istraživanja izv.prof.dr.sc. Zlata Kralik kao voditelj projekta i istraživanja mora obavijestiti i ponovno zatražiti mišljenje i suglasnost *Etičkog povjerenstva Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.*

Predsjednica Etičkog povjerenstva

Znanstvenog centra izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju

Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

Prof.dr.sc. Slavica Kvolik, dr med



MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

ETIČKO POVJERENSTVO

Suglasnost za sudjelovanje odraslog ispitanika u istraživanju

1. Potvrđujem da sam dana _____ (upisati dan/mjesec/godinu) u _____ (upisati mjesto) pročitao/pročitala Obavijest za ispitanika za znanstveno istraživanje pod nazivom ***Utjecaj konzumacije kokošnjih jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama na kardiovaskularnu funkciju i imunološki sustav kod zdravih mladih ispitanika i sportaša*** te sam imao/imala priliku postavljati pitanja.
2. Razumijem da je moje sudjelovanje dragovoljno i da se iz sudjelovanja u istraživanju mogu povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica za moje zdravstveno stanje ili pravni status.
3. Razumijem da mojoj medicinskoj dokumentaciji pristup imaju samo odgovorne osobe, to jest voditelj istraživanja i njegovi suradnici te članovi Etičkog povjerenstva ustanove u kojoj se istraživanje obavlja i Etičkog povjerenstva koje je odobrilo ovo znanstveno istraživanje. Tim osobama dajem dopuštenje za pristup mojoj medicinskoj dokumentaciji.
4. Želim i pristajem sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime ispitanika: (upisati tiskanim slovima)

Vlastoručni potpis: (potpisati)

Mjesto i datum: (upisati)

Ime i prezime osobe koja je vodila postupak Obavijesti za ispitanika i Suglasnosti za sudjelovanje: (upisati tiskanim slovima)

Ime i prezime istraživača: (upisati tiskanim slovima) _____

Vlastoručni potpis: (potpisati) _____

Mjesto i datum: (upisati) _____

Datum: _____

24 Hour Food Recall

- obrazac -

IME I PREZIME: _____

DATUM ROĐENJA: _____

SPOL: Ž M

VISINA: _____

TEŽINA: _____

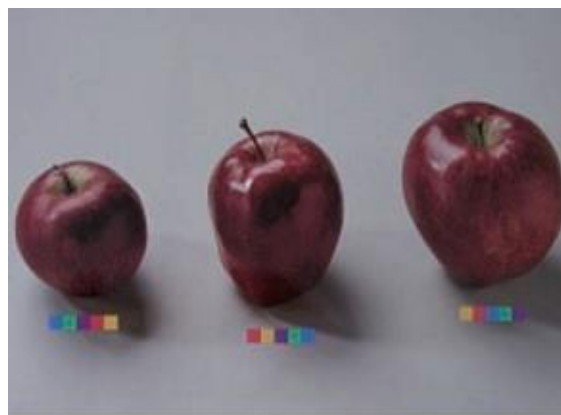
Svaki ispitanik na prvom mjerenju dobije 3 identična obrasca za praćenje konzumacije namirnica u posljednja 24 sata. Ispunjene obrasce predaje istraživaču na zadnjem mjerenju. Dva obrasca se ispunjavaju za vrijeme radnog tjedna (npr. ponedjeljak i četvrtak), a treći za vrijeme vikenda (npr. nedjelja). Ispitanik će biti obaviješten porukom ili e-mailom od strane ispitivača kada treba popuniti obrazac za dan ranije. Obrazac je sastavljen u obliku tablice koja sadrži 4 glavne podjele: **DORUČAK**, **RUČAK**, **VEČERA** i **MEĐUOBROK**. Svaki obrok podrazumijeva hranu i piće. Obroci su podijeljeni na: **VOĆE** (sviježe/sušeno), **POVRĆE** (sviježe/smrznuto/kuhano/pečeno), **MLIJEČNI PROIZVODI** (mlijeko/sir/jogurt), **MESO** (bijelo/crveno/riba/prerađevine), **UGLJIKOHIDRATI** (kruh/tijestenina/peciva/krumpir/riža), **ŽITARICE** (zobene/kukuruzne/zaslađene), **PIĆE** (voda/mineralna voda/kava/kava s mlijekom/čaj/prirodni sok/gazirani sok/alkohol), **GRICKALICE** (čokolada/čips/keksi/kolači), **ORAŠASTI PLODOVI** (bademi/lješnjaci/orasi). Uzima se u obzir način pripreme te veličina porcija ovisno o kojoj namirnici se radi. Ispitanik popunjava tablicu na način da stavlja pluseve na mjesta predviđena za to, a u skladu s onim što je tog dana konzumirao i na koji način je pripremljeno. Nakon svakog obroka nalazi se odjeljak pod nazivom **KOMENTAR** gdje je potrebno naglasiti da li je ispitanik uzimao nekakav dodatak prehrani odnosno bilo što što bi moglo značajnije utjecati na unos nutrijenata taj dan ili pak ako ne postoji navedeno u tablici ono što je konzumirano može se nadopisati ispod tablice. Ukoliko je neki od obroka preskočen također naznačiti.

***PORCIJE**: mala - pola šalice ili kriške (pola normalne); srednja - šalica ili kriška ili komad (normalna porcija); velika - 2 šalice ili kriške ili komada (2x normalna)

***KONZUMACIJA** (mliječni proizvodi i orašasti plodovi): zasebno – šalica mlijeka, komad sira, šaka badema; kao dio – žitarice sa mlijekom, sendvič sa sirom, žitarice sa orašastim plodovima.

