

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

Tina Stuhne, Iva Radičević, Katarina Bencetić

**Utjecaj različitih hranidbenih smjesa na masnokiselinski profil i
koncentraciju malondialdehida u mišićnom tkivu hame
Argyrosomus regius (Asso, 1801)**

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Daniela Matulića u suradnji s tvrtkom Cromaris d.d. i Institutom Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2017/2018.

POPIS KRATICA

| | |
|---|---|
| CF Komercijalna hrana za hamu - BIOMAR EFICO SIGMA 862 | C14:0 Miristinska kiselina |
| DNA Deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>Deoxyribonucleic acid</i>) | C15:0 Pentadekanska kiselina |
| EXF Eksperimentalna hrana (Cromaris d.d.) | C16:3(n-3) Heksadekatrienska kiselina |
| GC Plinska kromatografija (eng. <i>Gas Chromatography</i>) | C16:1(n-7) Palmitoleinska kiselina |
| HNE Hidroksinenali | C16:0 Palmitinska kiselina |
| MDA Malondialdehidi | C17:1(n-9) Heptadekanska kiselina |
| MUFA Mononezasićene masne kiseline | C18:3(n-3) Linolenska kiselina |
| NCF Komercijalna hrana za lista - BIOMAR EFICO SIGMA 874) | C18:2(n-6) Linoleinska kiselina |
| PUFA Višestruko nezasićene masne kiseline (eng. <i>Polyunsaturated fatty acids</i>) | C18:1 Oleinska |
| ROS Reaktivni oblici kisika (eng. <i>Reactive Oxygen Species</i>) | C18:0 Stearinska kiselina |
| SD Standardna devijacija | C20:4(n-6) ARA Arahidonska kiselina |
| SFA Zasićene masne kiseline (eng. <i>Saturated fatty acids</i>) | C20:5(n-3) EPA Eikosapentaenska kiselina |
| TBARS Metoda s reaktivnim spojevima tiobarbiturne kiseline | C20:3(n-6) Dihomo-gama-linolenska kiselina |
| TL Ukupna duljina tijela (eng. <i>Total length</i>) | C20:1(n-7) Paolininska kiselina |
| UNSFAs Nezasićene masne kiseline (eng. <i>Unsaturated fatty acids</i>) | C20:0 Arahidna kiselina |
| W Ukupna masa tijela (eng. <i>Weight</i>) | C22:6(n-3) DHA Dokosaheksaenska kiselina |
| | C22:4(n-6) Adrena kiselina |
| | C22:1(n-9) Eukonska kiselina |
| | C22:0 Behenska kiselina |
| | C24:1 Tetrakozenska kiselina |

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. Uvod | 1 |
| 1.1. Hama (<i>Argyrosomus regius</i>) – Biologija i akvakultura..... | 1 |
| 1.2. Oksidacijski stres | 2 |
| 1.3. Masne kiseline i njihova važnost kod riba..... | 3 |
| 2. Hipoteze te opći i specifični ciljevi rada | 5 |
| 3. Materijali i metode | 6 |
| 3.1. Hranidbeni pokus..... | 6 |
| 3.2. Određivanje masnokiselinskog profila uz pomoć plinske kromatografije | 8 |
| 3.2.1. Saponifikacija..... | 8 |
| 3.2.2. Metiliranje | 8 |
| 3.2.3. Ekstrakcija..... | 8 |
| 3.3. Određivanje koncentracije malondialdehida | 9 |
| 3.4. Statistička obrada podataka | 9 |
| 4. Rezultati | 10 |
| 4.1. Koncentracija MDA kao indikator oksidativnog stresa | 11 |
| 4.2. Masno-kiselinski profil mišićnog tkiva hame | 12 |
| 5. Rasprava | 14 |
| 6. Zaključci..... | 17 |
| 7. Literatura | 19 |
| 8. Sažetak | 23 |
| 9. Summary | 24 |
| 10. Prilozi | 25 |

1. Uvod

Akvakultura je jedna od najbrže rastućih aktivnosti u proizvodnji hrane u posljednjih nekoliko godina, s prosječnom godišnjom stopom rasta od 6 – 8% (FAO, 2018). Od vrsta koje dominiraju hrvatskom marikulturom prisutne su: lubin (*Dicentrarchus labrax*), orada (*Sparus aurata*) te atlanska plavoperajna tuna (*Thunnus thynnus*), no u posljednjem desetljeću i hama (*Argyrosomus regius*) koja postaje sve važnija vrsta u mediteranskoj akvakulturi. Hranidba riba predstavlja jedan od najzahtjevnijih tehnoloških postupaka kod kaveznog uzgoja riba te ima ključnu ulogu u intenzivnoj akvakulturi jer utječe na troškove proizvodnje (40 - 60% troškova), rast i zdravlje organizma u uzgoju (Villeda, 2013). Dobro upravljano hranidbom uvelike se pridonosi postizanju optimalne konverzije hrane i prirasta ribe, kao i na smanjenje utjecaja na okoliš (Bogut i sur., 2016).

1.1. Hama (*Argyrosomus regius*) – Biologija i akvakultura

Hama (krb, grb, krap), *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) jest riba koja pripada razredu koštunjača (*Osteichthyes*), podrazredu zrakoperki (*Actinopterygii*), nadredu pravih koštunjača (*Telostei*), skupini redova tvrdoperke (*Acanthopterygii*), redu grgečki (*Perciformes*), podredu pravih grgeča (*Percoidei*) i porodici sjenki (*Sciaenidae*). Prirodno obitava na istočnom dijelu Atlantika od Gibraltara do Konga, uključujući i Mediteransko i Crno more (Kružić i sur., 2016). Hama pripada veličinom najvećim sjenkama, može narasti do 2 metra duljine i mase od 70 kg. Tijelo joj je izduženo, bočno spljošteno, sivosrebrnaste boje s brončanim odsjajem te uskim i kosim prugama smeđe boje na leđima (Jardas, 1996). Priobalna je vrsta ribe koja preferira mutnije vode s pjeskovitim i stjenovitim dnom te se uglavnom zadržava na manjim dubinama iako može obitavati i na dubinama do 200 metara (slika 1). Karnivorna je vrsta, a u prirodi, mlađ se hrani malom demerzalnom ribom i rakovima, dok odrasle jedinke love pelagičnu ribu i glavonošce.



Slika 1. Hama (*Argyrosomus regius*) (Izvor: I. Radičević, 2017.)

Povijest hame u akvakulturi je donedavna. Prvi pokusi na divljim sjenkama provedeni su sredinom devedesetih godina prošlog stoljeća na jugu Francuske (FAO, 2018). Tehnologija uzgoja slična je tehnologiji koja se koristi pri uzgoju lubina i komarče. Korištena hrana u uzgoju po kemijskom sastavu slična je hrani koja se koristi za ostale mediteranske vrste. Najčešće se upotrebljava hrana koja sadrži 45 - 48% sirovih proteina i 20 - 24% sirovih masti (FAO, 2018).

Biologija hame čini ju zanimljivim kandidatom za razvoj akvakulturnog uzgoja. Neke od značajnijih bioloških karakteristika su: prilagodba različitim uvjetima okoliša, brz rast, dobra konverzija. Nadalje ova vrsta posjeduje i kvalitetu pogodnu za industrijsku preradu (Calderon i sur., 1997; Poli i sur., 2003; Hernández i sur., 2009; Martínez-Llorens i sur., 2011).

U usporedbi sa najvažnijim akvakulturnim vrstama Mediterana (lubin i komarča), hama ima prednost zbog velike brzine rasta, gdje već u desetomjesečnom uzgoju ostvaruje težinu od 1 kilograma, a komercijalnu težinu od 1,5 do 3 kilograma, ostvaruje u 2 godine (Jiménez i sur., 2005; Martínez-Llorens i sur., 2011).

U Hrvatskoj se hama počela uzgajati od 2000. godine na području Zadarske županije (Kružić i sur., 2016). Proizvodnja u Hrvatskoj je od 2009. do 2015. godine porasla s 20 do 70 tona, a najveći proizvođač danas je tvrtka Cromaris d.d.

1.2. Oksidacijski stres

Uvjeti u komercijalnoj akvakulturi često uključuju stanja visokog oksidacijskog stresa, kao što su visoke gustoće nasada, manipulativne radnje među kojima spadaju sortiranje, inducirani mrijest, vakcinacija, transport, zatim poremećaje u životnoj sredini (razina kisika, temperatura), izloženost suncu itd. Djelovanjem različitih biotičkih i abiotičkih čimbenika dolazi do pomaka ravnoteže u staničnim oksidacijsko – redukcijским reakcijama prema oksidaciji kao i do prekomjernog stvaranja reaktivnih dušikovih tvari. Nemogućnost organizma da kontrolira njihovu razinu pomoću različitih enzimatskih i neenzimatskih antioksidansa rezultira nastanku oksidacijskog stresa (Sies, 1985). Antioksidanti su sve one tvari koje u maloj količini, u kratkom vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidansa (Bradamante, 2002). Stanice stalno proizvode slobodne radikale i reaktivne oblike kisika kao dio metaboličkih procesa. U stanju oksidacijskog stresa dolazi do porasta ROS-a u organizmu ili tkivima, te dolazi do oštećenja nukleinskih kiselina (DNA), proteina i lipida stanične membrane. Višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) često su meta stvorenih slobodnih radikala te često zbog toga podliježu lipidnoj peroksidaciji. Zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu, mnogo su otpornije prema

djelovanju ROS-a (Reaktivni oblici kisika) negoli PUFA-e. *In vitro* proučavanja pokazala su da dokozahexaenska kiselina (C22:6) ima pet puta veću sposobnost oksidacije od linolne kiseline (C18:2). Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal (OH•), no i mnogi drugi radikali mogu pokrenuti proces peroksidacije. Oštećenje lipida može se odrediti mjerenjem količine malondialdehida (MDA), 4 hidroksinonenala (HNE), izoprostana te drugih produkata lipidne peroksidacije (Štefan i sur., 2007). Nastanak malondialdehida rezultat je lipidne peroksidacije masnih kiselina (Davey i sur., 2005). ROS razlaže tj. degradira polinezasićene masne kiseline stvarajući malondialdehide (Pryor i Stanley, 1975).

Najčešće korištena metoda za utvrđivanje oksidacijskog stresa je TBARS test (metoda s reaktivnim spojevima tiobarbiturne kiseline), kojim se utvrđuju formacije reaktivnog aldehida, malodialdehida (MDA), produkta sekundarne lipidne peroksidacije (Draper i sur., 1993.; Janero, 1990). Lipidna peroksidacija koristi se kao pokazatelj oksidacijskog stresa u stanicama i tkivima prilikom njihova oštećenja. Stresori koji mogu uzrokovati oksidacijski stres kod riba uključuju hipoksiju, hiperoksiju (Ritola i sur., 2002a; 2002b), toplinski stres (Parihar i sur., 1996), nestašica hrane (Pascual i sur., 2003) ali i riblje bolesti kao što su žutica i methemoglobinemija (Jensen, 1996). Neka od istraživanja utjecaja različitih agenasa na oksidativni stres izvršena su i kod ribljih vrsta sjenke (Zhou i sur. 2010) te orade (Pascual i sur., 2003).

1.3. Masne kiseline i njihova važnost kod riba

Brojna istraživanja pokazuju da na sastav masnih kiselina u hrani životinjskog podrijetla značajno utječe niz čimbenika, kao što su: hranidba, dob, tjelesna masa, anatomska pozicija, spol i genotip životinje. Količina masti u mesu riba varira od 0,7% do 20%, a ponekad i više. Riba se na osnovi raspodjele masti dijeli na plavu i bijelu. Plava riba pohranjuje masti u masnim stanicama po cijelom tijelu, a bijela u jetru i donekle trbušnu šupljinu. Udio masti u bijeloj ribi je nizak, napose u mesu gdje čini oko 1%, a od toga oko 90% čine strukturalne masti ili fosfolipidi (Bogut i sur., 1996). Lipidi u ribljoj hrani su jedini izvor esencijalnih masnih kiselina te utječu na teksturu i okus riblje hrane te, posljedično, i na teksturu te okus ribljeg mesa (Bogut i sur., 1996). Osim u hranidbi riba, masne kiseline pogotovo ω -3 masne kiseline važne su i u ljudskoj prehrani jer smanjuju opasnost od nakupljanja masti u krvi i bolesti krvožilnog sustava. Do danas je objavljen veliki broj znanstvenih radova koji idu u prilog ω -3 masnim kiselinama, međutim, unos ribe koja je najbolji izvor ovih tvari u Hrvatskoj još je uvijek nedovoljan (Tomić i sur., 2016).

Kao jedan od posebno značajnih sastojaka ribljeg mesa navode se ω -3 masne kiseline a jedna od najizazovnijih prehrambenih mjera koja može imati značajan utjecaj na zdravlje populacije, jest povećan unos ω -3 masnih kiselina poput alfa-linolenske kiseline (ALA), eikozapentaenske kiseline (EPA) i dokozaheksaenske kiseline (DHA).

Riblja mast je uglavnom sastavljena od dugolančanih (14–22 C atoma) te nezasićenih masnih kiselina (60-84%) i to su u morske ribe oko 88% visoko nezasićene masne kiseline s 5 ili 6 dvostrukih veza (Stansby i Hall, 1967), a što ih čini posebice podložnim oksidacijskim procesima. Od zasićenih su masnih kiselina u mastima riba zastupljene palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0), miristinska (C14:0), a samo kod nekih vrsta riba u maloj koncentraciji i laurinska masna kiselina (C12:0). Mononezasićene masne kiseline su u najvećem postotku oleinska (C18:1) i palmitoleinska (C16:1). Osim njih, u lipidima riba od mononezasićenih masnih kiselina prisutne su još i miristoleinska (C14:1), eikozaenska (C20:1), eručna (C22:1n9). Posljednje dvije masne kiseline se u najvećoj koncentraciji nalaze u mastima morskih riba. Od ω -6 masnih kiselina u lipidima riba, uz najznačajnije linolnu (C18:2n6) te arahidonsku (AA, C20:4n6), analizom se mogu utvrditi i eikozadienska (C20:2n6), eikozatrienska (C20:3n6), dokozaetraenska (C22:4n6) i dokozapentaenska (C22:5n6). Najvažniji članovi ω -3 skupine su uz α -linolensku kiselinu (C18:3n3), eikosapentaenoična (EPA, C20:5n3) i dokozaheksaenoinska (DHA, C22:6n3) masna kiselina. Osim njih, u lipidima riba od ω -3 masnih kiselina utvrđene su još i stearidonska (C18:4n3), eikosatrienoična (C20:3n3), eikosatetraenoična (C20:4n3) (Bogut i sur., 1996).

Različite komparacije divlje-ulovljenih s uzgojenim vrstama riba te utjecaj hranidbenh smjesa na lipidne karakteristike istraživali su kod hame (Sinanoglou i sur. 2014; Chatzifotis i sur., 2012; Grigorakis i sur., 2011; Martinez – Lloreus i sur., 2011) te lubina (Mnari Bhouri i sur., 2010).

2. Hipoteze te opći i specifični ciljevi rada

Hipoteze:

- Hranidba hame hranidbenim smjesama različitog kemijskog sastava značajno će utjecati na masnokiselinski profil mišićnog tkiva i koncentraciju malondialdehida kao indikatora oksidativnog stresa
- Eksperimentalna hrana, zbog većeg udjela masti u svom kemijskom sastavu, imati će veći udio lipida u mišićnom tkivu ribe
- Eksperimentalna hrana, zbog većeg udjela masti u svom kemijskom sastavu, imati će povoljniji masnokiselinski sastav

Opći ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) Provesti hranidbu hame hranidbenim smjesama različitog kemijskog sastava u trajanju od 17 mjeseci
- 2) Svakodnevno mjeriti temperaturu mora
- 3) Pravilno izlučiti ribu iz pokusa, uzorkovati te analizirati uzorke referentnim metodama

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) Odrediti i usporediti na koji način hranidba s različitim kemijskim sastavom utječe na sastav masnih kiselina mišićnog tkiva hame
- 2) Odrediti koncentraciju malondialdehida u mišićnom tkivu hame kao indikatora oksidativnog stresa

3. Materijali i metode

3.1. Hranidbeni pokus

Pokus je proveden na uzgajalištu Bisage pod koncesijom tvrtke Cromaris d.d. (otočić Bisage, 44⁰01'28.6"N 15⁰13'11.2"E) u Zadarskom akvatoriju tj. u blizini uvale Mala Lamjana (slika 2). Izveden je u 6 akvakulturnih kaveza pojedinačnih dimenzija 9x5x5 m (V=225 m³), odnosno 3 hranidbena tretmana: CF (komercijalne hrane za hamu), EXF (eksperimentalne hrane Cromaris) i NCF (komercijalne hrane za lista) s 2 ponavljanja, u trajanju od 17 mjeseci tj. u razdoblju od 5. srpnja 2016. - 27. studenog 2017. godine. Temperatura mora mjerena je svakodnevno na dubini od 2 m. Najveća izmjerena dubina uvale jest 37 m te se uvala kategorizirala plitkom.



Slika 2. Lokacija istraživanja - uzgajalište Bisage (Izvor: D. Matulić, 2017)

Riba je hranjena do sitosti 3 do 7 puta dnevno, ovisno o dobi i sezoni, hranom različitog kemijskog sastava (CF, SP=48,0, SM=16,0; EXF, SP=52,0, SM=21,0; NCF, SP=56,0; SM=18,0) (tablica 1). Pothlađena riba dopremljena je u pogon za sortiranje i prerađivanje ribe. Mjerena je ukupna duljina tijela TL (cm) pomoću ihtimetra i ukupna masa tijela W (g) svake jedinice na vagi. Iz svakog hranidbenog tretmana uzorkovano je tkivo u području podrepne peraje i pohranjeno u epruvete koje su se do laboratorijskog određivanja masnokiselinskog sastava i koncentracije malondialdehida čuvale na temperaturi od -80°C na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu (slika 3).



Slika 3. Uzorkovanje i pohranjivanje uzoraka (Izvor: T. Stuhne, 2017)

Tablica 1. Kemijski sastav komercijalne hrane za hamu (CF), komercijalne hrane za lista (NCF) te eksperimentalne hrane u istraživanju (EXF)

| | CF | NCF | EXF |
|-------------------------------------|-----------|------------|------------|
| <i>Sastav %</i> | | | |
| Proteini | 48,0 | 56,0 | 52,0 |
| Sirove masti | 16,0 | 18,0 | 21,0 |
| Sirova vlakna | 3,0 | 0,4 | 0,7 |
| Pepeo | 8,3 | 10,4 | 11,4 |
| P | 1,12 | 1,65 | 1,6 |
| Ca | 1,87 | 2,11 | 2,4 |
| Na | 0,38 | 0,68 | 0,9 |
| <i>Vitamini (UI/kg)*</i> | | | |
| Vit. A | 15000 | 15000 | 15000 |
| Vit D3 | 800 | 800 | 2500 |
| Vit C | - | - | 500 |
| <i>Elementi u tragovima (mg/kg)</i> | | | |
| Cu | 4,1 | 1,5 | 4,7 |
| Mn | 12 | 12 | - |
| Na (µg/kg) | - | - | 438 |
| Zn | 75 | 75 | 301 |
| I | 1,8 | 1,8 | 4,6 |
| <i>Antioksidansi (mg/kg)</i> | | | |
| Propil galat | 100 | 100 | 22 |
| BHA* | 100 | 100 | - |

*UI – oznaka internacionalne jedinice, [†]BHA – Butil – hidroksianisol; **CF** - BIOMAR EFICO SIGMA 862; **NCF** – BIOMAR EFICO SIGMA 874; **EXF** – CROMARIS

3.2. Određivanje masnokiselinskog profila uz pomoć plinske kromatografije

Svaki uzorak izvagan je i otopljen u 30 mL CHCl_2 : Metanol u omjeru 2:1 te je ostavljen minimalno 48 sati u inkubatoru na 34°C uz povremeno miješanje na vortexu. Nakon inkubacije tekući sadržaj prebačen je u lijevak za odjeljivanje preko grubog naboranog filter papira uz dodatak zasićene količine vodene otopine NaCl kako bi se odvojile faze, organska od tekuće. Nakon 12 sati kada su faze odijeljene, (donja) organska faza odijeljena je preko naboranog finog filter papira i anhidrida (Na_2SO_4) u prethodno izvagane okrugle tikvice. Organski talog u tikvici ponovno je otopljen u CH_2Cl_2 i prebačen u reakcijske epruvete.

3.2.1. Saponifikacija

Organskom talogu dodaje se 2 mL 1.2M NaOH otopljenog u metanolu i vodi. Epruvete se čvrsto zatvore čepovima osiguranim sa unutrašnje strane teflonom te se kuhaju 30 minuta u kipućoj kupelji. Nakon kuhanja uzorci se uklone iz vodene kupelji te se hlade na sobnoj temperaturi.

3.2.2. Metiliranje

Saponifikat dobiven u prethodnom koraku zakiseli se dodavanjem 1mL 6M HCl. Zatim se dodaje 2mL $\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ kako bi se katalizirala reakcija metiliranja te se ponovno 10 minuta kuha na 85°C u vodenoj kupelji i hlade na sobnoj temperaturi. Kada se reakcijska smjesa ohladi dodaje se 5mL CH_2Cl_2 , epruvete se ponovno čvrsto zatvore i pažljivo se tri minute mućkaju okretanjem u ruci za 180° . Uzorci se puste preko noći da se faze u potpunosti razdvoje i izbistri zakiseljeni vodeni (gornji) sloj.

3.2.3. Ekstrakcija

Nakon što se faze odjele, (gornji) vodeni dio ukloni se pomoću staklene sisaljke na vakuum, a (donji) organski dio se preko naboranog finog papira i anhidrida (Na_2SO_4) prebaci u konusne epruvete, gdje se sadržaj upari i otopi u željenoj količini CH_2Cl_2 i prenese u vialu za kromatografske analize.

Analiza je vršena uz pomoć plinskog kromatografa (Agilent Technologies 7683 series Injector, 6890 Network GC System, 5973 Network, Mass Selective Detector).

3.3. Određivanje koncentracije malondialdehida

Koncentracija MDA mjerena je protokolom prema Grotto. Prije same analize, tkivo je homogenizirano u 0,14M KCL-u, na Ultra Turrax homogenizatoru.

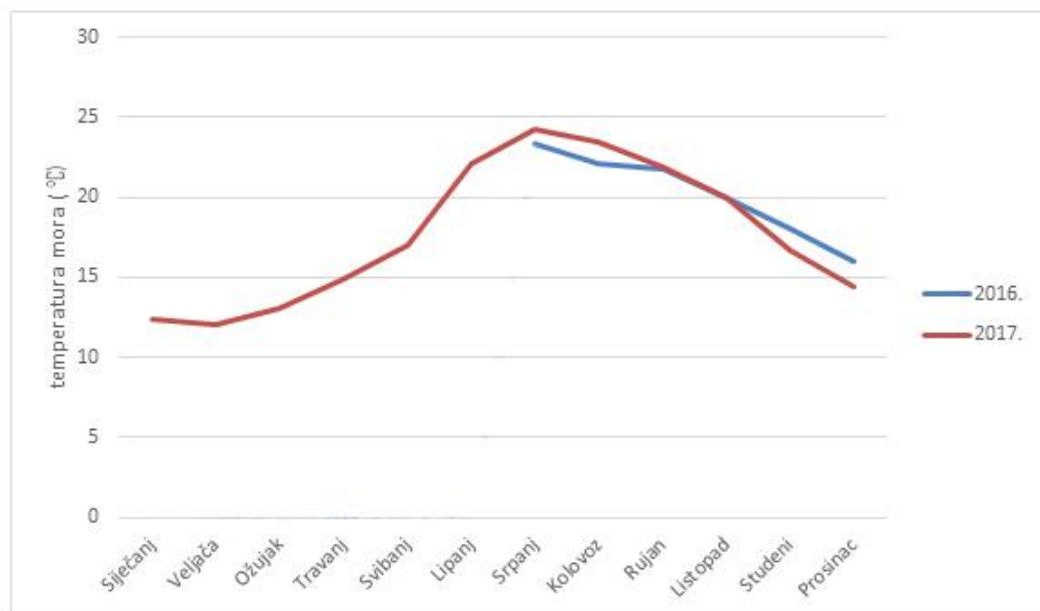
10%-tni homogenati su zatim centrifugirani na 1800g, 30 min na 20°C. U 150µL svakog uzorka dodano je 50µL vode i 50µL natrijeve lužine. Nakon 30 minuta inkubacije u tresućoj kupelji na 60°C, dodano je 250µL 6%-tne fosfatne kiseline i 250µL 0,8%-tne tiobarbiturne kiseline, nakon čega su se uzorci inkubirali na 45min u kupelji pri temperaturi od 90°C. Nakon hlađenja, spoj malondialdehida i tiobarbiturne kiseline se ekstrahira dodavanjem 250µL metanola i 100µL 10% natrijevog dodecil-sulfata. Uzorci se 20 sekundi vorteksiraju i stavljaju na centrifugiranje na 3600U/min na 10 minuta. Pri analizi kromatografijom reverznih faza koristila se Waters symmetry® C18 kolona (Waters, Milford, MA, SAD) duljine 5 cm, promjera 2,1 mm sa česticama punila promjera 3,5 µm. Korištena je pokretna faza od metanola i 50 mM vodene otopine kalijevog dihidrogenfosfata u omjeru 50:50 s dodatkom kalijeve lužine do postizanja pH od 6,8. Protok pokrete faze bio je 0,5ml/min, vrijeme analize 5 minuta, a valna duljina UV detektora 532 nm. U navedenim uvjetima, vrijeme zadržavanja je 3 minute, linearnost metode je 0,99, a pouzdanost 99%.

3.4. Statistička obrada podataka

Podatci istraživanih nezavisnih varijabli (hranidbene skupine) su izraženi kao srednje vrijednosti s odstupanjem (\pm) standardne devijacije. Na osnovu prikupljenih podataka, dizajnu studije i tipu varijable koju smo testirali pri interpretaciji rezultata indikatora oksidativnog stresa i masnih kiselina koristili smo GLM jednosmjernu analizu varijance (F-test, ANOVA). Za usporedbu značajnosti razlike srednjih vrijednosti korišten je Fisher's LSD post-hoc test (Hayter, 1986). Rezultate smo testirali na razinu značajnosti od 5% uz pomoć računalnog programa SPSS v.19.0 (IBM Corp., 2010).

4. Rezultati

Na slici 4 prikazan je prosjek vrijednosti temperature mora za 2016. godinu koji je iznosio je $19,54 \pm 2,60^\circ\text{C}$, dok je za 2017. godinu bio $18,3 \pm 4,38^\circ\text{C}$.



Slika 4. Kretanje vrijednosti prosječnih temperatura mora za 2016. i 2017. godinu

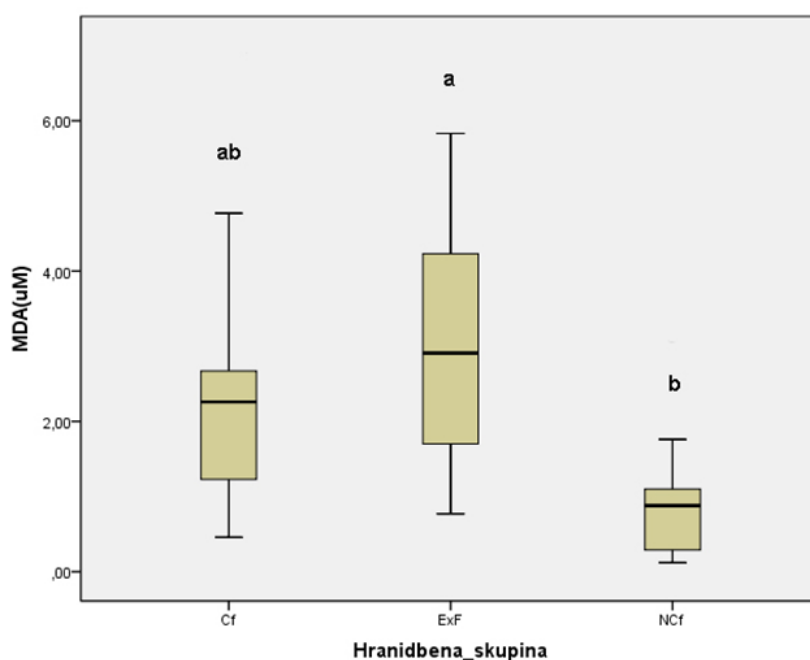
U tablici 2 prikazane su vrijednosti završne mase i totalne dužine riba u pokusu. Prema rezultatima, ribe hranjene EXF smjesom, imale su više vrijednosti završne mase i dužine tijela u odnosu na ribe hranjene CF i NCF. (tablica 2).

Tablica 2. Prosjek vrijednosti završne mase (W) i totalne duljine (TL) uzorkovanih riba (g)

| | W | TL |
|-----|----------------------|------------------|
| CF | 1118,76 \pm 224,17 | 45,25 \pm 2,68 |
| EXF | 1830,51 \pm 277,47 | 52,91 \pm 2,55 |
| NCF | 1670,50 \pm 266,87 | 50,32 \pm 3,95 |

4.1. Koncentracija MDA kao indikator oksidativnog stresa

Prosječne vrijednosti koncentracije malondialdehida (MDA) u mišićnom tkivu hame kretale su se od najviše vrijednosti ($3,08 \pm 1,41$) skupine EXF do najnižih $0,98 \pm 0,84$ skupine NCF (Slika 4). Rezultati prosječne koncentracije MDA u skupini CF iznosila je $0,98 \pm 0,84$. Jednosmjernom analizom varijance utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji MDA između hranidbenih skupina EXF i NCF, ($F(2,6) = 4,587, p < 0,05$).



Slika 4. Grafički prikaz usporedbe ukupnih rezultata prosječne koncentracije malondialdehida (MDA) u mišićnom tkivu hame (*Argyrosomus regius*) svih hranidbenih skupina ($n=52$)* ($F(2,6) = 4,587, p < 0,05$)

*Uzorkovano je 10 uzoraka iz svake skupine (60) ali zbog prisutnosti hemoliziranih homogenata ekstremi pojedinih skupina (8) su izlučeni iz statističke obrade

Tablica 4. Analiza varijance srednjih vrijednosti koncentracije malondialdehida (MDA) u mišićnom tkivu hame (*Argyrosomus regius*) između hranidbenih skupina na kraju istraživanja; $F(2,6) = 4,587, p = 0,033$

| Izvor varijabilnosti | Suma kvadrata odstupanja (tip III) | Stupnjevi slobode | Srednji kvadrat odstupanja | F | Sig. |
|----------------------|------------------------------------|-------------------|----------------------------|-------|-------|
| Hranidbena skupina | 22,072 | 2 | 11,036 | 4,587 | ,033 |
| Ponavljanje | 4,934 | 1 | 4,934 | 1,636 | 0,248 |
| Pogreška | 18,102 | 6 | 3,017 | | |

* α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

4.2. Masno-kiselinski profil mišićnog tkiva hame

Analize udjela lipida i masnokiselinskog profila mišićnog tkiva na kraju istraživanja prikazani su u tablici 5.

Najviši udio lipida u mišićnom tkivu hame pronađen je kod riba koje su hranjene EXF smjesom ($16,81 \pm 7,84$). Iako je utvrđena razlika udjela lipida u organskoj komponenti između skupina, ona nije značajna, pretpostavlja se zbog nešto više varijabilnosti unutar uzorka pojedinih skupina što je vidljivo i po višim vrijednostima SD. Također, omjer udjela lipida u mišićnom tkivu ribe proporcionalan je omjeru udjela sirovih masti u hranidbenim smjesama.

Udio ukupnih zasićenih masnih kiselina značajno je viši kod hranidbenih smjesa NCF ($27,61 \pm 1,50$, $p < 0,001$) i EXF ($27,49 \pm 1,25$, $p < 0,001$) naspram smjese CF.

Udio ukupnih nezasićenih masnih kiselina ($74,57 \pm 1,35$, $p < 0,001$) uz udio ukupnih ω -6 masnih kiselina ($14,50 \pm 7,16$, $p < 0,05$) značajno je viši kod hranidbene skupine CF.

Najviši udio ukupnih ω -3 masnih kiselina ($35,48 \pm 6,12$, $p < 0,05$) u mišićnom tkivu hame utvrđen je kod ribe hranjene EXF smjesom. Također, najviša vrijednost omjera ω -3: ω -6 masnih kiselina u mišićnom tkivu utvrđena je kod hranidbene smjese EXF ($3,86 \pm 1,54$, $p < 0,01$).

Tablica 5. Masno-kiselinski profil mišićnog tkiva hame (*Argyrosomus regius*) hranjene hranidbenim smjesama različitog kemijskog sastava u trajanju od 17 mjeseci (% ukupnih masnih kiselina)

| n | Hranidbena skupina | | | | | | P razina |
|--------------------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|--------------------|-------------|-----------|
| | NCF | | EXF | | CF | | |
| | 18 | | 18 | | 18 | | |
| Masna kiselina | \bar{x} | SD | \bar{x} | SD | \bar{x} | SD | |
| C14:0 | 2,80 ^b | 0,70 | 3,03 ^a | 0,68 | 1,97 ^c | 0,413 | *** |
| C15:0 | 0,34 ^b | 0,16 | 0,42 ^a | 0,11 | 0,33 ^b | 0,07 | ** |
| C16:3(n-3) | 1,21 ^a | 0,35 | 1,00 ^{ab} | 0,39 | 0,79 ^b | 0,20 | *** |
| C16:1(n-7) | 3,95 ^a | 0,93 | 4,10 ^a | 0,89 | 3,24 ^b | 0,51 | ** |
| C16:0 | 17,45 ^a | 1,19 | 17,27 ^a | 1,06 | 16,03 ^b | 0,87 | *** |
| C17:1(n-9) | 0,86 | 0,64 | 0,74 | 0,45 | 0,62 | 0,26 | ns |
| C18:3(n-3) | 3,72 | 2,11 | 2,20 | 1,18 | 3,05 | 2,24 | ns |
| C18:2 (n -6) | 7,76 ^b | 2,23 | 5,86 ^b | 2,18 | 10,48 ^a | 2,62 | * |
| C18:1 | 17,43 ^b | 2,80 | 17,97 ^{ab} | 3,00 | 21,05 ^a | 4,77 | * |
| C18:0 | 6,71 ^a | 0,59 | 6,50 ^b | 0,67 | 6,66 ^b | 0,77 | * |
| C20:4(n-6)_ARA | 0,53 ^a | 0,05 | 0,55 ^a | 0,07 | 0,44 ^b | 0,05 | *** |
| C20:5(n-3)_EPA | 11,21 ^a | 1,10 | 11,65 ^a | 1,56 | 9,34 ^b | 1,10 | *** |
| C20:3(n-6) | 1,38 | 0,32 | 1,40 | 0,29 | 1,34 | 0,18 | ns |
| C20:1(n-7) | 1,17 ^b | 0,21 | 1,56 ^a | 0,31 | 1,26 ^b | 0,16 | *** |
| C20:0 | 0,23 ^b | 0,08 | 0,27 ^{ab} | 0,11 | 0,33 ^a | 0,06 | *** |
| C22:6(n-3)_DHA | 19,69 ^a | 3,61 | 21,59 ^a | 3,46 | 17,29 ^b | 3,55 | ** |
| C22:4(n-6) | 1,65 ^a | 0,23 | 1,92 ^b | 0,17 | 1,83 ^b | 0,25 | * |
| C22:1(n-9) | 1,17 ^b | 0,38 | 1,98 ^a | 0,54 | 1,22 ^b | 0,29 | *** |
| C22:0 | 0,15 | 0,018 | 0,23 | 0,12 | 0,19 | 0,043 | ns |
| C24:1 | 0,49 ^b | 0,13 | 0,68 ^a | 0,22 | 0,46 ^b | 0,09 | *** |
| SFA | 27,61 ^a | 1,50 | 27,49 ^a | 1,25 | 25,43 ^b | 1,35 | *** |
| UNSFAs | 72,39 ^b | 1,50 | 72,51 ^b | 1,25 | 74,57 ^a | 1,35 | *** |
| MUFA | 25,76 | 3,71 | 26,90 | 4,19 | 27,74 | 4,47 | ns |
| PUFA | 46,63 | 4,65 | 45,62 | 4,44 | 46,83 | 5,13 | ns |
| ω -6 | 12,34 ^{ab} | 4,42 | 9,19 ^b | 4,58 | 14,50 ^a | 7,16 | ** |
| ω -3 | 34,56 ^a | 6,28 | 35,48 ^a | 6,12 | 30,65 ^b | 6,82 | * |
| ω -3/ ω -6 | 2,80 ^b | 1,13 | 3,86 ^a | 1,54 | 2,11 ^c | 0,86 | ** |
| DHA/EPA | 1,70 | 0,28 | 1,96 | 0,40 | 1,83 | 0,22 | ns |
| Ukupni lipidi | 13,04 | 5,78 | 16,81 | 7,84 | 11,18 | 3,59 | ns |

NCF, Komercijalna hrana za lista; EXF, eksperimentalna hrana za hamu; CF, komercijalna hrana za hamu; SFA - Zasićene masne kiseline; UNSFA - Nezasićene masne kiseline; MUFA –mononezasićene masne kiseline; PUFA polinezasićene masne kiseline;DHA-Dokozaheksaenska kiselina;EPA- Eikozapentaenska kiselina. Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu \pm SD dva ponavljanja; Vrijednosti unutar istog retka s različitim superskriptima su značajno različite na razini * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001; ns P>0,05

5. Rasprava

Učinkovitost obrambenih mehanizama riba mijenja se pri različitim temperaturama, stoga je važno osim poznavanja svih komponenata korištene hrane i njihove međusobne interakcije, veliku pažnju usmjeriti i prema sezonskim i okolišnim promjenama. MDA je kao pokazatelj oksidacijskog stresa i oštećenja tkiva doveden u vezu s patogenezom mnogobrojnih oboljenja u ljudi. Ipak, nigdje se ne navode koncentracije MDA u namirnicama koje bi mogle biti opasne iako je moguće da će konzumacija mesa sa povišenim koncentracijama MDA predstavljati određeni rizik za zdravlje ljudi (Del Rio i sur., 2005). Također, usprkos vrlo velikim varijacijama koncentracija MDA u biološkim uzorcima te preporukama za njegovu re-evaluaciju kao indikator oksidativnog stresa, on se i dalje koristi kao biomarker u različitim istraživanjima (Khoubnasabjafari i sur., 2015).

U svom istraživanju, Zhou i suradnici (2010) hranili su juvenile sjenke (*Sciaenidae*) *Sciaenops ocellatus* različitim prebioticima (FOS , GOS , Bio-MOS®, Previda TM) u razini od 1% suhe tvari hrane kao zamjenu za celulozu. U hranidbenoj smjesi glavni izvori proteina bili su riblje brašno menhadena (*Clupeidae*) i soja, a ulje menhadena kao glavni izvor lipida (41% SP, 10% SM). Ribe hranjene s FOS stvarale su značajno ($P < 0,05$) manje oksidativnih radikala u krvi nego ostale grupe. Istraživajući utjecaj gladovanja na biomarkere stresa kod orade (*Sparus aurata*), Pascual i suradnici (2003) uočili su porast razine MDA nakon trećeg tjedna u grupama riba s djelomičnom i totalnom restrikcijom hrane. Na kraju istraživanja izgladnjivane ribe izgubile su 15% inicijalne težine. Tjedan dana prije kraja pokusa, izgladnjivanim grupama riba uključena je hranidba (2%), te su uvjeti oksidativnog stresa nestali.

Prema literaturi, ROS razlaže polinezasićene masne kiseline (PUFA) stvarajući malondialdehide (Pryor i Stanley, 1975). PUFA (koje su najčešće mete slobodnih radikala) tj. njihovo povećanje u tkivima, često se očituje lipidnom peroksidacijom, što za posljedicu ima razvoj bolesti i upalnih procesa. Unos masnih kiselina hranom, poglavito ω -3 PUFA-e, posljeduje povećanjem aktivnosti indikatora oksidativnog stresa, enzima superoksid dismutaze i katalaze, što upućuje na povećanu lipidnu peroksidaciju (Domitrović i sur., 2006).

Analizom rezultata razine PUFA u ovom pokusu, nije utvrđena statistički značajna razlika udjela između hranidbenih skupina dok su koncentracije MDA, također, kao dokazani rezultat lipidne peroksidacije masnih kiselina (Davey i sur., 2005), bile značajno više u EXF hrani.

Pregledom literature ustanovljeno je da dodatak vitamina C, u ovom slučaju u EXF smjesi, uspješno uklanja slobodne radikale doniranjem elektrona, pri čemu nastaje slabo reaktivan askorbilni radikal (Štefan i sur., 2007). Usprkos tomu, koncentracija MDA je bila najviša u EXF hrani, tj. jedinoj hrani u kojoj je dodan vitamin C. Razlog tomu je moguć u upitnoj stabilnosti vitamina C pri skladištenju na dulje vrijeme i biodostupnosti (Skelbaek i sur., 1990).

Trenutno unos ω -3 masnih kiselina u zemljama gdje prevladava tzv. zapadnjački način prehrane iznosi oko 0,15 g dnevno, što je znatno ispod preporučene razine. Iznos omjera ω -6 i ω -3 masnih kiselina u prehrani ljudi trebao bi iznositi 4 : 1. Osim toga, preporučuje se smanjenje unosa ω -6 linolne kiseline na najviše 6,67 g dnevno (Bender, 2011).

Većina istraživanja pokazuje da omjer ω -6 i ω -3 masnih kiselina, mora biti niži od onog koji se trenutno nalazi u ljudskoj populaciji, s ciljem poboljšanja općeg zdravlja ljudi i smanjenja rizika od različitih bolesti (Candela i sur., 2011).

Različiti izvori informacija navode da su se ljudska bića razvila na prehrani s omjerom ω 3: ω 6, koji iznosi 1, dok se u zapadnom svijetu taj omjer ω 3: ω 6 kretao 15/1-16.7/1 (Simopoulos, 2002).

Biološki učinci ω -3 i ω -6 masnih kiselina imaju međusobno djelovanje, ali do danas nije poznato je li omjer ω -3 masnih kiselina i ω -6 masnih kiselina važan za ljudsko zdravlje (Marveranto i sur., 2015).

Sinanoglou i suradnici (2014) proveli su istraživanje kojem je cilj bio usporedba lipida i masnih kiselina iz mišićnog tkiva, jetre, glave i kože, hame iz uzgoja i divlje hame. Autori su zaključili da se postotak ukupnih lipida divljih jedinki kretao između 1,3 – 1,8 i time bio viši nego postotak kod uzgojnih jedinki, dok je omjer ω -3: ω -6 masnih kiselina bio manji kod divljih (1,04) u odnosu na uzgojne (1,50) što je u skladu s rezultatima provedenog istraživanja gdje je omjer ω -3: ω -6 bio viši kod svih hranidbenih skupina, u odnosu na dotično istraživanje, a najviši je bio kod EXF hrane te iznosio visokih $3,86 \pm 1,54$.

Prema istraživanje provedenom na Institutu za akvakulturu u Grčkoj (Chatzifotis i sur., 2012) autori su istražili utjecaj razine lipida i proteina iz hranidbenih smjesa na rast, konverziju hrane te njihov kemijski sastav tijela te je utvrđeno da jedinke hranjene smjesom koja je sadržavala 17% lipida, imaju veću masu tijela i brži rast u odnosu na jedinke hranjene smjesama sa 12,14 i 20% lipida. U provedenom istraživanju, rezultati ukupnih lipida u mišićnom tkivu hame bili su najviši kod EXF hrane što je opravdava hipotezu i relativno se očekivano podudara s najvišom količinom sirovih lipida u istoj hrani.

Mnari Bhouri i suradnici (2010) proveli su istraživanje u kojem je cilj istraživanja bio analizirati masnokiselinski sastav i mineralni sadržaj mišića i jetre kod uzgojenog i divljeg lubina. Riba iz uzgoja hranjena je hranom kemijskog sastava (SP 50%, SM 21%, SV 1,5%, P 11,5%). Analizama je utvrđen značajno veći sadržaj masti ($p < 0,05$) kod riba iz uzgoja u odnosu na one divlje. Postotak SFA i PUFA kao i ω -3 masnih kiselina bio je viši u mišićnom tkivu divljih riba nego onih iz uzgoja, kao i postotak SFA i PUFA u jetri. Sadržaj PUFA iz tkiva i jetre kretao se između 38,77 – 47,24% kod uzgojenih riba i onih divljih te time bio viši od sadržaj SFA (26,75 – 33,3%) i mononezasićenih (MUFA) frakcija (21,75 – 29,18%). Razine PUFA i MUFA masnih kiselina u provedenom istraživanju kretale su se od 45,62 – 46,83% tj. 25,76 – 27,74% i nisu značajno između skupina. Sadržaj SFA masnih kiselina bio je značajno viši kod CF (27,61%) i EXF (27,49%) u odnosu na NCF (25,43%). Prema sadržaju proteina i masti u hrani EXF i hrana iz istraživanja Mnari Bhouri i suradnika (2010) bila je sličnog udjela dok je udio PUFA u mišićnom tkivu bio nešto viši kod ribe hranjene EXF hranom.

S ciljem analize sastava masnih kiselina kod hame iz uzgoja, Grigorakis i suradnici (2011) na temelju dobivenih rezultata utvrdili su visoki udio polarnih lipida (48,3 – 51,1%) i nisku razinu neutralnih masnih kiselina (40,9 – 51,7%) u filetima hame u usporedbi s drugim vrstama riba (komarča i lubin). Od ω -3 masnih kiselina najzastupljenije su bile eikosapentaenoična (EPA) (4,58%) i dokozaheksaenoinska (DHA) (15,0%), dok je od ω -6 najzastupljenija bila linolna (11,9%). Pri usporedbi, rezultati provedenog istraživanja indiciraju znatno više vrijednosti EPA i DHA ω -3 masnih kiselina u mišićnom tkivu hame kod svih hranidbenih skupina sa značajno višim vrijednostima hrane EXF (11,65% EPA, 21,59% DHA) u odnosu na NCF. Nasuprot tome, linolna masna kiselina (C18:2 (n-6)) bila je značajno povišena kod NCF u odnosu na EXF i CF.

Martinez – Lloreus i sur. (2011) proveli su istraživanje s ciljem procjene učinka hranidbe na rast i učinkovitost hranjivih tvari na mlađ hame. U svrhu ovog istraživanja riba je hranjena ručno s 4 hranidbene smjese različitog udjela proteina i lipida (44/25, 43/21, 46/20, 47/20 %), dva puta dnevno do sitosti. Na temelju dobivenih rezultata utvrdilo se da riba hranjena komercijalnom hranom s postotkom proteina i lipida od 47/20 i 46/20 imala najbolji rast, dok je riba hranjena komercijalnom hranom s postotkom proteina i lipida od 43/21 i 44/25 imala slabiji rast i učinkovitost hranjivih tvari. Pri usporedbi s navedenim istraživanjem, pokusna hrana EXF (52/21), iako s manjim udjelom proteina od NCF (56/18), imala najveću završnu masu riba i najpovoljniji masnokiselinski profil. Obzirom da je proteinska komponenta najskuplji dio riblje hrane, EXF smjesa ima veliki potencijal pri hranidbi hame u marikulturi.

6. Zaključci

Hranidba hame hranidbenim smjesama različitog kemijskog sastava značajno je utjecala na masnokiselinski profil mišićnog tkiva i koncentraciju malondialdehida kao indikatora oksidativnog stresa

Eksperimentalna hrana (EXF) imala je viši udio lipida u mišićnom tkivu ribe te povoljniji masnokiselinski sastav.

Prema rezultatima provedenog istraživanja, koncentracija MDA je bila najviša kod EXF ($3,08 \pm 1,41$) što indicira lipidnu peroksidaciju tj. stanje određenog oksidativnog stresa u odnosu na ribe hranjene hranidbenim smjesama CF i NCF. S druge strane, utvrđenom razinom PUFA-e u ovom pokusu, nije utvrđena statistička značajnost između skupina. Preporučuju se daljnja istraživanja na ovom polju dodatnim indikatorima oksidativnog stresa.

Provedenim analizama dobiven je postotak ukupnih lipida u pojedinim hranidbenim smjesama i najveći postotak zabilježen je u EXF hrani te je iznosio 16,81 % što je bilo za očekivati zbog višeg udjela masti u navedenoj hranidbenoj smjesi.

Također, najviši udio ukupnih ω -3 masnih kiselina ($35,48 \pm 6,12$, $p < 0,05$) kao i omjer ω 3: ω 6 ($3,86 \pm 1,54$, $p < 0,01$) u mišićnom tkivu hame utvrđen je kod riba hranjene EXF smjesom što indicira da je EXF hranidbena smjesa povoljnog kemijskog sastava pri čijoj konzumaciji riba postiže pogodan masnokiselinski profil te visoku nutritivnu kakvoću.

Hama je slabo istražena riblja vrsta na prostoru Republike Hrvatske, stoga su ovim istraživanjem u Hrvatskoj dobiveni prvi znanstveni podaci o masnokiselinskom profilu i koncentraciji malodialdehida u mišićnom tkivu hame hranjene različitim hranidbenim smjesama.

7. ZAHVALE

Zahvaljujemo prije svega našem mentoru doc. dr. sc. Danielu Matuliću na stručnom vodstvu, savjetima i sugestijama te na strpljenju pri izradi ovog rada. Velika zahvala i dr. sc. Slavici Čolak na susretljivosti i pomoći kod prikupljanja uzoraka. Zahvaljujemo se i docentici Jeleni Šuran na omogućenim analizama na Veterinarskom fakultetu te dr.sc. Mariji Blažini također na omogućenim analizama u Centru za istraživanje mora. Također, se od srca zahvaljujemo svim našim kolegama i prijateljima na velikom strpljenju i razumijevanju.

7. Literatura

1. Bender, D.V. (2011): Omega-3 masne kiseline – svojstva i djelovanje. *Medix, Specijalizirani medicinski dvomjesečnik, Ožujak/Travanj, 92/93, 234-240.*
2. Bogut, I., Bavčević, L., Stević, I., Adámek, Z., Franičević, V., Galović, D., Gjurčević, E., Klanjšček, T., Luzzana, U., Mareš, J., Mišlov-Jelavić, K., Pavličević, J., Pliestić, S., Šterbić, I., Tibaldi, E., Župan, B. (2016): Hranidba riba. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 47-57.
3. Bogut, I., Opačak, A., Stević, I., Bogut, S. (1996): Nutritivna i protektivna vrijednost riba s osvrtom na omega-3 masne kiseline. *Croatian Journal of Fisheries : Ribarstvo, 54(1), 21-37.*
4. Bradamante, V. (2002): Mjesto i uloga vitamina u životu suvremenog čovjeka. *Medicus 11, 101-111.*
5. Calderón, J. A., Esteban, J. C., Carrascosa, M. A., Ruiz, P. L., Valera F. (1997): Rearing and growth in captivity of a lot of meagre reproducers (*Argyrosomus regius* (A)). VI Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena, Murcia, Spain. Universidad de Murcia, IEO y MAPA. Act. p. 365370.
6. Candela, C., G., Bermejo Lopez, L., M., Kohen Loria, V., (2011): Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations. *Nutr Hosp.; 26(2):323-329.*
7. Chatzifotis, S., Panagiotidou, M., Divanach, P., (2012): Effect of protein and lipid dietary levels on the growth of juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquacult. Int., 20, 91–98.*
8. Davey. M.W., Stals, E, Panis, B., Keulemans, J., Swennen, R.L. (2005): "High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues". *Analytical Biochemistry. 347 (2): 201–207.*
9. Domitrović, R., Tota, M., Milin, Č. (2006): Oxidative stress in mice: effects of dietary corn oil and iron. *Biol Trace Elem Res 113 (2):177-91.*
10. Del Rio, D., Stewart, A. J., Pellegrini, N. (2005): A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis. 15, 316-328.*
11. Draper, H.H., Squires, E.J., Mahmooch, H., Wu, J., Agarwal, S., Handley, M. (1993): A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination

- ofmalondialdehyde in biological materials. *Free Radicals Biology Medicine*, 15, 353-363.
12. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cultured Aquatic Species Information Programme, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). dostupno na http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en
 13. Grigorakis, K., Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Mittakos, I., Nathanailides, C. (2011): Lipid quality and filleting yield of reared meagre (*Argyrosomus regius*). *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 711–716.
 14. Hayter, A. J. (1986): The Maximum Familywise Error Rate of Fisher's Least Significant Difference Test. *Journal of the American Statistical Association*, 81 (396): 1000–1004.
 15. Hernández, M. D., Lopez, M. B., Alvarez, A., Ferrandini, E., GarcíaGarcía, B., Garrido, M.D. (2009): Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. *Food Chemistry*, 114, 1, 237–245.
 16. IBM Corp. Released (2010): IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.
 17. Janero, D.P. (1990): Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radicals Biology Medicine*, 9, 515-540.
 18. Jardas I. (1996): Jadranska ihtiofauna. Školska knjiga, Zagreb.
 19. Jensen, F. B. (1996): Physiological effects of nitrite in teleosts and crustaceans. In *Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Cellular, and Molecular Approaches*, Taylor, E. W., Ed., Cambridge University Press, Cambridge, U.K.,. 169–186.
 20. Jiménez, M. T., Pastor, E., Grau, A., Alconchel, J. I., Sánchez, R., Cárdenas, S. (2005): Revisión del cultivo de esciéndidos en el mundo, con especial atención a la corvina *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 21, 1-4, 169–175.
 21. Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K., Jouyban, A., (2015): Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts*, 2015, 5(3), 123-127.
 22. Kružić, N., Mustać, B., Župan, I., Čolak, S. (2016): Meagre (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) aquaculture in Croatia. *Croatia Journal of Fisheries*, 74, 14-19.

23. Martínez-Llorens, S., Espert, J., Moya, J., Cerdá, M. J., Tomás-Vidal, A., (2011): Growth and nutrient efficiency of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801) fed extruded diets with different protein and lipid levels. *Int. J. Fish. Aquacult.*, 3, 195–203.
24. Marventano, S., Kolacz, P., Castellano, S., Galvano, F., Buscemi, S., Mistretta, A., Grosso, G., (2015): "A review of recent evidence in human studies of n-3 and n-6 PUFA intake on cardiovascular disease, cancer, and depressive disorders: does the ratio really matter?". *International journal of food sciences and nutrition*. 66 (6): 611–22.
25. Mnari Bhouri, A., Bouhlel, I., Chouba L., Hammami M., El Cafsi, M., Chaouch A. (2010): Total lipid content, fatty acid and mineral compositions of muscles and liver in wild and farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *African Journal of Food Science* 4 (8) 522 – 530.
26. Parihar, M.S., Dubey, A.K., Tarangini, J., Prakash, P. (1996): Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipids content in liver of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. *Journal of Thermal Biology*, 21, 323–330.
27. Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., López-Barea, J., Peinado, J. (2003): Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-biological Interactions* 145, 191-199.
28. Poli, B. M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Iurzan, F., Mecatti, M., Lupi, P., Bomelli, A. (2003): Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus regius*): Body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-size fish. *Aquaculture International*, 11, 301-311.
29. Pryor, W.A., Stanley, J.P. (1975). "Letter: A suggested mechanism for the production of malondialdehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation". *J. Org. Chem.* 40 (24): 3615–7.
30. Ritola, O., Livingstone, D.R., Peters, L.D., Lindstrom, S. P. (2002b): Antioxidant processes are affected in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to ozone and oxygen supersaturated water. *Aquaculture*, 210: 1–19.
31. Ritola, O., Peters, L.D., Livingstone, D.R. Lindstrom, S.P. (2002a): Effects of in vitro exposure to ozone and/or hypoxia on superoxide dismutase, catalase, glutathione, and

- lipid peroxidation in red blood cells and plasma of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 33, 165–175.
32. Sies, H. (1985): Oxidative stress, Introductory remarks, In: Oxidative Stress (H. Sies, ed.) Academic Press, London.
 33. Simopoulos, AP., (2002): The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* Oct;56(8):365-79.
 34. Sinanoglou, V. J., Proestos, C., Lantzouraki, D.Z., Clokerinos, A.C., Miniadis-Meimaroglou, S., (2014): Lipid evaluation of farmed and wild meagre (*Argyrosomus regis*). *European Journal of Lipid Science and technology*, 116, 134-143.
 35. Skelbaek, T., Andersen, N.G., Winning, M., Westergaard, S., (1990) Stability in fish feed and bioavailability to rainbow trout of two ascorbic acid forms. *Aquaculture* 84:335-343.
 36. Stansby, M.E., Hall, A.S. (1967): Chemical composition of commercially important fish of the United States. U.S. Fish Wildlife Service, *Fish. Inds. Res.* 3 (4):29.
 37. Štefan, L., Tepšić, T., Zavidčić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007): Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis*, 43. (2.), 84-93.
 38. Tomić, M., Matulić, D., Jelić, M. (2016): What determines fresh fish consumption in Croatia? *Appetite*, 106, 1, 13-22.
 39. Villeda, C. (2013): Effect of dietary essential oils supplementation on growth performance, protein digestibility and digestive enzymes in juvenile gilthead seabream fed a low fishmeal diet. *Doktorska disertacija*. Str. 7-25.
 40. Zhou, Q., Buentello, J.A., Gatlin, D.M. III (2010): Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 309,253-257.

8. Sažetak

Tina Stuhne, Iva Radičević, Katarina Bencetić

Utjecaj različitih hranidbenih smjesa na masnokiselinski profil i koncentraciju malondialdehida u mišićnom tkivu hame *Argyrosomus regius* (Asso, 1801)

Cilj istraživanja bio je odrediti i usporediti utjecaj hranidbe hranidbenim smjesama različitog kemijskog sastava na sastav masnih kiselina i koncentraciju malondialdehida u mišićnom tkivu hame (*Argyrosomus regius*). Pokus je proveden u tri tretmana: CF (SP=48,0; SM=16,0) EXF (SP=52,0; SM=21,0) NCF (SP=56,0; SM=18,0) s dva ponavljanja u akvakulturnim kavezima dimenzija 9x5x5 m (V=225 m³) na lokaciji otoka Bisage (44°01'28.6"N 15°13'11.2"E) tijekom 17 mjeseci. Riba je hranjena do sitosti, a prosječne temperatura mora za vrijeme pokusa za 2016. godinu iznosio 19,54±2,60°C, a za 2017. godinu 18,3 ± 4,38°C. Najveći postotak lipida (16,81%) u mišićnom tkivu zabilježen je kod EXF hranidbene smjese. Također, u istoj skupini utvrđen je najviši udio ukupnih ω-3 masnih kiselina od 35,46 +- sd dok je omjer ω3:ω6 masnih kiselina iznosio 3,86 ± 1,54. U hrani EXF utvrđena je i značajno viša vrijednosti koncentracije malondialdehid (MDA) u mišićnom tkivu hame te je iznosila 3,08 ± 1,41. Ribe hranjene EXF smjesom, imale su više vrijednosti završne mase i dužine tijela u odnosu na ribe hranjene CF i NCF.

Istraživanje indicira EXF kao hranidbenu smjesu povoljnog kemijskog sastava pri čijoj konzumaciji riba postiže pogodan masnokiselinski profil te visoku nutritivnu kakvoću.

Ključne riječi: hranidba, hranidbene smjese, pokus, masne kiseline, malondialdehid

9. Summary

Tina Stuhne, Iva Radičević, Katarina Bencetić

The effects of different fish feed on the fatty acid profile and malondialdehyde concentration in the muscle tissue of meagre *Argyrosomus regius*, (Asso, 1801)

The aim of this study was to evaluate and compare the effect of nutrition on nutrition mixtures of different chemical composition on fatty acid structure and concentration of malondialdehyde in skeletal muscle tissue meagre (*Argyrosomus regius*). The experiment was performed in three feeding groups CF (CP=48,0; CF =16,0) EXF (CP=52,0; CF =21,0) NCF (CP=56,0; CF=18,0) with two repetitions at the location of the island of Bisage (44°01'28.6"N 15°13'11.2"E) during 17 months in aquaculture cages of 9x5x5 m (V = 225 m³). Fish were fed to satiety. The average T during the experiment in 2016 was 19,54±2,60°C and in 2017 18,3 ± 4,38°C. The highest percentage of lipids (16.81%) in muscle tissue was recorded in the EXF feed. Also, in the same group, the highest proportion of total ω-3 fatty acids (35.46 ± 6,12) was found. The ω3/ω6 fatty acids ratio was highest in EXF (3,86 ± 1,54). EXF feed had significantly higher values of MDA (3,08 ± 1,41) in the muscle tissue of hame were. Fish fed with EXF had higher final weighth and total length comared with CF and NCF.

The study indicated EXF as a nutritional mixture of favourable chemical composition and by consumption fish achieves a suitable fatty acids profile and high nutritive quality.

Key words: feeding, fish feed, trial, fatty acids, malondialdehyde

10. Prilozi

Tablica A1. Fisher's LSD: Post hoc analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije malondialdehida (MDA) u mišićnom tkivu riba između hranidbenih skupina na kraju istraživanja

| (I) Hranidbena skupina | (J) Hranidbena skupina | Značajna razlika (I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference | |
|------------------------|------------------------|------------------------|--------|-------------------|--|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| EXF | CF | ,671 | ,567 | ,282 | -,718 | 2,059 |
| | NCF | 1,759 | ,531 | ,016 | ,461 | 3,058 |
| CF | EXF | -,671 | ,567 | ,282 | -2,059 | ,718 |
| | NCF | 1,089 | ,654 | ,147 | -,511 | 2,688 |
| NCF | EXF | -1,759 | ,531 | ,016 | -3,058 | -,461 |
| | CF | -1,089 | ,654 | ,147 | -2,688 | ,511 |

* α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A2. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C14:0) u mišićnom tkivu riba

C14:0

| (I) Hranidbena skupina | (J) Hranidbena skupina | Značajna razlika (I-J) | Greška | Sig. ^a | 99% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|------------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| NCF | EXF | -,507* | ,172 | ,018 | -,903 | -,111 |
| | CF | ,563* | ,112 | ,001 | ,304 | ,821 |
| EXF | NCF | ,507* | ,172 | ,018 | ,111 | ,903 |
| | CF | 1,070* | ,121 | ,000 | ,790 | 1,349 |
| CF | NCF | -,563* | ,112 | ,001 | -,821 | -,304 |
| | EXF | -1,070** | ,121 | ,000 | -1,349 | -,790 |

* α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A3. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C15:0) u mišićnom tkivu riba

C15:0

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika (I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|------------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,088* | ,021 | ,005 | -,138 | -,037 |
| | 3 | ,002 | ,014 | ,863 | -,030 | ,035 |
| 2 | 1 | ,088* | ,021 | ,005 | ,037 | ,138 |
| | 3 | ,090* | ,025 | ,009 | ,031 | ,149 |
| 3 | 1 | -,002 | ,014 | ,863 | -,035 | ,030 |
| | 2 | -,090* | ,025 | ,009 | -,149 | -,031 |

* α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A4. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C16:3(n-3)) u mišićnom tkivu riba

C16:3(n-3)

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika (I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|------------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | ,103 | ,102 | ,351 | -,146 | ,352 |
| | 3 | ,303* | ,028 | ,000 | ,236 | ,371 |
| 2 | 1 | -,103 | ,102 | ,351 | -,352 | ,146 |
| | 3 | ,200 | ,114 | ,130 | -,079 | ,480 |
| 3 | 1 | -,303* | ,028 | ,000 | -,371 | -,236 |
| | 2 | -,200 | ,114 | ,130 | -,480 | ,079 |

* α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A5. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C16:1(n-7)) u mišićnom tkivu riba

C16:1(n-7)

| (I) Hranidbena_Skupina | (J) Hranidbena_Skupina | Značajna razlika (I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|------------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,129 | ,230 | ,590 | -,659 | ,401 |
| | 3 | ,710* | ,149 | ,001 | ,367 | 1,053 |
| 2 | 1 | ,129 | ,230 | ,590 | -,401 | ,659 |
| | 3 | ,838* | ,154 | ,001 | ,483 | 1,194 |
| 3 | 1 | -,710* | ,149 | ,001 | -1,053 | -,367 |
| | 2 | -,838* | ,154 | ,001 | -1,194 | -,483 |

* α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A6. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C16:0) u mišićnom tkivu riba

C16:0

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika (I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|------------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,043 | ,239 | ,863 | -,594 | ,509 |
| | 3 | 1,755* | ,379 | ,002 | ,881 | 2,629 |
| 2 | 1 | ,043 | ,239 | ,863 | -,509 | ,594 |
| | 3 | 1,798* | ,320 | ,000 | 1,060 | 2,536 |
| 3 | 1 | -1,755* | ,379 | ,002 | -2,629 | -,881 |
| | 2 | -1,798* | ,320 | ,000 | -2,536 | -1,060 |

* α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A7. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C17:1(n-9)) u mišićnom tkivu riba

C17:1(n-9)

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | ,120 | ,237 | ,629 | -,459 | ,700 |
| | 3 | ,237 | ,187 | ,252 | -,220 | ,694 |
| 2 | 1 | -,120 | ,237 | ,629 | -,700 | ,459 |
| | 3 | ,117 | ,151 | ,468 | -,252 | ,485 |
| 3 | 1 | -,237 | ,187 | ,252 | -,694 | ,220 |
| | 2 | -,117 | ,151 | ,468 | -,485 | ,252 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A8. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C18:3(n-3)) u mišićnom tkivu riba

C18:3(n-3)

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | 1,393 | ,716 | ,191 | -1,690 | 4,475 |
| | 3 | ,714 | 1,666 | ,710 | -6,453 | 7,881 |
| 2 | 1 | -1,393 | ,716 | ,191 | -4,475 | 1,690 |
| | 3 | -,678 | ,967 | ,556 | -4,839 | 3,483 |
| 3 | 1 | -,714 | 1,666 | ,710 | -7,881 | 6,453 |
| | 2 | ,678 | ,967 | ,556 | -3,483 | 4,839 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A9. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C18:2(n-6)) u mišićnom tkivu riba

C18:2 (n -6)

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | 1,900 | ,854 | ,068 | -,189 | 3,989 |
| | 3 | -2,717* | ,763 | ,012 | -4,585 | -,849 |
| 2 | 1 | -1,900 | ,854 | ,068 | -3,989 | ,189 |
| | 3 | -4,617* | 1,344 | ,014 | -7,906 | -1,328 |
| 3 | 1 | 2,717* | ,763 | ,012 | ,849 | 4,585 |
| | 2 | 4,617* | 1,344 | ,014 | 1,328 | 7,906 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A10. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C18:1) u mišićnom tkivu riba

C18:1

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,298 | 1,067 | ,787 | -2,759 | 2,164 |
| | 3 | -3,866* | 1,430 | ,027 | -7,163 | -,568 |
| 2 | 1 | ,298 | 1,067 | ,787 | -2,164 | 2,759 |
| | 3 | -3,568 | 1,825 | ,086 | -7,775 | ,640 |
| 3 | 1 | 3,866* | 1,430 | ,027 | ,568 | 7,163 |
| | 2 | 3,568 | 1,825 | ,086 | -,640 | 7,775 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A11. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C18:0) u mišićnom tkivu riba

C18:0

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | ,442* | ,160 | ,025 | ,073 | ,812 |
| | 3 | ,374* | ,155 | ,043 | ,016 | ,731 |
| 2 | 1 | -,442* | ,160 | ,025 | -,812 | -,073 |
| | 3 | -,069 | ,084 | ,440 | -,263 | ,126 |
| 3 | 1 | -,374* | ,155 | ,043 | -,731 | -,016 |
| | 2 | ,069 | ,084 | ,440 | -,126 | ,263 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A12. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C20:4(n-6) ARA) u mišićnom tkivu riba

C20:4(n-6) ARA

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,021 | ,012 | ,125 | -,049 | ,007 |
| | 3 | ,088* | ,019 | ,002 | ,044 | ,132 |
| 2 | 1 | ,021 | ,012 | ,125 | -,007 | ,049 |
| | 3 | ,109* | ,013 | ,000 | ,080 | ,138 |
| 3 | 1 | -,088* | ,019 | ,002 | -,132 | -,044 |
| | 2 | -,109* | ,013 | ,000 | -,138 | -,080 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A13. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C20 5 (n-3) EPA) u mišićnom tkivu riba

C20 5 (n-3) EPA

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,443 | ,258 | ,125 | -1,038 | ,152 |
| | 3 | 1,867* | ,403 | ,002 | ,939 | 2,796 |
| 2 | 1 | ,443 | ,258 | ,125 | -,152 | 1,038 |
| | 3 | 2,310* | ,265 | ,000 | 1,699 | 2,921 |
| 3 | 1 | -1,867* | ,403 | ,002 | -2,796 | -,939 |
| | 2 | -2,310* | ,265 | ,000 | -2,921 | -1,699 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A14. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C20:3(n-6)) u mišićnom tkivu riba

C20:3(n-6)

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,016 | ,068 | ,818 | -,174 | ,141 |
| | 3 | ,046 | ,068 | ,517 | -,110 | ,203 |
| 2 | 1 | ,016 | ,068 | ,818 | -,141 | ,174 |
| | 3 | ,062 | ,061 | ,338 | -,079 | ,203 |
| 3 | 1 | -,046 | ,068 | ,517 | -,203 | ,110 |
| | 2 | -,062 | ,061 | ,338 | -,203 | ,079 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A15. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C20:1(n-7)) u mišićnom tkivu riba

C20:1(n-7)

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,383* | ,060 | ,000 | -,521 | -,245 |
| | 3 | -,086 | ,050 | ,124 | -,202 | ,030 |
| 2 | 1 | ,383* | ,060 | ,000 | ,245 | ,521 |
| | 3 | ,297* | ,041 | ,000 | ,203 | ,391 |
| 3 | 1 | ,086 | ,050 | ,124 | -,030 | ,202 |
| | 2 | -,297* | ,041 | ,000 | -,391 | -,203 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A16. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C20:0) u mišićnom tkivu riba

C20:0

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,043 | ,029 | ,184 | -,113 | ,027 |
| | 3 | -,087* | ,012 | ,000 | -,117 | -,057 |
| 2 | 1 | ,043 | ,029 | ,184 | -,027 | ,113 |
| | 3 | -,044 | ,028 | ,177 | -,113 | ,026 |
| 3 | 1 | ,087* | ,012 | ,000 | ,057 | ,117 |
| | 2 | ,044 | ,028 | ,177 | -,026 | ,113 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A17. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C 22 6 (n-3) DHA) u mišićnom tkivu riba

C 22 6 (n-3) DHA

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -1,900 | ,960 | ,083 | -4,115 | ,314 |
| | 3 | 2,402* | ,809 | ,018 | ,536 | 4,269 |
| 2 | 1 | 1,900 | ,960 | ,083 | -,314 | 4,115 |
| | 3 | 4,303* | ,833 | ,001 | 2,382 | 6,223 |
| 3 | 1 | -2,402* | ,809 | ,018 | -4,269 | -,536 |
| | 2 | -4,303* | ,833 | ,001 | -6,223 | -2,382 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A18. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C22:4(n-6)) u mišićnom tkivu riba

C22:4(n-6)

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,249* | ,097 | ,037 | -,478 | -,020 |
| | 3 | -,197* | ,074 | ,032 | -,372 | -,022 |
| 2 | 1 | ,249* | ,097 | ,037 | ,020 | ,478 |
| | 3 | ,052 | ,095 | ,597 | -,171 | ,276 |
| 3 | 1 | ,197* | ,074 | ,032 | ,022 | ,372 |
| | 2 | -,052 | ,095 | ,597 | -,276 | ,171 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A19. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C22:1(n-9)) u mišićnom tkivu riba

C22:1(n-9)

| (I) Hranidbena skupina | (J) Hranidbena skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,771* | ,098 | ,000 | -,998 | -,544 |
| | 3 | -,041 | ,069 | ,570 | -,201 | ,119 |
| 2 | 1 | ,771* | ,098 | ,000 | ,544 | ,998 |
| | 3 | ,730* | ,066 | ,000 | ,578 | ,881 |
| 3 | 1 | ,041 | ,069 | ,570 | -,119 | ,201 |
| | 2 | -,730* | ,066 | ,000 | -,881 | -,578 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A20. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C22:0) u mišićnom tkivu riba

C22:0

| (I) hranidbena skupina | (J) hranidbena skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,076 | ,063 | ,292 | -,250 | ,098 |
| | 3 | -,024 | ,016 | ,196 | -,068 | ,019 |
| 2 | 1 | ,076 | ,063 | ,292 | -,098 | ,250 |
| | 3 | ,052 | ,066 | ,478 | -,132 | ,235 |
| 3 | 1 | ,024 | ,016 | ,196 | -,019 | ,068 |
| | 2 | -,052 | ,066 | ,478 | -,235 | ,132 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A21. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (C24:1) u mišićnom tkivu riba

C24:1

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,218* | ,042 | ,001 | -,315 | -,121 |
| | 3 | -,007 | ,028 | ,817 | -,070 | ,057 |
| 2 | 1 | ,218* | ,042 | ,001 | ,121 | ,315 |
| | 3 | ,212* | ,032 | ,000 | ,137 | ,286 |
| 3 | 1 | ,007 | ,028 | ,817 | -,057 | ,070 |
| | 2 | -,212* | ,032 | ,000 | -,286 | -,137 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A22. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (SFA) u mišićnom tkivu riba

SFA

| (I) Hranidbena_Skupina | (J) Hranidbena_Skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,251 | ,295 | ,420 | -,932 | ,430 |
| | 3 | 2,110* | ,351 | ,000 | 1,300 | 2,919 |
| 2 | 1 | ,251 | ,295 | ,420 | -,430 | ,932 |
| | 3 | 2,361* | ,235 | ,000 | 1,819 | 2,903 |
| 3 | 1 | -2,110* | ,351 | ,000 | -2,919 | -1,300 |
| | 2 | -2,361* | ,235 | ,000 | -2,903 | -1,819 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A23. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (UNSFA) u mišićnom tkivu riba

UNSFA

| (I) HranidbenaSkupina | (J) HranidbenaSkupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | ,251 | ,295 | ,420 | -,740 | 1,242 |
| | 3 | -2,110 [*] | ,351 | ,000 | -3,287 | -,932 |
| 2 | 1 | -,251 | ,295 | ,420 | -1,242 | ,740 |
| | 3 | -2,361 [*] | ,235 | ,000 | -3,149 | -1,572 |
| 3 | 1 | 2,110 [*] | ,351 | ,000 | ,932 | 3,287 |
| | 2 | 2,361 [*] | ,235 | ,000 | 1,572 | 3,149 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A24. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (MUFA) u mišićnom tkivu riba

MUFA

| (I) Hranidbena_Skupina | (J) Hranidbena_Skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -1,465 | 1,434 | ,337 | -6,276 | 3,345 |
| | 3 | -2,862 | 1,529 | ,098 | -7,994 | 2,269 |
| 2 | 1 | 1,465 | 1,434 | ,337 | -3,345 | 6,276 |
| | 3 | -1,397 | 1,900 | ,483 | -7,771 | 4,977 |
| 3 | 1 | 2,862 | 1,529 | ,098 | -2,269 | 7,994 |
| | 2 | 1,397 | 1,900 | ,483 | -4,977 | 7,771 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A25. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (PUFA) u mišićnom tkivu riba

PUFA

| (I) Hranidbena_Skupina | (J) Hranidbena_Skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | 1,716 | 1,586 | ,311 | -3,606 | 7,039 |
| | 3 | ,753 | 1,654 | ,661 | -4,798 | 6,303 |
| 2 | 1 | -1,716 | 1,586 | ,311 | -7,039 | 3,606 |
| | 3 | -,964 | 2,101 | ,659 | -8,015 | 6,088 |
| 3 | 1 | -,753 | 1,654 | ,661 | -6,303 | 4,798 |
| | 2 | ,964 | 2,101 | ,659 | -6,088 | 8,015 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A26. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (ω -6) u mišićnom tkivu riba

ω -6

| (I) hranidbena_skupina | (J) hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | 3,151* | ,953 | ,016 | ,819 | 5,482 |
| | 3 | -2,160 | 1,000 | ,074 | -4,606 | ,286 |
| 2 | 1 | -3,151* | ,953 | ,016 | -5,482 | -,819 |
| | 3 | -5,311* | 1,152 | ,004 | -8,129 | -2,493 |
| 3 | 1 | 2,160 | 1,000 | ,074 | -,286 | 4,606 |
| | 2 | 5,311* | 1,152 | ,004 | 2,493 | 8,129 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A27. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti rezultata koncentracije masne kiseline (ω -3) u mišićnom tkivu riba

ω -3

| (I) Hranidbena_Skupina | (J) Hranidbena_Skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,907 | 2,137 | ,682 | -5,835 | 4,021 |
| | 3 | 3,911* | 1,424 | ,025 | ,626 | 7,195 |
| 2 | 1 | ,907 | 2,137 | ,682 | -4,021 | 5,835 |
| | 3 | 4,817* | 1,467 | ,011 | 1,436 | 8,199 |
| 3 | 1 | -3,911* | 1,424 | ,025 | -7,195 | -,626 |
| | 2 | -4,817* | 1,467 | ,011 | -8,199 | -1,436 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A28. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti omjera koncentracije masnih kiselina (ω -3: ω -6) u mišićnom tkivu riba

ω -3: ω -6

| (I) Hranidbena_skupina | (J) Hranidbena_skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -1,103* | ,384 | ,028 | -2,043 | -,164 |
| | 3 | 1,076* | ,315 | ,014 | ,305 | 1,847 |
| 2 | 1 | 1,103* | ,384 | ,028 | ,164 | 2,043 |
| | 3 | 2,180* | ,542 | ,007 | ,854 | 3,506 |
| 3 | 1 | -1,076* | ,315 | ,014 | -1,847 | -,305 |
| | 2 | -2,180* | ,542 | ,007 | -3,506 | -,854 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$

Tablica A29. Analiza značajnosti razlike srednjih vrijednosti omjera koncentracije masnih kiselina (DHA:EPA) u mišićnom tkivu riba

DHA:EPA

| (I) Hranidbena skupina | (J) Hranidbena skupina | Značajna razlika(I-J) | Greška | Sig. ^a | 95% Confidence Interval for Difference ^a | |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--------|-------------------|---|----------------|
| | | | | | Donja granica | Gornja granica |
| 1 | 2 | -,086 | ,085 | ,354 | -,295 | ,123 |
| | 3 | -,033 | ,070 | ,657 | -,204 | ,139 |
| 2 | 1 | ,086 | ,085 | ,354 | -,123 | ,295 |
| | 3 | ,053 | ,040 | ,232 | -,045 | ,151 |
| 3 | 1 | ,033 | ,070 | ,657 | -,139 | ,204 |
| | 2 | -,053 | ,040 | ,232 | -,151 | ,045 |

α – razina značajnosti; $\alpha < 0,05$