Veličina porcija obroka:

Datum: _____



DORUČAK		MLIJEČNI PROIZVODI		NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina			Datum: _____	
			PODJELA	zasebno	kao dio	mala	srednja	Velika		
			Sir							
			Mlijeko							
			Jogurt							

		MESO		NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina		
			PODJELA	sirovo	kuhano	pečeno	prženo	Mala	srednja	velika
			Bijelo meso							
			Crveno meso							
			Riba							
			Prerađevine							

		UGLJIKOHIDRATI		NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina		
			PODJELA	sirovo	kuhano	pečeno	prženo	Mala	srednja	velika
			Kruh							
			Peciva							
			Tijestenina							
			Krumpir							
			Riža							

Datum: _____

DORUČAK	VOĆE		NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina				
		PODJELA	sviježe	sušeno	mala	srednja	Velika		
		Jabuka/Kruška							
		Banana							
		Bobičasto							

	POVRĆE		NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina		
		PODJELA	sviježe	smrznuto	kuhano	pečeno	Mala	srednja	velika
		Mahunarke							
		Gomoljasto/Korijenasto							
		Kupusnjače							
		Lukovice							
		Tikve							

	ŽITARICE		VELIČINA PORCIJE/količina						
		PODJELA	mala	srednja	velika				
		Zobene							
		Kukuruzne							
		Zaslađene							

Datum: _____

DORUČAK	ORAŠASTI PLODOVI		NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina				
		PODJELA	zasebno	kao dio	mala	srednja	Velika		
		Bademi							
		Lješnjaci							
		Orasi							
	PIĆE		KOLIČINA						
		PODJELA	Čaša/šalice	2x	3x	5x	Više od 5x		
		Voda							
		Mineralna voda							
		Kava							
		Kava s mlijekom							
		Čaj							
		Prirodni sok							
		Gazirani sok							
		Alkohol							

KOMENTAR:

Datum: _____

RUČAK	MESO		NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina		
		PODJELA	sirovo	kuhano	pečeno	prženo	Mala	srednja	velika
		Bijelo meso							
		Crveno meso							
		Riba							
	UGLJIKOHIDRATI		NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina		
		PODJELA	sirovo	kuhano	pečeno	prženo	Mala	srednja	velika
		Kruh							
		Peciva							
		Tijestenina							
		Krumpir							
		Riža							
	POVRĆE		NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina		
		PODJELA	sviježe	smrznuto	kuhano	pečeno	mala	srednja	velika
		Mahunarke							
		Gomoljasto/Korijenasto							
		Kupusnjače							
		Lukovice							
		Tikve							

Datum: _____

RUČAK	PIĆE		KOLIČINA						
		PODJELA	Čaša/šalica	2x	3x	5x	Više od 5x		
		Voda							
		Mineralna voda							
		Kava							
		Kava s mlijekom							
		Čaj							
		Prirodni sok							
		Gazirani sok							
		Alkohol							
	JUHE		PORCIJA						
		PODJELA	1x	2x	3x				
		Pileća							
		Goveđa							
		Povrtna							
		Krem							

KOMENTAR:

Datum: _____

VEČERA	MLIJEČNI PROIZVODI		NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina				
		PODJELA	zasebno	kao dio	mala	srednja	velika		
		Sir							
		Mlijeko							
		Jogurt							

	MESO		NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina		
		PODJELA	sirovo	kuhano	pečeno	prženo	mala	srednja	velika
		Bijelo meso							
		Crveno meso							
		Riba							
		Prerađevine							

	UGLJIKOHIDRATI		NAČIN PRIPREME				VELIČINA PORCIJE/količina		
		PODJELA	sirovo	kuhano	pečeno	prženo	mala	srednja	velika
		Kruh							
		Peciva							
		Tijestenina							
		Krumpir							
	Riža								

Datum: _____

VEČERA	VOĆE		NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina				
		PODJELA	sviježe	sušeno	mala	srednja	velika		
		Jabuka/Kruška							
		Banana							
		Bobičasto							

	POVRĆE		NAČIN PRIPREME			VELIČINA PORCIJE/količina			
		PODJELA	sviježe	smrznuto	kuhao	pečeno	mala	srednja	velika
		Mahunarke							
		Gomoljasto/Korijenasto							
		Kupusnjače							
		Lukovice							
		Tikve							

	ŽITARICE		VELIČINA PORCIJE/količina						
		PODJELA	mala	srednja	velika				
		Zobene							
		Kukuruzne							
		Zaslađene							

Datum: _____

VEČERA	PIĆE		KOLIČINA						
		PODJELA	Čaša/šalice	2x	3x	5x	Više od 5x		
		Voda							
		Mineralna voda							
		Kava							
		Kava s mlijekom							
		Čaj							
		Prirodni sok							
		Gazirani sok							
		Alkohol							

KOMENTAR:

Datum: _____

MEĐUOBROK	ORAŠASTI PLODOVI		NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina		
		PODJELA	zasebno	kao dio	mala	srednja	velika
		Bademi					
		Lješnjaci					
		Orasi					

	VOĆE		NAČIN KONZUMACIJE		VELIČINA PORCIJE/količina		
		PODJELA	sviježe	sušeno	mala	srednja	velika
		Jabuka/Kruška					
		Banana					
		Agrumi					
		Bobičasto					

	GRICKALICE		VELIČINA PORCIJE/količina				
		PODJELA	mala	srednja	velika		
		Čokolada					
		Čips					
		Keksi					
		Kolači					

Datum: _____

	PIĆE		KOLIČINA				
		PODJELA	Čaša/šalica	2x	3x	5x	Više od 5x
		Voda					
		Mineralna voda					
		Kava					
		Kava s mlijekom					
		Čaj					
		Prirodni sok					
		Gazirani sok					
		Alkohol					

KOMENTAR: