

Ekstrakt kadifice (*Tagetes erecta* L.) u hranidbi nesilica: utjecaj na sadržaj karotenoida i boju žutanjka

Vuk, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:303353>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**EKSTRAKT KADIFICE (*Tagetes erecta* L.) U
HRANIDBI NESILICA: UTJECAJ NA SADRŽAJ
KAROTENOIDA I BOJU ŽUTANJKA**

DIPLOMSKI RAD

Barbara Vuk

Zagreb, rujan, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Hranidba životinja i hrana

**EKSTRAKT KADIFICE (*Tagetes erecta* L.) U
HRANIDBI NESILICA: UTJECAJ NA SADRŽAJ
KAROTENOIDA I BOJU ŽUTANJKA**

DIPLOMSKI RAD

Barbara Vuk

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Kristina Kljak

Zagreb, rujan, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Barbara Vuk**, JMBAG 0178122422, rođena 11.07.2000. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**EKSTRAKT KADIFICE (*Tagetes erecta L.*) U HRANIDBI NESILICA: UTJECAJ NA
SADRŽAJ KAROTENOIDA I BOJU ŽUTANJKA**

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Barbare Vuk**, JMBAG 0178122422, naslova

**EKSTRAKT KADIFICE (*Tagetes erecta L.*) U HRANIDBI NESILICA: UTJECAJ NA
SADRŽAJ KAROTENOIDA I BOJU ŽUTANJKA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana
_____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|--------------------------------------|--------|-------|
| 1. | Izv. prof. dr. sc. Kristina Kljak | mentor | _____ |
| 2. | Prof. dr. sc. Marko Vinceković | član | _____ |
| 3. | Izv. prof. dr. sc. Dalibor Bedeković | član | _____ |

Zahvala

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Kristini Kljak, prof. dr. sc. Marku Vincekoviću, doktorandici Dori Zurak, mag.ing agr., kao i djelatnicama laboratorija Zavoda za hranidbu životinja što su svojim znanjem, savjetima i iskustvom pridonijeli izradi ovog rada.

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Hipoteza i cilj istraživanja	2
2.	Pregled literature	3
2.1.	Karotenoidi	3
2.1.1.	Sinteza i uloga karotenoida	4
2.2.	Biološka funkcija karotenoida kod kokoši nesilica	9
2.2.1.	Jaja – utjecaj karotenoida na nutritivna i kvalitativna svojstva	9
2.2.2.	Zahtjevi tržišta za bojom žutanjka.....	11
2.3.	Kadifca (<i>Tagetes erecta</i> L.) kao izvor karotenoida	12
2.4.	Inkapsulacija karotenoida.....	14
3.	Materijali i metode.....	16
3.1.	Smještaj nesilica i hranidbeni tretmani	16
3.1.1.	Prikupljanje podataka i uzoraka.....	18
3.2.	Priprema i inkapsulacija ekstrakta kadifce (<i>Tagetes erecta</i> L.)	19
3.3.	Određivanje sadržaja karotenoida u smjesama hranidbenih tretmana.....	21
3.4.	Određivanje sadržaja karotenoida u žutanjku jajeta.....	22
3.5.	Određivanje boje žutanjka.....	23
3.6.	Deponiranje karotenoida iz obroka u žutanjak jajeta	24
3.7.	Statistička obrada podataka	24
4.	Rezultati i rasprava.....	25
4.1.	Karotenoidni profil smjesa hranidbenih tretmana	25
4.2.	Sadržaj karotenoida u žutanjku jajeta	27
4.2.1.	Sadržaj pojedinačnih karotenoida u žutanjcima jaja.....	27
4.2.2.	Sadržaj ukupnih karotenoida u žutanjku jajeta	29
4.3.	Učinkovitost deponiranja karotenoida iz dnevnog obroka u žutanjak jajeta ...	30
4.4.	Boja žutanjka jajeta	34
5.	Zaključak	36
6.	Popis literature.....	37

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Barbare Vuk**, naslova

EKSTRAKT KADIFICE (*Tagetes erecta L.*) U HRANIDBI NESILICA: UTJECAJ NA SADRŽAJ KAROTENOIDA I BOJU ŽUTANJKA

Karotenoidi su izvor pigmenta za boju žutanjka jajeta, ali su skloni degradaciji. Jedan od načina da ih se zaštiti je inkapsulacija, koja je vrlo česta tehnologija u industriji hrane. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati mogućnost upotrebe ekstrakta kadifice inkapsuliranog s kalcijevim alginatom kao izvora pigmenata u proizvodnji jaja. Karotenoidi cvijeta kadifice ekstrahirani su acetonom i otopljeni u suncokretovom ulju, te inkapsulirani ionskim geliranjem kalcijevim alginatom. Nakon sušenja, mikrokapsule su dodane u potpunu krmnu smjesu za kokoši nesilice u udjelima od 0,5% i 1%. Pokus s nesilicama proveden je prema potpuno nasumičnom rasporedu s 3 tretmana [T0 – kontrola, standardna smjesa, T1 – 0,5%, T2 – 1% (3 tretmana × 5 kaveza, 3 kokoši u svakom)]. Jaja su sakupljena četvrtog tjedna pokusa, a žutanjci su analizirani za profil i učinkovitost deponiranja karotenoida te boju (CIE L*a*b*). Dodatak mikrokapsula u smjese je povećao sadržaj svih karotenoida u žutanjku u usporedbi s kontrolom [P<0,01; ukupni karotenoidi (µg/g): T0 – 17,17, T1 – 23,16, T2 – 28,13]. Suprotno tome, učinkovitost deponiranja karotenoida smanjila se s povećanjem sadržaja u smjesi [P<0,01; ukupni karotenoidi (%): T0 – 13,23, T1 – 7,02, T2 – 5,35]. Također, smanjio se i intenziteti boje žutanjka u usporedbi s kontrolom (a* vrijednost 19,52 vs. 7,18). Zaključno, dodatak mikrokapsula kalcijevog alginata koji sadrži karotenoide kadifice u potpune krmne smjese kokoši nesilica povećao je sadržaj karotenoida u žutanjku, ali ne u očekivanom omjeru, što je rezultiralo niskim intenzitetom boje.

Ključne riječi: karotenoidi, ekstrakt kadifice (*Tagetes erecta L.*), boja žutanjka

Summary

Of the master's thesis – student **Barbara Vuk**, entitled

MARIGOLD EXTRACT (*Tagetes erecta L.*) IN THE FEEDING OF LAYING HENS: INFLUENCE ON CAROTENOID CONTENT AND YOLK COLOR

Carotenoids are sources of pigments for egg yolk colouration, but they are susceptible to degradation. One of the approaches to protect them is encapsulation, a coating technology widely used in the food and feed industry. The aim of the present study was to investigate the use of marigold extract encapsulated with calcium alginate as a pigment source in egg production. Carotenoids from marigold flowers were extracted with acetone and dry extract was dissolved in sunflower oil. Carotenoids in oil were encapsulated by the ionic gelation method using sodium alginate and calcium chloride. After drying, the capsules were added to the maize-soybean laying hen diet in proportions of 0.5 and 1%. The laying hen trial was conducted in a completely randomized design with 3 treatments [(T0 – control, standard laying hen diet, T1– 0.5% and T2 – 1% (3 treatments×5 cages, 3 hens in each)]. Eggs were collected in 4th week and yolks were analysed for carotenoid profile and deposition efficiency and colour (CIE L*a*b*). The addition of microcapsules increased contents of all carotenoids in yolks compared to control [P<0.01; total carotenoids (µg/g): T0 – 17.17, T1 – 23.16, T2 – 28.13]. Contrarily, carotenoid deposition efficiency decreased with increasing content in the diet [P<0.01; total carotenoids (%): T0 – 13.23, T1 – 7.02, T2 – 5.35]. Also, it resulted in yolk colour intensity considerably lower than the control (a* value 19.52 vs. 7.18). The addition of calcium alginate microcapsules containing marigold carotenoids in the hen diet increased carotenoid content in yolks but not to the extent expected, resulting in low colour intensity.

Keywords: carotenoids, marigold extract (*Tagetes erecta L.*), yolk colour

1. Uvod

Boja žutanjka jajeta, prisutnost antioksidansa ili određenih vitamina uključujući i boju masti peradi kriteriji su koji određuju odabir proizvoda brojnih kupaca. Prehrambena industrija u kontinuiranoj je potrazi i razvoju novih proizvoda, a sve se više vodi računa o tome je li hrana dodatno obogaćena pojedinim biološki aktivnim sastojcima. U tom slučaju govorimo o funkcionalnoj hrani obogaćenoj sastojcima poput proteina, vitamina ili antioksidansa. S druge strane, osim sastojaka koji obogaćuju hranu svojim pozitivnim djelovanjem na zdravlje ljudi svjedoci smo vremena u kojem se u hranu dodaju sintetske boje i pigmenti, poboljšivači okusa i brojni drugi kemijski spojevi koji pospješuju okus, boju i dugotrajnost proizvoda, tzv. „shelf-life“. Boja je jedan od važnih čimbenika koji izravno utječe na interes potrošača, odabir hrane i prehrambene navike. Posljednjih godina upotreba bojila za hranu povećala se kako bi se proizveli ukusniji, hranjiviji, privlačniji i zdraviji proizvodi visoke senzorne kvalitete prema interesu potrošača (Gençdağ i sur. 2022.).

Prisutnost sintetskih bojila i pigmenata često dovodi do zabrinutosti potrošača i pitanja u vezi zdravstvene ispravnosti i štetnosti po zdravlje ljudi. Zbog niske cijene sintetskih ksantofila, kao što su kantaksantin i etil ester β -apo-8'-karotenske kiseline, takvi se karotenoidi najviše koriste u prehrambenoj industriji i industriji hrane za životinje. Unatoč tome, količina ovih karotenoida u smjesama za kokoši nesilice je ograničena zbog poznatog negativnog učinka na ljudsko zdravlje (Skřivanová i sur. 2017.). Navedena zabrinutost potiče razvoj i korištenje prirodnih pigmenata koji su sigurni za ljude, ali i domaće životinje čije će proizvode ljudi konačno konzumirati. Prirodna prehrambena bojila niske su ili neprisutne toksičnosti, ekološki prihvatljiva, lako se pripremaju i općenito dobivaju iz biljaka, kukaca, životinja i minerala koji se koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Gençdağ i sur. 2022.).

Kao obećavajuća zamjena sintetskim bojilima ističe se skupina prirodnih pigmenata, karotenoidi. Karotenoidi predstavljaju skupinu pigmenata koji se već godinama koriste kao prirodan izvor boje u animalnoj proizvodnji, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Osim svoje sposobnosti pigmentiranja pri čemu se ističu β -kriptoksantin i astaksantin, poznati su i po svojoj antioksidacijskoj aktivnosti, smanjenju rizika od malignih bolesti, bolesti oka, kardiovaskularnih bolesti i sl. (Kavtarashvili i sur. 2019.). Vrlo važna uloga određenih karotenoida, ponajprije β -karotena, je uloga provitamina A, koji se u organizmu pretvara u vitamin A. Zbog svoje osjetljivosti na okolišne uvijete poput sunčevog svjetla i temperature razvijaju se načini zaštite ovih vrijednih tvari pri čemu ne dolazi do narušavanja njihove aktivnosti. Jedan od takvih načina je inkapsulacija. Dodatkom karotenoida u hranidbu kokoši nesilica, dobivaju se jaja obogaćena karotenoidima s poznatim sposobnostima i blagodatima, koja se kao takva smještaju u kategoriju funkcionalne hrane. Kadifika (*Tagetes erecta* L.) predstavlja jedan od brojnih prirodnih izvora karotenoida, no posebno je zanimljiva biljna vrsta uzgajivačima kokoši nesilica. Razlog tomu je visok sadržaj karotenoida, osobito luteina

i zeaksantina koji pospješuju boju žutanjka, no i zbog karakteristika svojstvenih ovoj biljci poput antibakterijske, antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti.

1.1. Hipoteza i cilj istraživanja

Hipoteze ovog istraživanja su:

1. Dodatak inkapsuliranog ekstrakta kadifice utjecat će na profil karotenoida i njihovu učinkovitost deponiranja u žutanjak jaja kokoši nesilica.
2. Dodatak inkapsuliranog ekstrakta kadifice utjecat će na boju žutanjka jaja kokoši nesilica.

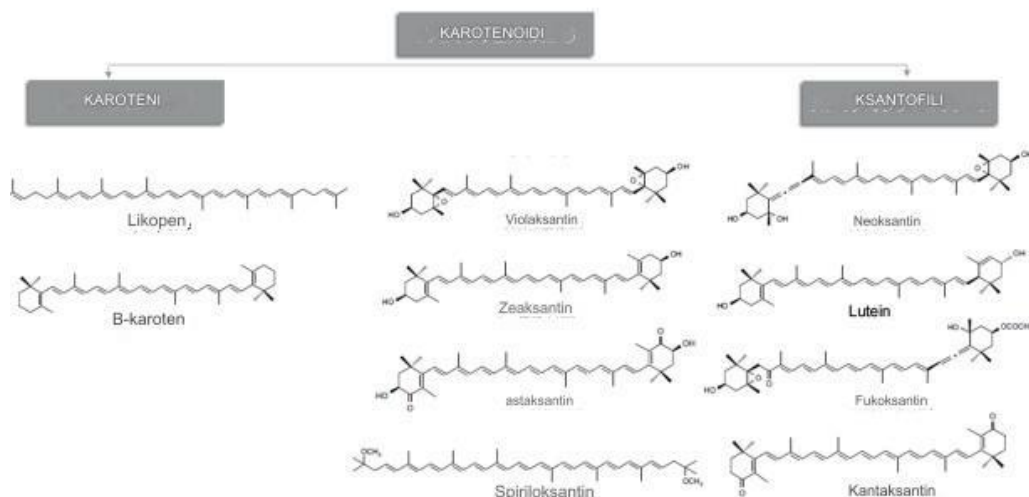
Na temelju postavljenih hipoteza cilj ovog istraživanja je ispitati utjecaj hranidbenih tretmana koji se razlikuju u sadržaju inkapsuliranog ekstrakta kadifice na sadržaj i učinkovitost deponiranja pojedinačnih (lutein, zeaksantin, β -kriptoksantin i β -karoten) i ukupnih karotenoida u žutanjak jajeta kokoši nesilica kao i utjecaj na boju žutanjka.

2. Pregled literature

2.1. Karotenoidi

Današnjoj znanosti poznato je preko 750 karotenoida izoliranih iz biljaka, životinja, gljiva i mikroorganizama. Karotenoidi su prirodno prisutni pigmenti koji doprinose karakterističnoj žutoj, narančastoj i crvenkastoj boji biljnog tkiva, uključujući lišće, voće, povrće i cvijeće. Unutar biljke imaju ključne uloge u fotosintezi, foto-zaštiti te razvoju kao hormoni stresa i signalne molekule (Park i sur. 2017.). Pronalazimo ih u rajčici, mrkvi, ananasu, papaji, kadifici, suncokretu, šafranu i lišću raznih biljnih vrsta. Posljednjih desetak godina su istraživanja biljnih pigmenata dobila na važnosti, s obzirom na njihovu provitaminsku ulogu, odnosno ulogu provitamina A, te se smatraju prirodnim antioksidansima. Istraživanja su dokazala njihovu ulogu u prevenciji kroničnih degenerativnih bolesti, kardiovaskularnih bolesti, malignih bolesti, makularne degeneracije i formiranja katarakta. Uključeni su i u promjene imunološkog sustava i staničnu komunikaciju, embrionalni razvoj, hematopoezu i apoptozu te posjeduju antioksidativna, protuupalna i antiproliferativna svojstva (González-Peña i sur. 2023.).

Karotenoidi su građeni od ponavljajućih izoprenskih jedinica, s cikličkom ili linearnom strukturom na oba kraja ugljikovodičnih lanaca, rezultirajući višestrukim cis i trans izomerima pri čemu su potonji zastupljeniji u prirodi. Karotenoidi se dijele na dvije skupine prema različitoj molekularnoj građi, karotene i ksantofile (slika 2.1.1.). Karoteni, poput α -, β -, γ -karotena i likopena visoko su topljivi u organskim otapalima i netopljivi u polarnim otapalima. Nasuprot tome, ksantofili su topljivi u polarnim (npr. alkoholi) i organskim (npr. eter, heksan) otapalima. Oni su oksigenirani derivati karotena, tvoreći alkohole, aldehide, ketone i kiseline. Poznatiji primjeri ksantofila su fukoksantin, lutein, zeaksantin i violaksantin (González-Peña i sur. 2023.). U biljci su karotenoidi smješteni u biljnim organelama, plastidima, kao što su kromoplasti, amiloplasti i elaioplasti. U voću, cvijeću i korijenju, karotenoidi se također nalaze u kromoplastima, dok se u žitaricama i uljaricama nalaze u amiloplastima, odnosno elaioplastima. Suprotno tome ksantofili se nalaze u slobodnom obliku u tkivima biljaka, dok se u voću i povrću mogu naći u obliku estera masnih kiselina (González-Peña i sur. 2023.).

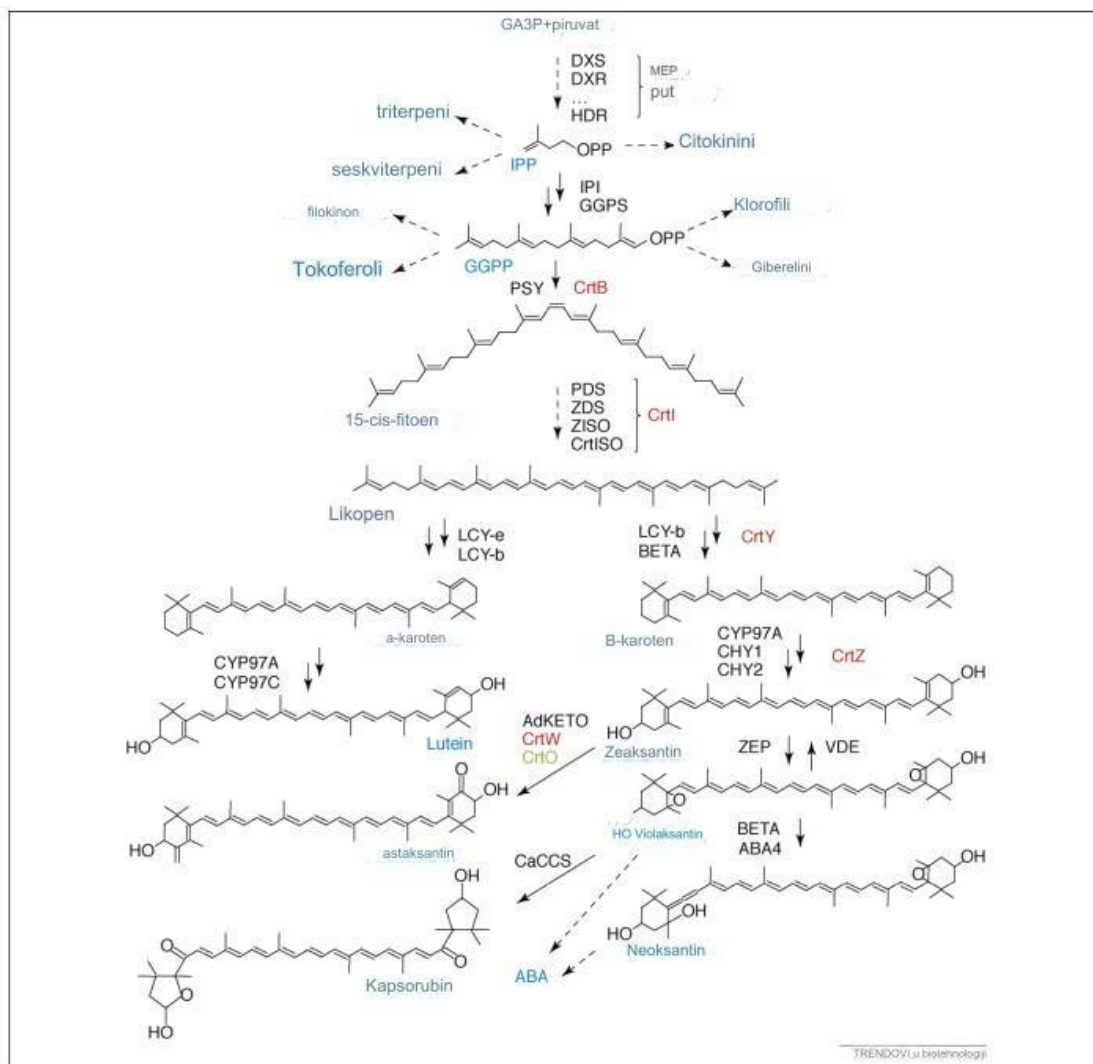


Slika 2.1.1. Podjela karotenoida i njihovi strukturni prikazi
(Izvor: Fernandes i sur. 2018.)

2.1.1. Sinteza i uloga karotenoida

Biosinteza karotenoida odvija se u kloroplastima, uz pomoć sljedećih enzima: geranilgeranilpirofosfat sintaza (GGPS), fitoen sintaza (PSY), ζ -karoten desaturaza (ZDS), fitoen desaturaza (PDS), likopen- ζ -ciklaza i likopen- β -ciklaza. Ksantofili se sintetiziraju iz karotena; lutein nastaje djelovanjem α -karoten cikličke- ζ -hidroksilaze (CHY- ζ) kroz α -sintetski put. β -karoten se pretvara u β -kriptoksantin kroz β -sintetski put, u reakciji koju katalizira β -karoten-hidroksilaza (CHY- β), koja također katalizira njegovu pretvorbu u zeaksantin. Osim toga, zeaksantin se može pretvoriti u violaksantin s pomoću zeaksantin epoksidaze (ZEP); obrnuto, violaksantin se može pretvoriti u zeaksantin s pomoću violaksantin deepoksidaze (VDE). Konačno, violaksantin se pretvara u neoksantin s pomoću neoksantin sintaze (NXS) (González-Peña i sur. 2023.) Sinteza karotenoida detaljnije je prikazana na slici 2.1.1.1.

Poznato je kako su karotenoidi biološki aktivni spojevi brojnih pozitivnih i imunostimulirajućih svojstava. Njihova je uloga u fotosintetskim organima vezana uz proces fotosinteze i zaštite od fotolize tako da prikupljaju sunčevu energiju te ju prenose na klorofile (Maoka 2020.). S druge strane, karotenoidi u nefotosintetskim organima pokazuju strukturnu raznolikost i nastaju sekundarnim metaboličkim reakcijama kao što su oksidacija, cijepanje polienskih lanaca te cis- i trans-izomerizacija. U nefotosintetskim organima imaju uloge zaštitnika od fotolize, antioksidansa, atraktanata i prekursora biljnih hormona (Maoka 2020.).



Slika 2.1.1.1. Prikaz sinteze karotenoida
(Izvor: Giuliano i sur. 2008.)

Kao što je spomenuto ranije, otkriveno je više od 700 karotenoida, a otprilike 50 karotenoida ima ulogu provitamina vitamina A (Jurić i sur. 2020.). Navedeno svojstvo izuzetno je važno, budući da ljudi i životinje ne mogu samostalno sintetizirati vitamin A, već ga moraju unositi hranom. Stoga, bitno je održavati koncentraciju ovih esencijalnih mikronutrijenata konzumacijom voća i povrća te animalnih proizvoda (jaja, mlijeko) koji su bogati karotenoidima. Hranjivost karotenoida leži u njihovoj provitaminskoj aktivnosti, a najpoznatiji provitamini vitamina A su β -karoten, α -karoten, γ -karoten i β -kriptoksantin. Ključni strukturalni zahtjev molekule provitamina A je jedan nesupstituirani prsten vezan za cjelovitu strukturu konjugiranog poliena. Zato je β -karoten sa svoje dvije bitne strukturne jedinice najjači provitamin A (Marounek i Pebriansyah 2018.). Ovi karotenoidi nalaze se u mrkvi, špinatu, batatu, naranči. Međutim, važnija od količine sadržaja pojedinog karotenoida je njegova biodostupnost i sposobnost konverzije u retinol, jedan od oblika vitamina A. Vitamin A je esencijalan za razvoj i održavanje pravilnog vida kao i za modulaciju ekspresije gena, poticanje embrionalnog razvoja, reprodukcije, staničnog rasta i diferencijacije (González-Peña i

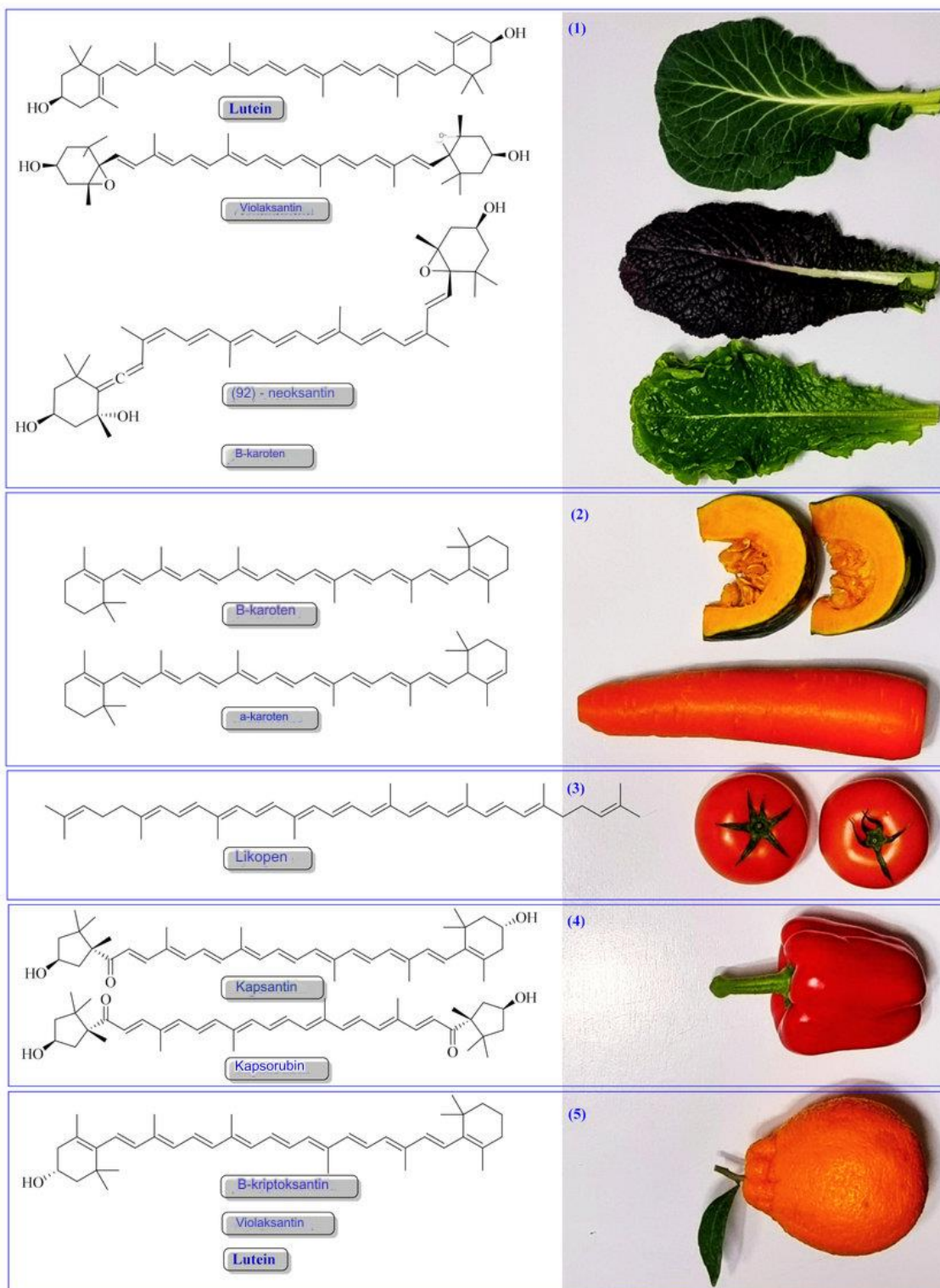
sur. 2023.). Općenito, karotenoidi imaju pozitivan utjecaj na zdravlje oka i smanjuju učestalost različitih vrsta malignih oboljenja. Zdravstvene koristi najpoznatijih karotenoida kod ljudi detaljnije su prikazane u tablici 2.1.1.1.

Tablica 2.1.1.1. Zdravstvene koristi najpoznatijih karotenoida kod ljudi (Jurić i sur. 2020.)

Karotenoidi	Zdravstvene prednosti
α -karoten	Smanjuje rizik od pojave glaukoma, raka želuca, jetre, pluća, dijabetesa, kardiovaskularnih i kroničnih respiratornih bolesti, inhibira proliferaciju stanica raka
β -karoten	smanjuje BMI indeks, sadržaj potkožnog masnog tkiva, ima najveću aktivnost pretvaranja u vitamin A, moćan antioksidans, smanjuje osjetljivost na rak dojke kod žena u predmenopauzi
β -kriptoksantin	smanjuje rizik od nakupljanja visceralne masti i visokog krvnog tlaka, suzbija peroksidaciju lipida i sprječava upalu uzrokovanu oksidacijskim oštećenjem, smanjuje rizik od raka debelog crijeva, poboljšava gustoću koštane mase
likopen	štiti stanice od ionizacijskog oštećenja, smanjuje razvoj najčešćeg tipa raka bubrega, inhibira infekciju bakterijom <i>Helicobacter Pylori</i> , smanjuje rizik od raka prostate i krvni tlak kod hipertenzije
lutein	antimikrobni učinak i antioksidacijska aktivnost, prevenira hepatotoksičnost, poboljšava imunitet, moćno sredstvo zaštite moždane aktivnosti, filtrira štetno plavo zračenje u oku i prevenira proizvodnju slobodnih radikala
zeaksantin	štiti od neurodegenerativnih poremećaja, štiti od kardiovaskularnih bolesti, filtrira štetno plavo zračenje u oku, prevenira proizvodnju slobodnih radikala, sprječava i usporava povećanje gustoće leće oka uzrokovano starenjem

Osim provitaminske uloge, karotenoidi igraju važnu ulogu u pigmentaciji hrane. Boja je jedan od najistaknutijih parametara prema kojem se procjenjuje kvaliteta hrane jer može potaknuti ili potisnuti nečiji apetit. Prehrambene boje čine hranu privlačnijom, ukusnijom i prepoznatljivijom. Umjetna bojila koriste se u hrani sa ciljem poboljšanja izgleda te ekonomske motivacije potrošača jer hrana atraktivnih boja povećava privlačnost i potiče apetit. Prirodna bojila postaju sve popularnija širom svijeta zbog svojih terapijskih i medicinskih učinaka kao i zbog visoke toksičnosti sintetskih bojila (Ghosh i sur. 2022.). U peradarskoj industriji već se duže vrijeme koriste karotenoidi za poboljšanje i naglašavanje boje žutanjka jajeta. Boja žutanjka jedan je od važnih čimbenika kvalitete jaja na koje proizvođači trebaju obratiti pozornost i prilagoditi se očekivanjima potrošača (Mahanta i sur. 2022.). Često je mišljenje potrošača kako su jaja narančastije ili žučte boje žutanjka zdravija te da su proizvedena od nesilica držanih na prirodnim ispuštima gdje imaju pristup prirodnim karotenoidima. Međutim, treba imati na umu kako je svjetska proizvodnja konzumnih jaja velikih razmjera, prema FAOSTAT (2022.) podacima svjetska proizvodnja jaja u 2022. godini iznosila je ~1,6 milijardi, većina proizvođača ne koristi prirodne ispuste, već im se u hranu dodaju sintetski karotenoidi. Boja žutanjka kokošnjih jaja ovisi o prisutnosti karotenoida u krmnim smjesama za nesilice, a njihova sposobnost prelaska iz smjese u žutanjak jajeta iznosi 20-60% unatoč tome što nesilice ne mogu sintetizirati pigmente vlastitim biokemijskim procesima (Spasevski i sur. 2017.).

Boja biljnog tkiva može varirati od crvene do narančaste boje ovisno o broju konjugiranih dvostrukih veza i različitih funkcionalnih skupina u karotenoidnim molekulama (Park i sur. 2017.). Boja određenih karotenoida prikazana je na slici 2.1.1.2. Također, poznato je kako karotenoidi s visokom provitaminskom aktivnošću imaju niska pigmentacijska svojstva (Marounek i Pebriansyah 2018.).



Slika 2.1.1.2. Prikaz boja raznih karotenoida i njihovih izvora
(Izvor: Saini i sur. 2022.)

2.2. Biološka funkcija karotenoida kod kokoši nesilica

Karotenoidi su najpoznatiji po svojoj pigmentacijskoj ulozi, no njihova je uloga daleko opsežnija. Karotenoidni pigmenti su uobičajeni sastojci u hrani kokoši nesilica za konzumna jaja. Zbog niske cijene sintetskih ksantofila, kao što su kantaksantin i etil-ester β -apo-8'-karotenska kiselina, upravo se oni najčešće i koriste. Međutim, količina ovih karotenoida u smjesama kokoši nesilica je ograničena zbog poznatog negativnog učinka na ljudsko zdravlje (Skřivanová i sur. 2017.). Prema tome, kantaksantin u smjesi ne smije prelaziti 8 mg/kg (EFSA 2014.), a sigurna doza etilnog estera β -apo-8'-karotenske kiseline za kokoši nesilice također iznosi 8 mg/kg (EFSA 2016.). Prilikom proizvodnje konzumnih jaja kokoši nesilica pozornost je najčešće usmjerena na krajnji proizvod, ali put koji karotenoidi prođu od početnog koraka konzumacije do konačnog deponiranja u žutanjak jajeta je puno duži. Nesilice će najprije zadovoljiti vlastite potrebe na ovim vrijednim, biološki aktivnim spojevima te će nakon toga deponirati višak u žutanjak jajeta, masno tkivo i sl.

Obogaćivanje smjesa nesilica ksantofilima pokazuje pozitivan učinak na zdravlje i dobrobit nesilica. Navedenu tvrdnju potvrđuje znanstveni rad Kavtarashvili i sur. (2019.) u kojem se istraživao utjecaj mješavine ksantofila (40% luteina, 60% zeaksantina) za kokoši nesilice u sadržaju od 20-40 g/t potpune krmne smjese u dobi od 34. tjedna na indikatore antioksidacijskog sustava jetre i krvi (aktivnost glutacion peroksidaze, superoksid dismutaze i katalaze, ukupni antioksidacijski kapacitet, omjer oksidiranog i reduciranog oblika glutaciona te sadržaja malondialdehida). Autori su utvrdili povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima i smanjenje sadržaja malondialdehida kao direktnog produkta oksidacije masti.

2.2.1. Jaja – utjecaj karotenoida na nutritivna i kvalitativna svojstva

Jaje predstavlja jednu od najuravnoteženijih prirodno prisutnih namirnica bogatu proteinima, vitaminima i mineralima, ukusno većini potrošača te se može pripremati na razne načine (Mim i sur. 2021.). Može se reći kako su jaja hrana koja je posljednjih pedesetak godina uzrokovala razne polemike vezane uz utjecaj na zdravlje ljudi. Primjerice, 1968. godine u SAD-u, Američka kardiološka udruga (AHA) preporučila je i poticala ljude na konzumaciju jaja manje od tri puta tjedno tvrdeći kako je velika količina kolesterola u hrani uzrok visokoj koncentraciji kolesterola u krvi te posljedično uzrok kardiovaskularnih bolesti. Suprotno tome, već 1995. godine želi se stvoriti jednolično mišljenje o prehranbenim preporukama za jaja te se potiču *in vitro* i *in vivo* istraživanja kako bi se konzumacija i pozitivno mišljenje o jajima kao značajnoj namirnici povratilo (Réhault-Godbert i sur. 2019.)

U međuvremenu, osim što se povratilo pozitivno mišljenje o konzumaciji jaja, ona su postala izvor brojnih istraživanja u kontekstu funkcionalne hrane. Jaja se smatraju funkcionalnim onda kada sadrže određenu koncentraciju poželjnih biološki aktivnih tvari poput karotenoida, omega masnih kiselina i sl., a pritom pozitivno utječu na zdravlje potrošača. Nedavni porast javne svijesti o ulozi karotenoida (osobito ksantofila) u prevenciji i dijetoterapiji pojedinih onkoloških, kardiovaskularnih i očnih bolesti ljudi i njihovom povezanošću s antioksidacijskim i imunomodulatornim svojstvima učinili su da se ove tvari koriste za poboljšanje boje žutanjka te proizvodnju dizajnerskih i funkcionalnih jaja (Kavtarashvili i sur. 2019.). Jaja obogaćena karotenoidima također su postala zanimljiva zbog svoje visoke bioraspoloživosti kod ljudi u usporedbi s konzumacijom karotenoida iz drugih izvora. Razlog tomu je prirodni micelarni matriks sačinjen od triglicerida, fosfolipida i kolesterola, koji se nalazi u žutanjku jajeta te služi kao sredstvo učinkovite apsorpcije karotenoida iz jaja kod ljudi (Dansou i sur. 2023.).

Kvaliteta jaja obuhvaća brojne pokazatelje te ih možemo podijeliti na vanjske i unutarnje. Vanjski pokazatelji kvalitete jaja su masa jaja, oblik i kvaliteta ljuske koja obuhvaća čvrstoću i debljinu. Unutarnji pokazatelji su indeks žutanjka i bjelanjka, pH vrijednost, stupanj starenja, vrijednosni broj, analiza osnovnih kemijskih sastojaka, veličina zračne komorice i dr. (Kralik i sur. 2008.). Od unutarnjih pokazatelja kvalitete ističe se visina zračne komorice koja ukazuje na starost jaja odnosno svježinu. Zračna komora se povećava starenjem jaja zbog isparavanja vode iz njegovog sadržaja (Trpčić i sur. 2010.). Kvaliteta žutanjka mjeri se bojom žutanjka i snagom vitelinske membrane. Vitelinska membrana je tanka opna koja okružuje žutanjak. Ako je slaba, žutanjak će lakše puknuti i razliti se. Kvaliteta bjelanjka određena je visinom bjelanjka koja je udaljena 1 cm od ruba žutanjka. Ista visina bjelanjka prevodi se u Haughove jedinice (HU) koje se koriste za određivanje svježine bjelanjka i jajeta jer na njih utječe način i vrijeme skladištenja. Nekoliko istraživanja pokazalo je da karotenoidi ne utječu na fizičku kvalitetu jajeta poput mase jaja, debljine ljuske, visine bjelanjka (HU). Unatoč tome uočeni su i pozitivni učinci. Mase jaja i mase žutanjka nesilica hranjenih dodatkom pročišćenog likopena (62,80 g i 18,66 g) i dodatkom praha rajčice (63,01 g i 18,75 g) bile su veće od istih masa kontrolne skupine (60,50 g i 16,49 g) (Dansou i sur. 2023.). Poznato je da karotenoidi smanjuju pojavu sindroma masne jetre kod kokoši nesilica obnavljajući mitohondrijsku funkciju koja normalizira metabolizam lipida kroz poboljšanje ravnoteže lipolize i sinteze masti. Stoga, moguće je pretpostaviti kako karotenoidi poboljšanjem metabolizma lipida u jetri povećavaju masu jaja budući da metabolizam lipida regulira sintezu i razgradnju određenih masnih kiselina koje pritom doprinose povećanju mase žutanjka i cijelog jaja (Dansou i sur. 2023.).

Uz povećanje sadržaja ukupnih karotenoida, što je važan faktor nutritivne vrijednosti jaja, karotenoidi se koriste za mnoge druge svrhe kao što su smanjenje razine kolesterola, regulacija triglicerida i sadržaja masnih kiselina. Karotenoidi također pomažu u smanjenju peroksidacije lipida u svježim jajima uz pomoć djelovanja astaksantina. Na taj način povećava se aktivnost enzima superoksid dismutaze i glutation peroksidaze (Dansou i sur. 2023.)

2.2.2. Zahtjevi tržišta za bojom žutanjka

Može se reći kako je primarna funkcija karotenoida u peradarskoj industriji poboljšanje boje žutanjka jajeta i mesa (Dansou i sur. 2023.). Sa stajališta proizvođača, potrošača i prerađivača, obojenost žutanjka je izuzetno značajna i uvelike utječe na parametre kvalitete jaja kao što su rok trajanja, vizualna privlačnost i senzorna kvaliteta (Hussain i sur. 2024.). Prema navedenim spoznajama vidljivo je kako je boja odlučujući faktor odabira potrošača. Unatoč tome što ne dolazi do promjene u nutritivnom aspektu, značajne promjene u boji žutanjka potrošačima znaju biti neprivlačne i konačno neprihvatljive, budući da veliki broj potrošača ne smatra jaja blijede boje žutanjka zdravim niti ukusnim. Isto tako, boja žutanjka ne garantira dodanu hranidbenu vrijednost u svakom slučaju.

Ovisno o geografskom položaju, kulturi i tradiciji, potrošači preferiraju određenu boju žutanjka. Primjerice, njemački, nizozemski, španjolski i belgijski potrošači preferiraju žutanjke s vrijednostima 13 – 14 prema Yolk Color Fan (YCF) skali, dok su žutanjci s vrijednostima 11 – 12 prema YCF skali preferirani u Francuskoj, južnoj Engleskoj i Finskoj. S druge strane, američki potrošači više preferiraju žutanjak boje 7 – 10 prema YCF skali, dok potrošači u Irskoj, sjevernoj Engleskoj i Švedskoj preferiraju žutanjke s vrijednostima 8 – 9 prema YCF skali (Spasevski i sur. 2017.). YCF lepeza prikazana je na slici 2.2.1.1.



Slika 2.2.2.1. Yolk Colour Fan lepeza nijansi žutanjka jajeta

Izvor: <https://www.dsm.com/anh/products-and-services/tools/yolkfan.html> – pristup 07.08.2024.

Isto tako, potrošači često vjeruju da su jaja iz alternativnih sustava proizvodnje, kao što su sustavi slobodnog uzgoja, uzgoja na ispustima i seoskim gospodarstvima koji omogućuju uzgoj peradi u manje skućenim prostorima s pristupom otvorenom,

ukusnija, imaju bolju teksturu i boju jačeg intenziteta od onih iz konvencionalnog kaveznog uzgoja (Zurak i sur. 2022.). Za poželjnu boju kože brojlera i žutanjka preporučuje se mješavina žutih i crvenih karotenoida, no proces je kompleksniji od samog dodavanja pigmenta potpunoj krmnoj smjesi. Za postizanje željene boje žutanjka važno je osigurati odgovarajuće količine i specifične kombinacije ključnih karotenoida u hranidbi kokoši nesilica. Kombinacija žutih i crvenih karotenoida je isplativija budući da crveni karotenoidi imaju veći utjecaj na promjenu boje od hranjenja samo žutim karotenoidima (Zurak i sur. 2022). Ksantofili lutein i zeaksantin najpoželjniji su i najučinkovitiji karotenoidi po pitanju pigmentacijske uloge. Lutein je karotenoid karakteristične žute boje, dok je zeaksantin žute do narančaste boje. Postoje dvije komponente pigmentacije žutanjka. Prva, faza zasićenja, uključuje deponiranje žutih karotenoida za stvaranje žute baze, što je važno za konačnu boju. Nakon što se uspostavi žuta baza, dodavanjem crvenih karotenoida dolazi do promjene nijanse na više narančasto-crvenu. Prema tome je druga faza nazvana faza boje. Nastavno, Spasevski i sur. (2017.) su utvrdili kako dodatak kadifice (1%) kao glavnog izvora žutih pigmenta najbolje djeluje u kombinaciji s dodatkom paprike (0,5%) postižući nijansu 12,56 prema YCF skali.

2.3. Kadifica (*Tagetes erecta* L.) kao izvor karotenoida

Kadifica (*Tagetes erecta* L.) je jedna od najpoznatijih biljaka iz porodice *Asteraceae*, porijeklom iz Središnje Amerike osobito s područja Guatemale i Meksika. U Europu je donesena u 16. stoljeću iz Meksika, a danas se uzgaja diljem svijeta kao ukrasna biljka, osim toga latica kadifice su jestive pa se konzumiraju u sklopu salata i drugih jela (Burlec i sur. 2021.). Kadifica ima mnoštvo naziva poput američke kadifice, afričke kadifice, azteške kadifice ili meksičke kadifice. Španjolski i portugalski narodni nazivi poput „flor de muerto“ i „cravo de defuntos“ odnose se na uobičajenu praksu Središnje Amerike gdje se vodeni ekstrakt kadifice koristio za pranje tijela nakon smrti, s obzirom na njegov ugodan i intenzivan miris, a osim toga, ovaj cvijet se često može pronaći i na grobljima.

Kadifica je prepoznatljiva po svojoj karakterističnoj boji latica koja može biti između žute i narančaste boje. Neke od glavnih vrsta *Tagetes* roda uključuju *T. erecta* (afrička ili američka kadifica), *T. patula* (francuska kadifica) i *T. signata* 'pumila' (pečatna kadifica). Svaka vrsta iz roda *Tagetes* razlikuje se na temelju različitih značajki kao što su veličina cvata, oblik i boja; veličina biljke i oblik lista. Nadalje, brojne su fitokemikalije identificirane u ovim vrstama uključujući terpenoide, flavonoide, alkaloidne, poliacetilene i masne kiseline. Od toga, karotenoidi i flavonoidi koji su dijelovi pigmenta kadifice glavni su bioaktivni sastojci (Park i sur. 2017.). Za intenzivnu obojenost latica kadifice zaslužni su karotenoidi, točnije, ksantofili lutein i zeaksantin. S obzirom na visok sadržaj luteina, koji ima različite primjene, kadifica je najviše istražena zbog svojih predstavnika iz skupine karotenoida. Procijenjeno je da se u svijetu za uzgoj ove vrste koristi preko 7000 ha pri čemu svaka biljka može osigurati oko 330 mg ksantofila

(Burlec i sur. 2021.). Ekstrahirani lutein koristi se u komercijalne svrhe kao dodatak hrani kokoši nesilica za bojenje žutanjka konzumnih jaja. Štoviše, koristi se za proizvodnju dodataka prehrani namijenjenih sprječavanju gubitka vidne oštrine uzrokovane makularnom degeneracijom uzrokovanom starenjem ili sprječavanju drugih očnih bolesti. Hlapljivo ulje biljke također je proučavano te se koristi u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Burlec i sur. 2021.).

Kako navode Matache i sur. (2024.), sadržaj karotenoida u kadifici iznosi oko 1079,50 µg/g uz 232,34 µg/g β-karotena i 652,34 µg/g ksantofila. Ekstrakt kadifice bogat je izvor karotenoida od kojih oko 80 do 90% čini lutein (Tokas i sur. 2018.). Ekstrakt kadifice komercijaliziran je širom svijeta i koristi se kao aditiv u smjesama za kokoši nesilice s ciljem obojenja žutanjka jajeta, kože i masnog tkiva nesilica. Ekstrakt kadifice također ima primjenu u bojanju hrane poput senfa, jestivih ulja i drugih preljeva za salate, sladoleda, jogurta, kolača i mliječnih proizvoda. Ekstrakt u pročišćenom obliku sa sadržajem luteina poznate koncentracije i čisti kristalni lutein izoliran iz cvijeta kadifice dopušteni su za upotrebu u prehrambenoj industriji. Brašno i ekstrakt kadifice navedeni su s indeksom boje 75125 i dopušteni su u hrani za kokoši nesilice do maksimalne granice od 1% (Tokas i sur. 2018.).

Osim uloge prirodnog pigmenta kadificu odlikuju brojne druge karakteristike poput antibakterijske, antimikrobne, antioksidativne, insekticidne i nematocidne aktivnosti. Uz to pokazuje zaštitni učinak na zdravlje jetre, analgetsko djelovanje, pospješuje zacjeljivanje rana i dr. (Gopi i sur. 2012.).



Slika 2.3.1. Kadifice žutih i narančastih cvjetova

Izvor: <https://www.feedipedia.org/content/tagetes-erecta-flowers> - pristup 07.08.2024.



Slika 2.3.2. Suhi ekstrakt kadifice

Izvor: <https://arizoneinternational.com/product/tagetes-erecta-extract> - pristup 07.08.2024.

2.4. Inkapsulacija karotenoida

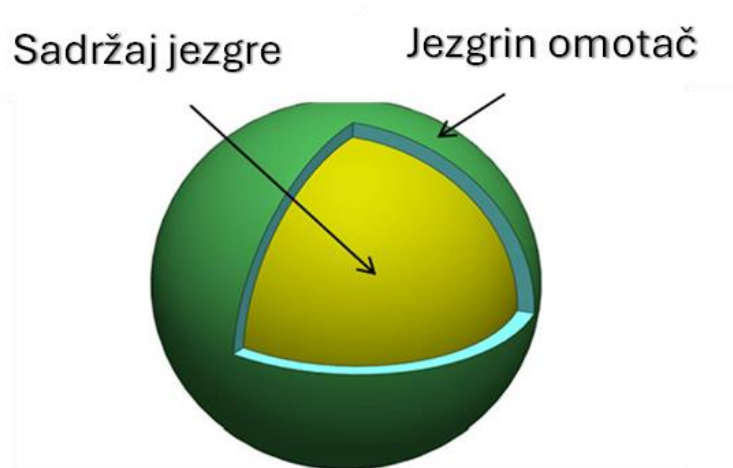
Osim obojenja, karotenoidi su također važni za zdravlje biljaka i životinja, oni su tetraterpeni karakterizirani konjugiranim sustavom dvostrukih veza s delokaliziranim π -elektronima. Međutim, ista svojstva koja čine karotenoide korisnima u funkcioniranju zdravog tkiva stvaraju izazove u sprječavanju degradacije u prehrambenim proizvodima. Kako bi proizveli stabilan sadržaj karotenoida u funkcionalnoj hrani moraju se pažljivo razmotriti putovi koji mogu dovesti do razgradnje karotenoida (Boon i sur. 2010.).

Tijekom skladištenja i obrade hrane, karotenoidi se uništavaju procesom oksidacije. Pigmenti karotenoida su osjetljivi na pH, temperaturu, toplinu i svjetlost. Termička obrada karotenoida može proizvesti hlapljive spojeve i veće nehlapljive spojeve dok izlaganje svjetlu dovodi do njihove razgradnje. Primarni uzročnici razgradnje karotenoida su oksidacija i izomerizacija što rezultira gubitkom boje. Toplina, svjetlost i kiseline uzrokuju izomerizaciju karotenoida iz trans-izomera u cis-izomere (Ghosh i sur. 2022.).

Kako bi se osigurala zaštita od oksidacije te poboljšala opća stabilnost karotenoida, razvijene su različite tehnike inkapsulacije. Ove tehnike su rezultirale relativnim uspjehom i dodatno povećale brzinu otapanja ovih liposolubilnih spojeva u vodi. Inkapsulacija se definira kao tehnologija pakiranja krutih, tekućih ili plinovitih materijala u matrice koje otpuštaju svoj sadržaj kontroliranim brzinama u određenim uvjetima. Posljednjih godina, proces inkapsulacije privukao je značajan interes prehrambene, farmaceutske, nutraceutske i kozmetičke industrije, zbog široke primjene u dizajnu funkcionalnih proizvoda kao što su hrana i/ili sastojci hrane (Vinceković i sur. 2017.). Glavni cilj inkapsulacije u prehrambenoj industriji je zaštititi osjetljive sastojke hrane od vlage, oksidacije, topline, svjetlosti ili ekstremnih uvjeta tijekom postupaka obrade i tako osigurati produljen rok trajanja (tzv. „shelf-life“) ili čak zamaskirati određene karakteristike hrane poput nepoželjnih okusa i zadovoljiti organoleptičke zahtjeve potrošača (Santos i Meireles 2010.). Trenutno se proučava korištenje superkritičnih

tekućina i plinova u inkapsulaciji pigmentata. Ghosh i sur. (2022.) utvrdili su kako je zbog niskih temperatura superkritične tekućine i svoje netoksičnosti, metoda superkritične mikronizacije trenutno jedna od vodećih metoda inkapsulacije.

Mikroinkapsulacija i nanoinkapsulacija također su često korištene metode za zaštitu pigmentata od štetnih vanjskih utjecaja. Razlika između ovih metoda je u veličini krajnjih kapsula: mikroinkapsulacijom nastaju mikrokapsule veličine od 1 do 1 000 μm , dok nanoinkapsulacijom nastaju nanočestice veličine $< 1\ 000\ \text{nm}$.



Slika 2.4.1. Prikaz građe mikrokapsule

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Composition-of-an-oil-microcapsule-in-simplified-form_fig1_289488566 - pristup 07.08.2024.

Inkapsulirani pigmenti poznati su prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te se koriste dugi niz godina. Opširna su istraživanja pokazala kako se mikroinkapsulacija koristi za povećanje kemijske stabilnosti i biodostupnosti luteina. Osim toga dokazano je kako mikroinkapsulacija povećava topivost i apsorpciju luteina od 15 do 50% u usporedbi s neinkapsuliranim luteinom kao i stabilnost pri izloženosti toplini, svjetlosti i kisiku. Mikrokapsule luteina poboljšale su pigmentaciju žutanjka i apsorpciju luteina kod kokoši nesilica u usporedbi s neinkapsuliranim luteinom (Wen i sur. 2021.). Također, učinkovitost inkapsulacije i stabilnost kapsula uvelike ovisi o sastavu omotača kapsule koji se može odabrati iz široke palete polimera kao što su želatina i modificirani škrob (Wen i sur. 2022.).

3. Materijali i metode

Svi postupci držanja, uzorkovanja i provođenja analiza na nesilicama tijekom eksperimenta provedeni su u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (OG 102/17) i Uredbom o zaštiti životinja korištenim u znanstvene svrhe (OG 55/13) te odobreni od Bioetičkog povjerenstva za zaštitu i dobrobit životinja Agronomskog fakulteta (KLASA: 114-01/24-03/06, URBROJ: 251-71-29-02/19-24-2).

Istraživanje je provedeno na 45 kokoši nesilica pasmine Lohmann Brown u pokusnom objektu Zavoda za hranidbu životinja Sveučilišta u Zagrebu Agronomskom fakultetu. Prilikom prvotnog smještanja nesilice su imale 18 tjedana, a preuzete su s peradarske farme Nujić Marko d.o.o. iz Ribnice. Istraživanje je započelo 4. ožujka 2024. godine kada su nesilice imale 44 tjedna, a završilo je 7. travnja 2024. godine. Dva tjedna prije početka provođenja istraživanja nesilice su podvrgnute pripremnom periodu u kojem su hranjene potpunim krmnim smjesama za kokoši nesilice bez dodatka pigmentata s ciljem čišćenja organizma od rezervi karotenoida iz hrane kojom su hranjene prije pokusa.

3.1. Smještaj nesilica i hranidbeni tretmani

45 kokoši nesilica smješteno je u 15 obogaćenih kaveza postupkom randomizacije. U svakom su se obogaćenom kavezu nalazile 3 jединke, dok su kavezi bili raspoređeni u jednom slobodnostojećem baterijskom sustavu s 24 kaveza. Dimenzije kaveza iznosile su 60 cm visine te je površina svakog iznosila 60 × 64 cm. Prema tome svaka je nesilica imala 1 280 cm² na raspolaganju, a kavezi su sadržavali dvije nipl pojilice te pocinčane žljebaste hranilice s vanjske strane prednjeg dijela kaveza (12 cm/nesilici) i drvene prečke (15 cm/nesilici). Ispod kaveza su se nalazile limene posude namijenjene skupljanju izmeta, dok se ispod hranilica nalazio žlijeb za sakupljanje jaja. Temperatura pokusnog objekta iznosila je 18 ± 2 °C, a svjetlosni režim činilo je 16 sati svjetla i 8 sati tame. Temperatura i vlaga su se održavale automatiziranim sustavom ventilacije uz upotrebu električnih radijatora u slučaju potrebe dogrijavanja prostora.

Nesilice su podvrgnute pripremnom periodu u trajanju od dva tjedna, od 19. veljače do 3. ožujka 2024. godine. Cilj ovog perioda je bio pripremiti metabolizam nesilica na novo istraživanje i očistiti probavni trakt od rezervi karotenoida nastalih zbog hrane korištene prije početka pokusa. Odnosno, navedena dva tjedna nesilice su hranjene potpunom krmnom smjesom za nesilice bez dodatka kantaksantina, sintetskog pigmenta. Potpuna krmna smjesa je sastavljena tako da zadovoljava potrebe komercijalnih Lohmann Brown nesilica u početnoj fazi proizvodnje jaja prema National Research Council (NRC. 1994.) i uputama Lohmann Breeders GmbH (2022.). Sirovinski sastav potpune krmne smjese za kokoši nesilica i vitaminsko-mineralnog premiksa koji se koristi za izradu iste prikazan je u tablicama 3.1.1. i 3.1.2. Potpuna krmna smjesa za

nesilice proizvedena je u dovoljnim količinama za cijelo trajanje pokusa kako ne bi bilo razlika u rezultatima zbog promjena sastojka smjese. Pripremljena je u tvornici stočne hrane Kušić promet d.o.o. iz Sv. Ivana Zeline.

Tablica 3.1.1. Sirovinski sastav potpune krmne smjese za kokoši nesilice

KRMIVA	UDIO / %
Zrno kukuruza	60,00
Sojina sačma	26,20
Ulje suncokreta	3,00
Vapnenac	8,80
MonoCaP	1,20
Sol	0,40
Metionin	0,15
Premiks	0,25
Ukupno	100,00

Tablica 3.1.2. Sastav 1 kg premiksa dodanog u potpunu krmnu smjesu kokoši nesilica

Vitamini	Količina	Mikroelementi- Biopleks iz TNT Layer Pack mg
Vitamin A	10 000 IJ	Biopleks Zn 30
Vitamin D	2500 IJ	Biopleks Mn 30
Vitamin E	20 mg	Biopleks Cu 5
Vitamin K	3 mg	Biopleks Fe 5
Vitamin B1	1 mg	SelPleks 0,2
Vitamin B2	4 mg	Jod 1
Vitamin B6	3 mg	
Vitamin B12	25 mg	
Pantotenska kiselina	10 mg	
Nikotinamid	30 mg	
Folna kiselina	0,5 mg	
Biotin	50 mg	
Kolin	400 mg	

Od 4. ožujka, kavezi su raspoređeni prema tretmanima, T0, T1 i T2, pri čemu je započeo pokusni period. Potpune krmne smjese za nesilice tretmana su pripremljene umješavanjem izvora pigmenata u potpunu krmnu smjesu za nesilice. U smjesu tretmana T0 dodano je 8 mg/kg pigmenta Carophyll red (DSM-Firmenich AG, Švicarska) dok je u smjese tretmana T1 i T2 dodan različit udio inkapsuliranih karotenoida. U T1 smjesu ručno je umiješano 0,5% mikrokapsula (slika 3.1.1.), dok je u T2 smjesu umiješano 1%. Svaki tretman obuhvaćao je pet kaveza, tretmanima su kavezi nasumično dodijeljeni. Raspored kaveza prikazan je u tablici 3.1.3. Nesilice su imale slobodan pristup hrani i vodi. S ciljem smanjenja rasipa smjese izračunom je

dobivena dnevna količina od 125 g/nesilica, pa se prema tome tri puta tjedno (utorak, četvrtak, subota) hranilice punilo sa 700 g smjese, a u ponedjeljak 300 g po potrebi.

Tablica 3.1.3. Nasumičan raspored kavez-tretman

Baterija 3			
61-T1	62-T2	63-T0	64-T1
65-T2	66-T0	67-T1	68-T2
Baterija 4			
69-T0	70-T2	71-T1	72-T0
73-T1	74-T2	75-T0	



Slika 3.1.1. Ručno dodavanje i umješavanje mikrokapsula ekstrakta kadifice u potpunu krmnu smjesu

3.1.1. Prikupljanje podataka i uzoraka

Nakon pripreme potpunih krmnih smjesa, uzorkovan je reprezentativan uzorak za svaki hranidbeni tretman za analizu sadržaja karotenoida. Do provođenja analize uzorci su čuvani na +4 °C, a neposredno prije analize, uzorci smjesa samljeveni su na mlinu Cyclotec (Tecador, Švedska) sa sitom veličine pora 0,3 mm. Također, određen im je sadržaj vlage sušenjem na 103 °C tijekom 4 sata prema normi HRN ISO 6496:2001 (Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo, 2001).

Tijekom pokusnog perioda pratili su se proizvodni rezultati potrebni za određivanje učinkovitosti deponiranja. Pri tome su proizvodnja i masa jaja bilježene svakodnevno, a unos hrane tjedno.

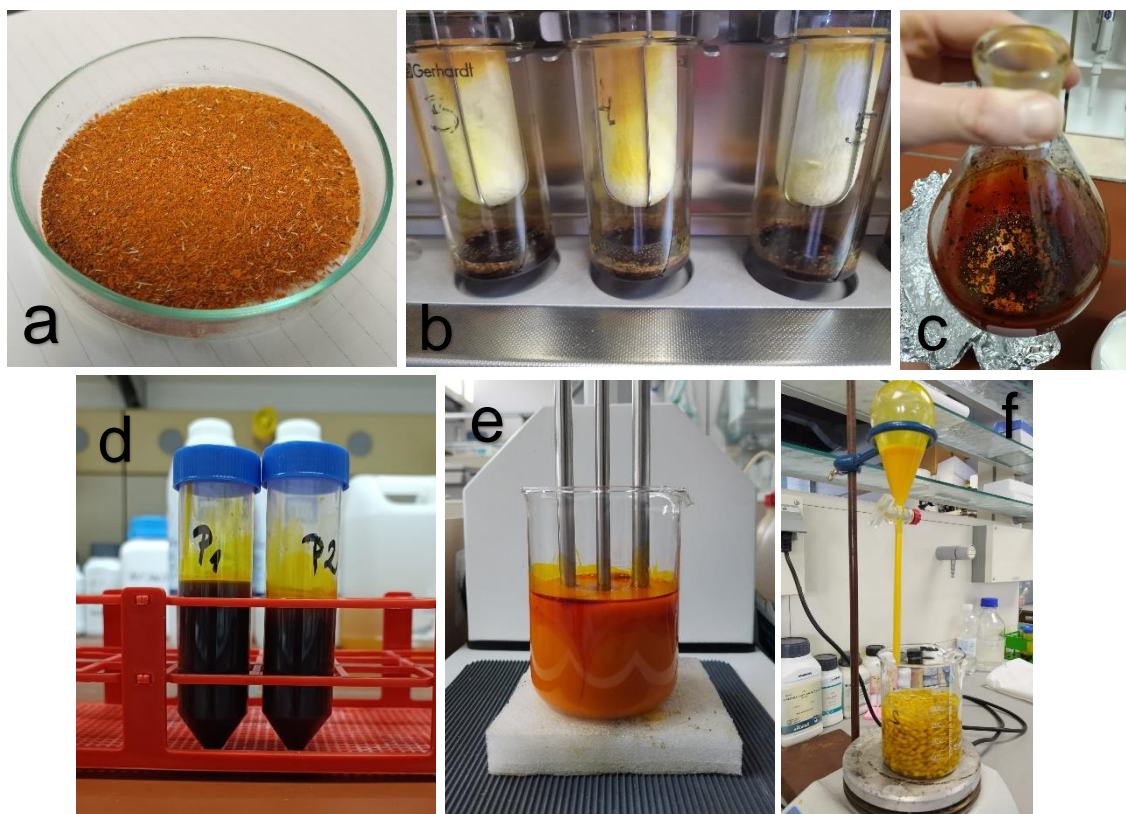
Počevši od početnog dana pokusnog razdoblja, jaja su se sakupljala u kraćim vremenskim intervalima kako bi se pratio rast i stabilizacija sadržaja karotenoida. Pri tome su uzorkovana 0., 2., 3., 5., 7., 9., 10., 12., 14., 15., 16. i 17. dana pokusnog razdoblja. S obzirom na to da je nakon 17. dana utvrđena stabilizacija sadržaja karotenoida, jaja uzorkovana 18., 20., 21. i 22. dana su korištena za analizu karotenoidnog profila HPLC metodom.

3.2. Priprema i inkapsulacija ekstrakta kadifice (*Tagetes erecta* L.)

Prah cvijeta kadifice (*Tagetes erecta* L.) poklonila je tvrtka TRAKO-AGL d.o.o. (V. Bukovec, Hrvatska). Ekstrakcija karotenoida provedena je acetonom u Soxhlet ekstratoru (SoxTherm 416, Gerhardt, Njemačka). Suhi ekstrakt je potom otopljen u suncokretovom ulju tako da je ekstrakt 20 g praha kadifice bio otopljen u 70 mL ulja. Konačan sadržaj ukupnih karotenoida u ulju je određena spektrofotometrijski te je iznosila 1,40 mg/mL.

Inkapsulacija ekstrakta, odnosno priprema mikročestica ispunjenih karotenoidima provodila se postupkom ionskog geliranja pri sobnoj temperaturi, pri čemu je uljni ekstrakt (uljna komponenta, 70 mL) dodan u 150 mL 2% natrijevog alginata (vodena komponenta). Zbog ne miješanja uljne i vodene komponente, proveo se postupak pripreme emulzija s pomoću laboratorijskog homogenizatora (Solverson L5M-A, SAD) pri maksimalnoj brzini od 10 000 rpm tijekom 10 minuta kako bi se izbjeglo zagrijavanje emulzije (Juric i sur. 2021.). Nastala emulzija se s pomoću lijevka za dokapavanje dodavala kap po kap u 200 mL pripravljene 2%-tne otopine CaCl₂, uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici (IKA topolino, SAD) tijekom 30 minuta. Ovim postupkom se provelo ionsko geliranje i nastanak kalcijev alginat mikročestica – mikrokapsula ispunjenih ekstraktom karotenoida (Juric i sur. 2021). Nakon procesa inkapsulacije, mikrokapsule su filtrirane od otopine te isprane destiliranom vodom nakon čega su kroz 24 sata osušene na zraku u zamračenom prostoru. Prah kadifice, proces ekstrakcije i inkapsulacije prikazani su na slici 3.2.1.

Nastalim mikrokapsulama ekstrakta karotenoida kadifice odredio se karotenoidni profil HPLC metodom te su sadržavale 553,2 µg/g luteina, 105,1 µg/g zeaksantina, 3,4 µg/g α-kriptoksantina, 2,8 µg/g β-kriptoksantina i 2,9 µg/g β-karotena. Mokre i suhe mikrokapsule prikazane su na slici 3.2.2.



Slika 3.2.1. Prah kadifice (a), ekstrakcija u Soxhlet ekstraktoru (b), ekstrakt kadifice nakon uparavanja etanola (c), ekstrakt otopljen u suncokretovom ulju (d), homogenizacija ekstrakta otopljenog u ulju i 2%-tnog natrijevog alginata (dobivena emulzija; e), dokapavanje emulzije u otopinu 2%-tne otopine CaCl_2 (f)



Slika 3.2.2. Mokre mikrokapsule (lijevo); suhe mikrokapsule (desno) ekstrakta karotenoida kadifice

3.3. Određivanje sadržaja karotenoida u smjesama hranidbenih tretmana

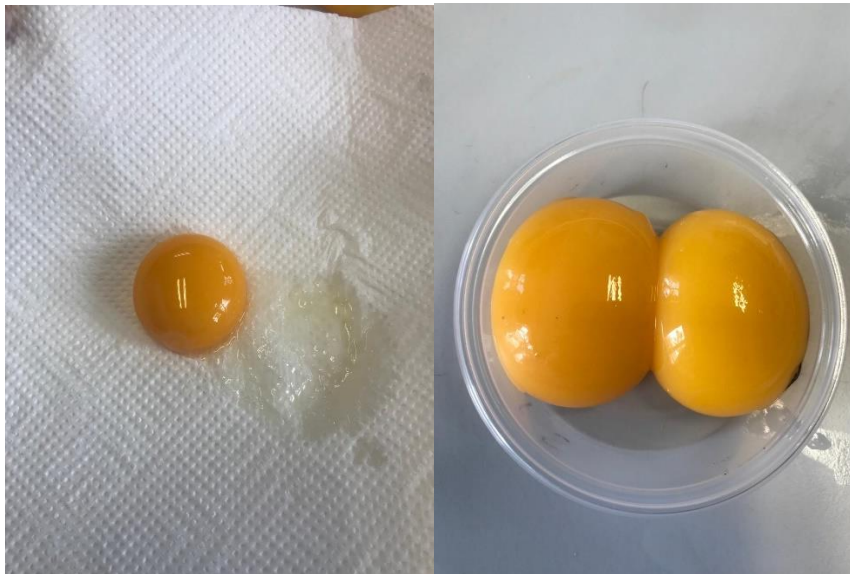
Karotenoidi su ekstrahirani prema postupku opisanom u radu Kurilich i Juvik (1999). Uzorku zrna kukuruza (600 mg u staklenoj epruveti za centrifugiranje) dodano je 6 mL etanola koji sadrži 0,1% antioksidansa BHT (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol; Fluka, Njemačka). Smjesa je homogenizirana (T10, Ika, Njemačka; 30 s pri najjačoj brzini okretaja), a zatim inkubirana 5 min na 85 °C u vodenoj kupelji (Waterbath, 5L, Cole Parmer, SAD). Uzorak je dobro izmiješan vorteksiranjem nakon dodatka 120 μ L 80%-tne otopine kalijeve lužine i vraćen u vodenu kupelj još 10 min s jednim vorteksiranjem nakon 5 min inkubiranja tijekom postupka. Nakon vađenja iz kupelji uzorci su odmah ohlađeni na ledu uz dodatak 3 mL hladne ultračiste vode. Ohlađenoj smjesi dodano je 3 mL heksana, a nakon vorteksiranja 30 s i centrifugiranja 5 min na 4 000 rpm (Centric 322A, Tehnica, Slovenija) odvojen je gornji heksanski sloj. Postupak ekstrakcije s heksanom ponovljen je do obezbojenja ekstrakta (u prosjeku 3 ekstrakcije). Sakupljene i spojene heksanske frakcije isprane su s 3 mL ultračiste vode, vorteksirane i ponovno centrifugirane nakon čega je heksanski ekstrakt uparen na vakuum uparivaču (RVC 2-25CD plus, MartinChrist, Njemačka). Suhi ostatak otopljen u 200 μ L otopine acetonitril:metanol:metilen klorid (45:20:35, v/v/v) koji sadrži 0,1% BHT.

Karotenoidni spojevi odvojeni su i kvantitativno određeni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (eng. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) uz UV/Vis spektrofotometar detektor prema HPLC metodi obrnute faze prema Kurilich i Juvik (1999). HPLC sustav SpectraSystem (Thermo Separation Products, Inc., SAD) sastojao se od kvaterne gradijent pumpe (P4000), sustava za otplinjavanje (SCM 1000), automatskog sustava za injektiranje uzorka (AS3000), grijača kolone te UV/Vis (UV2000) detektora. Podaci su sakupljeni i obrađeni ChromQuest 5.0 softwareom (Thermo Fisher Scientific, SAD). Spojevi su razdvojeni na dvije serijski povezane C18 kolone obrnute faze: Vydac 201TP54 (5 μ m, 4,6 \times 150 mm; Hichrom, UK) i Zorbax RX-C18 (5 μ m, 4,6 \times 150 mm; Agilent Technologies, SAD). Kolone su bile zaštićene s pomoću Supelguard Discovery C18 predkolone (5 μ m, 4 \times 20 mm; Supelco, SAD). Pokretna faza sastojala se od smjese acetinitril:metanol:diklormetan (75:25:5, v/v/v) koji sadrži 0,1% BHT-a i 0,05% trietilamina. Protok mobilne faze bio je namješten na 1,8 mL/min pri sobnoj temperaturi. Volumen injektiranja otopina uzoraka bio je 30 μ L, a karotenoidi su detektirani pri 450 nm.

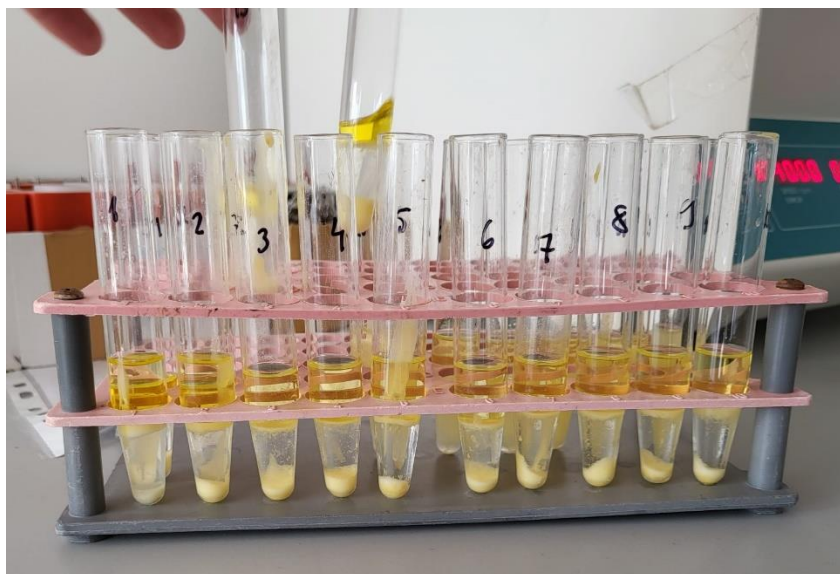
Karotenoidi [lutein (čistoća 99%), zeaksantin (čistoća 99%), kantaksantin (čistoća 95%), α - i β -kriptoksantin (čistoća obje 99%) i β -karoten (čistoća 98%)] su identificirani usporedbom vremena zadržavanja i kvantificirani eksternom standardizacijom s kalibracijskim krivuljama s pomoću komercijalno dostupnih standarda (Extrasynthese, Francuska; $r^2 \geq 0,99$ za sve karotenoide). Ukupni sadržaj karotenoida je izračunat zbrojem sadržaja pojedinačnih karotenoida.

3.4. Određivanje sadržaja karotenoida u žutanjku jajeta

Kako bi se pratile promjene u sadržaju karotenoida tijekom pokusnog razdoblja u uzorcima su spektrofotometrijskom metodom kvantificirani ukupni karotenoidi pri čemu je ekstrakcija provedena prema postupku opisanom u radu Surai i sur. (2001.). Tri jaja svakog kaveza sakupljena svaka tri dana su razbijena a žutanjci su odvojeni, prosušeni valjanjem na papirnatom ručniku i spojeni u plastičnoj čaši (slika 3.4.1.). Nakon miješanja sva tri žutanjka, u epruvetu je izvagano 0,4 – 0,5 g kod svijetlih žutanjaka ili 0,2 – 0,25 g kod žutih žutanjaka. U svaku epruvetu dodano je 2 mL 5% NaCl u etanolu (1:1) te homogenizirano nakon dodavanja 3 mL heksana. Nakon vorteksiranja, uzorci centrifugirani (4 000 rpm, 5 minuta), a gornji heksanski sloj je odvojen u odmjernu tikvicu od 10 mL. Ekstrakcija je ponovljena do obezbojenja heksanskog sloja (uobičajeno 3 ponavljanja; slika 3.4.2.). Nakon sakupljanja svih ekstrakata, tikvica je nadopunjena heksanom do oznake. Apsorbancija pripremljenih ekstrakata izmjerena je na UV-Vis spektrofotometru (Helios γ , Thermo Electron Corporation, UK) pri 450 nm. Rezultat je izračunat kao ekvivalent β -karotena ($\mu\text{g/g}$) u uzorku korištenjem apsorpcijskog koeficijenta β -karotena (2550; Britton i sur., 2004.).



Slika 3.4.1. Prosušeni žutanjci na papirnatom ručniku (lijevo); žutanjci spojeni u plastičnoj čaši tijekom pripreme uzorka žutanjka jednog kaveza (desno)



Slika 3.4.2. Ekstrakcija karotenoida žutanjka jaja heksanom do obezbojenja

Nakon stabilizacije sadržaja karotenoida, sakupljeni su žutanjci kako bi se u njima odredio karotenoidni profil HPLC metodom. Pri tome je ekstrakcija provedena na isti način kao u postupku opisanom za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja karotenoida, s razlikom u posljednjem koraku ekstrakcije. Sakupljeni heksanski ekstrakti su upareni na vakuum uparivaču (RVC2-25CDplus, MartinChrist, Njemačka). Suhi ostatak otopljen u 300 μ L otopine acetonitril:metanol:metilen klorid (45:20:35, v/v/v) koji sadrži 0,1% BHT. Za identifikaciju i kvantitativno određivanje sadržaja karotenoida u žutanjcima korištena je ista metoda kao i za potpune krmne smjese za nesilice opisana u poglavlju 3.3.

3.5. Određivanje boje žutanjka

Boja žutanjka utvrđena je uređajem Minolta CR-410 (Konica Minolta, Osaka, Japan) na 10 uzoraka žutanjka (slika 3.5.1.) po skupini i iskazana s pomoću tri pokazatelja: CIE L^* , CIE a^* i CIE b^* (Commission Internationale de l'Eclairage, 1978.). Vrijednosti L^* , a^* i b^* odražavaju svjetlinu (0 = crno, 100 = bijelo), crvenost ($-a^*$ = zeleno, a^* = crveno) i žutost ($-b^*$ = plavo, b^* = žuto). Instrument je svakodnevno kalibriran prema bijeloj standardnoj ploči sa svojstvima $y = 94,5$, $x = 0,3158$ i $y = 0,3323$.



Slika 3.5.1. Određivanje boje žutanjka prema CIE L*a*b* kromametrom Minolta CR-410

3.6. Deponiranje karotenoida iz obroka u žutanjak jajeta

Učinkovitost deponiranja pojedinačnih karotenoida uzoraka žutanjaka izračunata je prema formuli (Karadas i sur. 2006.):

učinkovitost deponiranja

$$= \frac{\text{Proizvodnja karotenoida u jajima (A)}}{\text{Konzumacija karotenoida u hrani (B)}} \times 100$$

pri čemu je A = masa žutanjka (g) × sadržaj karotenoida u žutanjku (μg/g) × koeficijent nesivosti, B = konzumacija hrane (g/dan/nesilica) × sadržaj karotenoida u hrani (μg/g).

3.7. Statistička obrada podataka

Provedeno istraživanje na 15 kaveza (3 tretmana × 5 kaveza) postavljeno je u alatu Research Randomizer kako bi se hranidbeni pokus proveo prema potpuno nasumičnom dizajnu. Podaci prikupljeni tijekom eksperimentalnog razdoblja su obrađeni korištenjem MS Office programa. Rezultati sadržaja karotenoida i njihove učinkovitosti deponiranja te boje žutanjka su obrađeni kao ponovljena mjerenja korištenjem MIXED procedure softverskog paketa SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, SAD) s tretmanom kao fiksnim utjecajem. Razlike su smatrane značajnima ako je $P \leq 0,05$.

4. Rezultati i rasprava

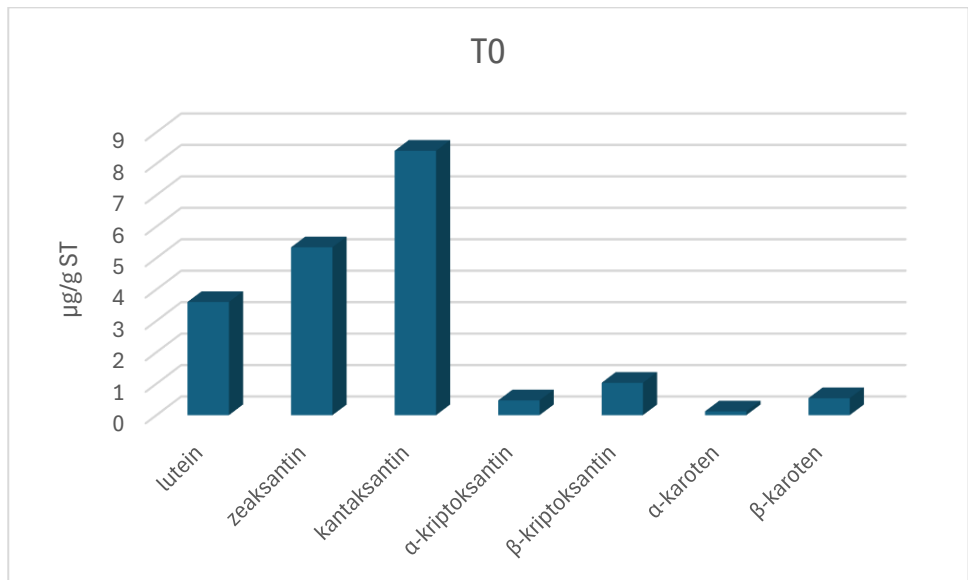
4.1. Karotenoidni profil smjesa hranidbenih tretmana

U mljevenim uzorcima potpune krmne smjese za kokoši nesilice određeni su karotenoidi: lutein, zeaksantin, kantaksantin u kontrolnoj skupini, α -kriptoksantin, β -kriptoksantin, α -karoten, β -karoten, dok je njihov sadržaj kvantitativno određen HPLC metodom. U pokusu su korištena tri hranidbena tretmana koji su se razlikovali jedino u postotku dodanih mikrokapsula ekstrakta kadifice. Tretman T0 osim prirodno prisutnih karotenoida kukuruza smjese sadržavao je sintetski pigment kantaksantin, dok su u tretmane T1 i T2 dodani različiti udjeli mikrokapsula ekstrakta kadifice, odnosno 0,5 i 1%.

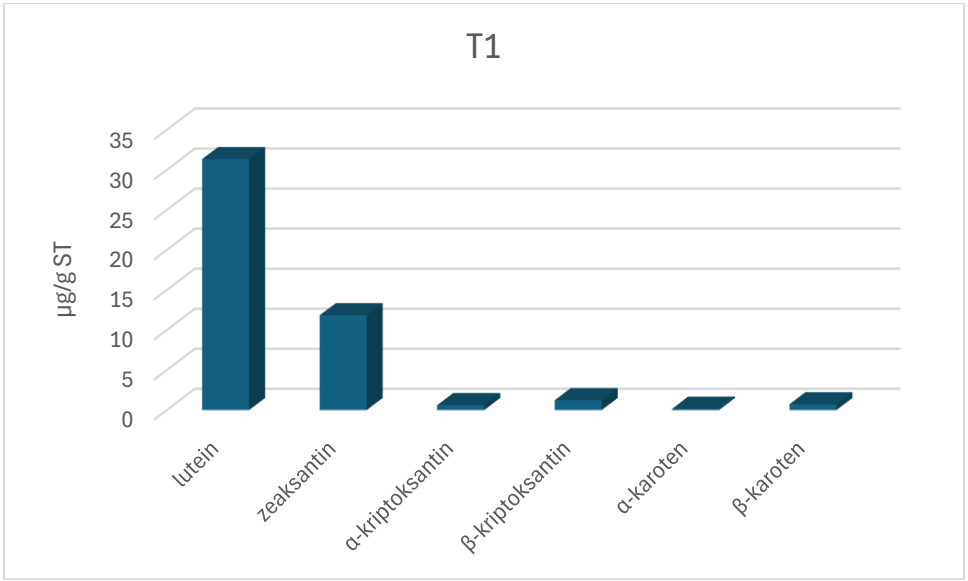
Kontrolna skupina sadržavala je komercijalni pigment kantaksantin, a sadržaj ukupnih karotenoida u kontrolnoj smjesi iznosio je 19,52 $\mu\text{g/g}$ ST. Dodatkom mikrokapsula ekstrakta kadifice u udjelu od 0,5% (hranidbeni tretman T1) sadržaj ukupnih karotenoida se udvostručio (45,89 $\mu\text{g/g}$ ST), dok se dodatkom u udjelu od 1% (hranidbeni tretman T2) sadržaj povećao za četiri puta (78,10 $\mu\text{g/g}$ ST). Jedino je u kontrolnoj skupini (hranidbeni tretman T0) određen kantaksantin (8,41 $\mu\text{g/g}$ ST), dok je u krmnim smjesama tretmana T1 i T2 bilo najviše luteina (31,33 i 58,79 $\mu\text{g/g}$ ST), a najmanje α -karotena (0,16 i 0,13 $\mu\text{g/g}$ ST).

Sadržaj karotenoida u smjesama hranidbenih tretmana prikazan je u grafikonima 4.1.1, 4.1.2. i 4.1.3. Prema podacima iz grafikona 4.1.3., najviše luteina i zeaksantina (58,79 $\mu\text{g/g}$ ST i 16,33 $\mu\text{g/g}$ ST) prisutno je u smjesi tretmana T2 u koji je dodan 1% ekstrakta kadifice, dok je najmanje prisutno u smjesi kontrolne skupine (3,60 $\mu\text{g/g}$ ST i 5,34 $\mu\text{g/g}$ ST). Kantaksantin je jedino bio prisutan u smjesi kontrolne skupine T0. Najmanje α -kriptoksantina određeno je u smjesama tretmana T0 (2,41% ukupnih karotenoida), dok je sadržaj β -kriptoksantina u tretmanima T1 i T2 bio jednak (1,23 $\mu\text{g/g}$ ST) i viši od sadržaja u smjesi kontrolne skupine (1,03 $\mu\text{g/g}$ ST). Vrijednost sadržaja α -karotena slične je vrijednosti u svim tretmanima, dok je najviše β -karotena prisutno u smjesi tretmana T2 (0,82 $\mu\text{g/g}$ ST).

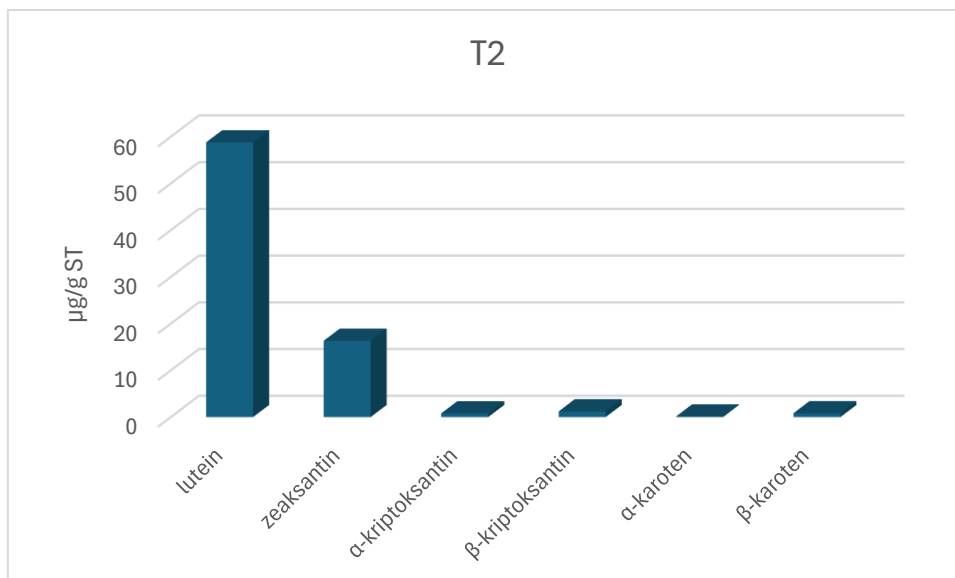
Karadas i sur. (2006.) proveli su istraživanje u kojem su potpunu smjesu za prepelice obogatili s 2% koncentrata lucerne, rajčice, kombinacijom kadifice i ekstrakta rajčice i 0,2% ekstrakta kadifice. Potpuna krmna smjesa temeljila se na pšenici i ječmu. Najveći sadržaj luteina i zeaksantina zabilježen je kod smjesa tretmana s dodatkom 2% kadifice i ekstrakta rajčice (11,91 i 1,56 $\mu\text{g/g}$), dok je najveći sadržaj luteina i zeaksantina u ovom istraživanju određen u smjesi tretmana T2 sa samo 1% mikrokapsula ekstrakta kadifice (58,79 $\mu\text{g/g}$ ST i 16,33 $\mu\text{g/g}$ ST). U navedenom istraživanju, ukupan sadržaj karotenoida bio je najviši u smjesi tretmana s dodatkom koncentrata lucerne (18,21 $\mu\text{g/g}$), što je 2,5 puta manje od ukupnih karotenoida određenih u tretmanu T1 u ovom istraživanju.



Grafikon 4.1.1. Prosječan sadržaj karotenoida u potpunoj krmnoj smjesi s dodatkom 8 mg/kg kantaksantina (T0; kontrolna skupina)



Grafikon 4.1.2. Prosječan sadržaj karotenoida u potpunim krmnim smjesama T1 tretana (s dodatkom 0,5% pripremljenih mikrokapsula ekstrakta kadifice)



Grafikon 4.1.3. Prosječan sadržaj karotenoida u potpunim krmnim smjesama T2 tretmana (s dodatkom 1% pripremljenih mikrokapsula ekstrakta kadifice)

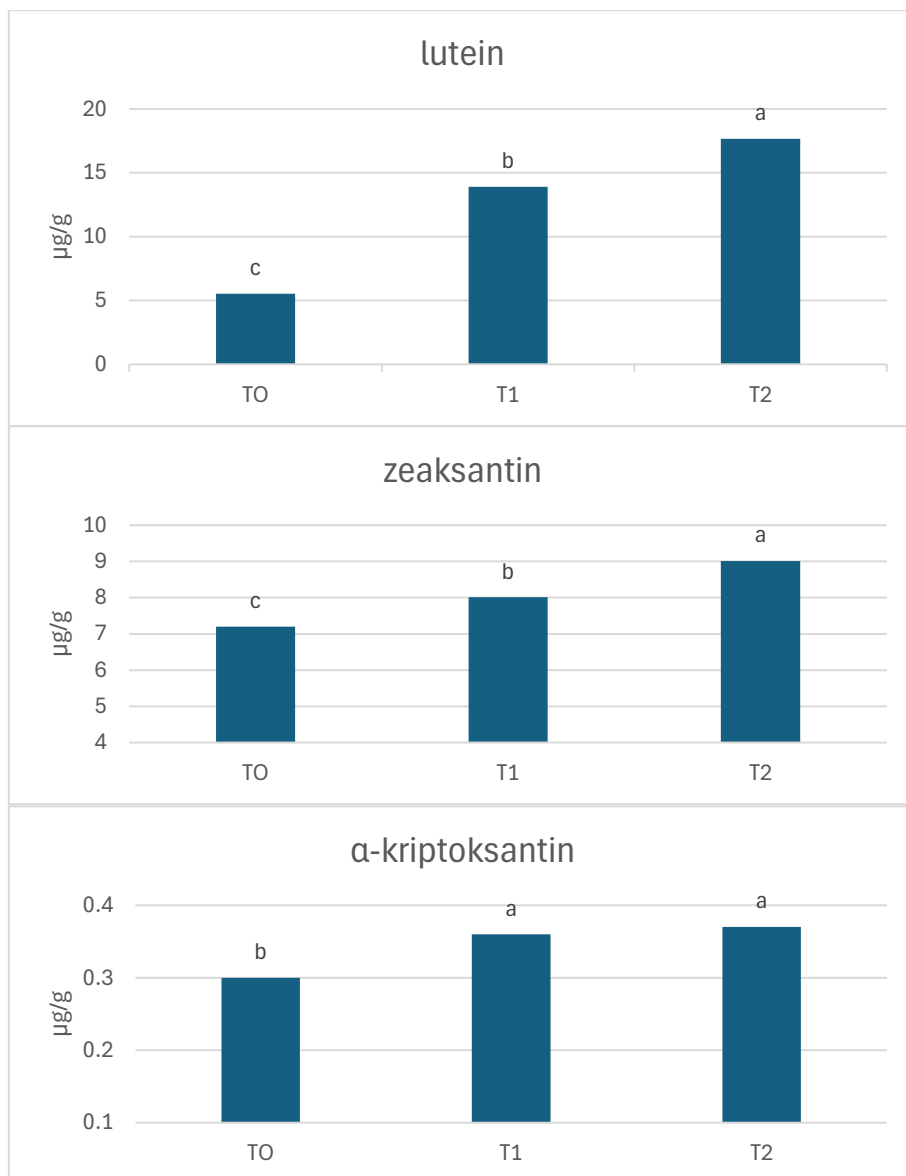
4.2. Sadržaj karotenoida u žutanjku jajeta

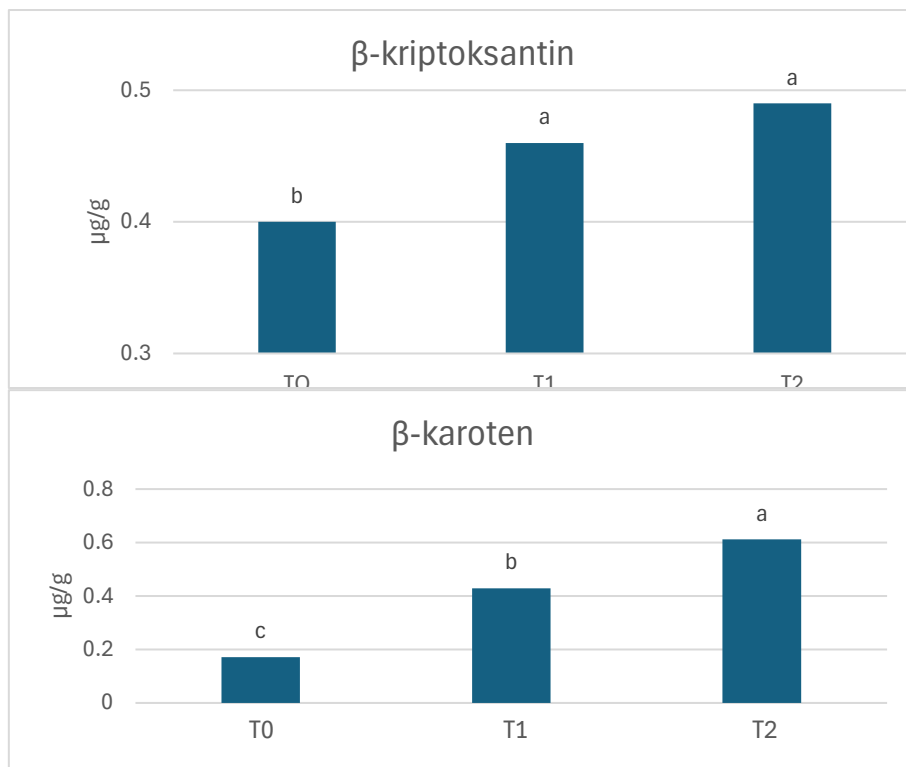
4.2.1. Sadržaj pojedinačnih karotenoida u žutanjcima jaja

Sadržaj pojedinačnih karotenoida određen je HPLC metodom, a rezultati su prikazani u grafikonu 4.2.1.1. Dodatak mikrokapsula ekstrakta kadifice kod kokoši nesilica utjecao je na sadržaj karotenoida u žutanjku jajeta ($P < 0,05$). Rezultati pokazuju povećanje sadržaja svih karotenoida kod tretmana T1 i T2 te su rezultati oba tretmana viša od rezultata kontrolne skupine. Navedeno potvrđuje i činjenica kako je sadržaj dva glavna karotenoida kadifice, luteina i zeaxantina, iz tretmana T1 i T2 veća od kontrolne skupine 2,5 do 3 puta.

Lutein i zeaxantin karotenoidi su s najvišim sadržajem općenito i u žutanjcima unutar istog tretmana. Sadržaj luteina u žutanjku nesilica hranjenih tretmanom T1 (13,90 µg/g) je preko 38 puta viši od sadržaja α-kriptoksantina (0,36 µg/g) i β-kriptoksantina (0,46 µg/g) u žutanjcima istog tretmana, dok je sadržaj zeaxantina (8,01 µg/g) žutanjaka istog tretmana do 22 puta viši od sadržaja α-kriptoksantina i β-kriptoksantina. Isti trend se nastavio u tretmanu T2 gdje je sadržaj luteina (17,66 µg/g) preko 47 puta viši od sadržaja α-kriptoksantina (0,37 µg/g) i β-kriptoksantina (0,49 µg/g), dok je sadržaj zeaxantina (9,01 µg/g) preko 24 puta viši od sadržaja α- i β-kriptoksantina u žutanjcima istog tretmana. Uočeno je povećanje sadržaja α-kriptoksantina i β-kriptoksantina u tretmanima T1 i T2 u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Ove rezultate vrijedi usporediti s već spomenutim istraživanjem Karadas i sur. (2006.). Najviši sadržaj luteina određen je u žutanjcima tretmana s dodatkom 0,2 % kadifice (31,14 $\mu\text{g/g}$) kao i sadržaj zeaksantina (2,99 $\mu\text{g/g}$). U usporedbi s tretmanom T1 (0,5% mikrokapsula kadifice) ovog istraživanja, sadržaj luteina je manji 2,24 puta, dok je sadržaj zeaksantina 2,68 puta veći. Najviši sadržaj β -karotena određen je u tretmanu s dodatkom 2% koncentrata lucerne (0,48 $\mu\text{g/g}$) što je slično sadržaju β -karotena u žutanjcima tretmana T1 ovog istraživanja koji iznosi 0,43 $\mu\text{g/g}$. U drugom istraživanju (Skřivan i sur. 2016.), autori su zaključili kako dodatak komercijalnog ekstrakta kadifice (Avizant® Yellow 20 HS) značajno povisuje sadržaj luteina i zeaksantina ovisno o udjelu dodatka pa je tako primijećen porast luteina i zeaksantina od 12,34 $\mu\text{g/g}$ i 5,92 $\mu\text{g/g}$ iz žutanjaka kontrolne skupine na 36,33 i 25,59 $\mu\text{g/g}$ u žutanjcima tretmana s dodatkom ekstrakta kadifice od 950 mg/kg smjese.





Grafikon 4.2.1.1. Prosječan sadržaj pojedinačnih karotenoida u žutanjcima jaja hranidbenih tretmana

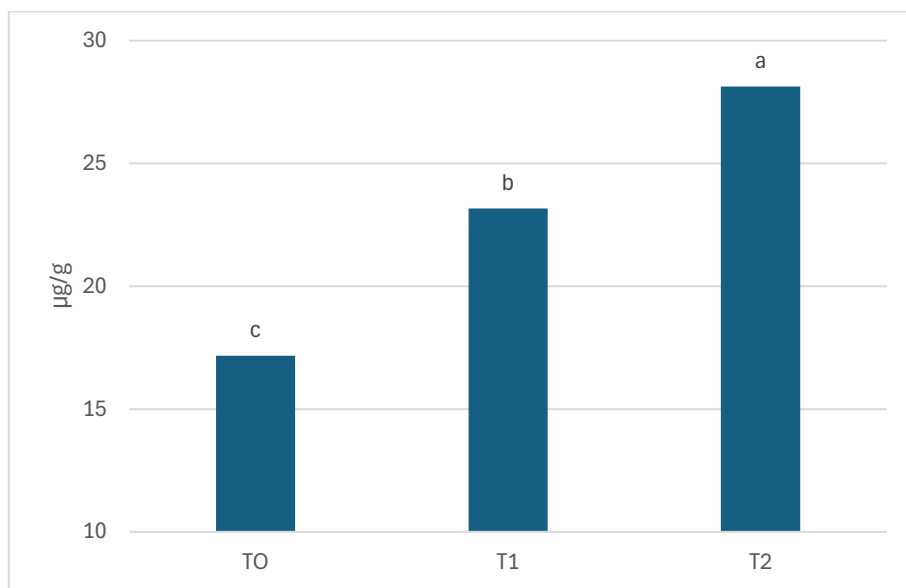
^{a-c}tretmani označeni različitim slovima iznad stupaca značajno se razlikuju ($P < 0,05$)

4.2.2. Sadržaj ukupnih karotenoida u žutanjku jajeta

Sadržaj ukupnih karotenoida u žutanjcima jaja kontrolne i pokusnih skupina određen je zbrajanjem sadržaja pojedinačnih karotenoida, a rezultati su prikazani u grafikonu 4.2.2.1. Dodatak mikrokapsula ekstrakta kadifice u smjese kokoši nesilica utjecao je na sadržaj ukupnih karotenoida u žutanjku jajeta. Žutanjci kokoši nesilica hranjenih smjesama T0 tretmana sadržavali su najmanje ukupnih karotenoida (17,17 μg/g) u usporedbi s smjesama tretmana T1 i T2 što je u skladu s rezultatima ukupnih karotenoida u smjesi ovih tretmana. Odnosno, sadržaj ukupnih karotenoida u žutanjcima jaja svih tretmana prati sadržaj ukupnih karotenoida iz smjesa istih tretmana (Karadas i sur. 2006.; Kljak i sur. 2021.). Prema tome, najviše ukupnih karotenoida u žutanjku jajeta određeno je kod kokoši nesilica hranjenih tretmanom T2 (28,13 μg/g).

U radu Kljak i sur. (2021.) istražio se utjecaj prirodnih dodataka, bosiljka, nevena, maslačka i kadifice u koncentraciji od 1 i 3% na boju žutanjka, sadržaj karotenoida, oksidacijsku stabilnost i senzorna svojstva jaja. Sadržaj ukupnih karotenoida u žutanjcima tretmana M1 i M3 (s dodatkom 1 i 3% kadifice) iznosio je 33,96 i 66,95 μg/g te je to ujedno bio i najviši sadržaj u navedem istraživanju, a može se usporediti s

rezultatima tretmana T2 ovog istraživanja u koji je dodan isti sadržaj izvora karotenoida (odnosno 1%). Sadržaj ukupnih karotenoida žutanjaka tretmana T2 bili su niži 1,2 puta u odnosu na rezultat tretmana M1 u istraživanju Kljak i sur. (2021.). S druge strane, najniži sadržaj karotenoida u navedenom istraživanju određen je u žutanjcima nesilica hranjenih smjesama tretmana B1 i B3 s dodatkom bosiljka (1 i 3% bosiljka) odnosno 13,75 i 20,81 $\mu\text{g/g}$. Smjese tretmana s dodatkom nevena C1 i C3 (1 i 3% nevena) i maslačka D1 i D3 (1 i 3% maslačka) imale su slične vrijednosti sadržaja ukupnih karotenoida u žutanjcima, odnosno 15,27 i 22,76 $\mu\text{g/g}$ te 15,36 i 22,80 $\mu\text{g/g}$, te su rezultati većeg dodataka ovih izvora karotenoida bili usporedivi sa sadržajem ukupnih karotenoida žutanjaka tretmana T1 u ovom istraživanju čija vrijednost iznosi 23,16 $\mu\text{g/g}$.



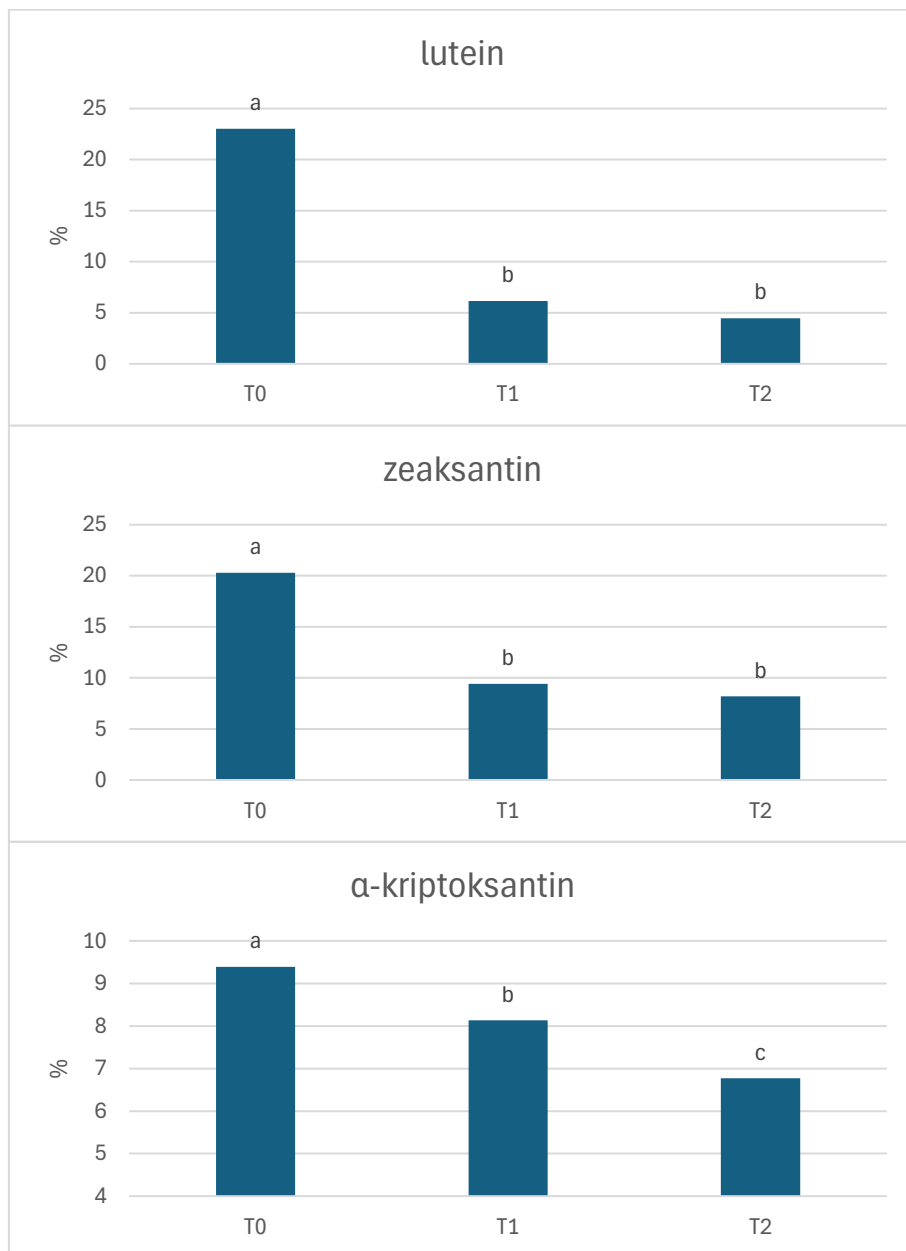
Grafikon 4.2.2.1. Prosječni sadržaj ukupnih karotenoida u žutanjcima jaja hranidbenih tretmana

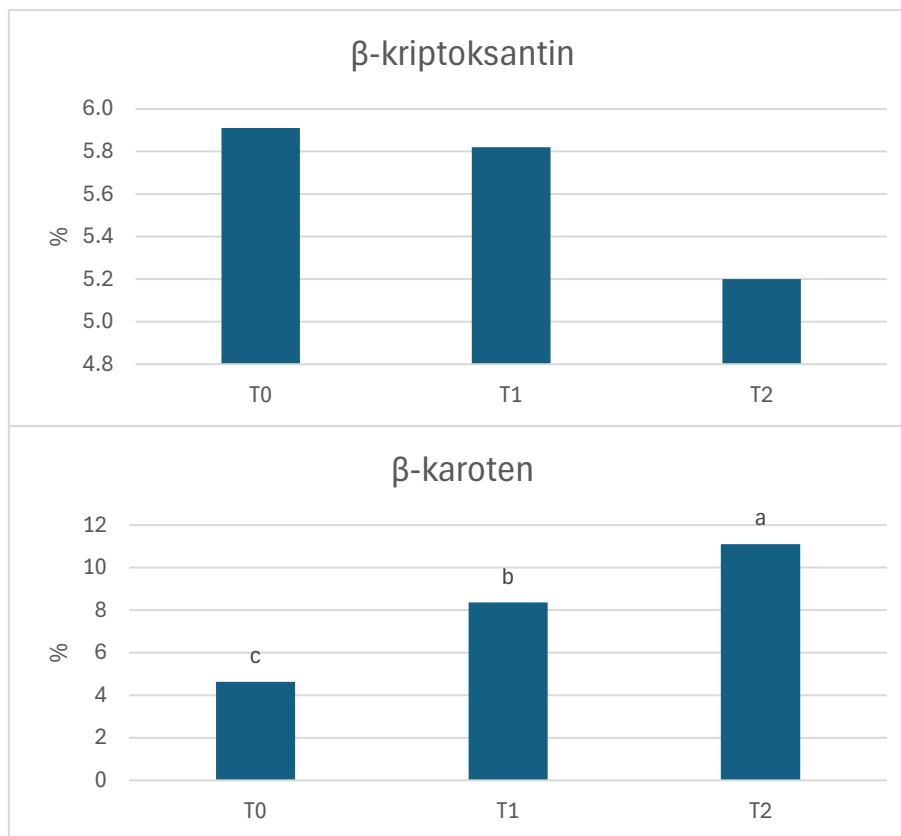
^{a-c} tretmani označeni različitim slovima iznad stupaca značajno se razlikuju ($P < 0,05$)

4.3. Učinkovitost deponiranja karotenoida iz dnevnog obroka u žutanjak jajeta

Učinkovitost deponiranja izračunata je za pojedinačne i ukupne karotenoide uzoraka žutanjaka tretmana T0, T1 i T2, a rezultati su prikazani u grafikonu 4.3.1. Primijećeno je kako se sadržaj karotenoida u žutanjku odnosno njihovo deponiranje u žutanjak smanjuje povećanjem sadržaja karotenoida u potpunim krmnim smjesama za nesilice hranidbenih tretmana. Navedeno je u skladu s dosadašnjom literaturom, kao što se može vidjeti na primjeru luteina i zeaksantina u radu Skřivanová i sur. (2017.).

Prilikom dodatka kadifice (Avizant® Yellow 20 HS) sadržaj luteina u žutanjku se povećao s 0,141 na 0,232 mg/60 g jaja, no učinkovitost deponiranja luteina u žutanjak se smanjila s 55,8 % (kontrolna skupina) na 41,4, 36,5 i 33% u žutanjcima tretmana s dodatkom karotenoida sljedećih sadržaja od 150, 250, 350 mg/kg smjese.





Grafikon 4.3.1. Učinkovitost deponiranja pojedinih karotenoida u žutanjke jaja hranidbenih tretmana pri čemu ^{a-c} vrijednost iznad stupaca označava značajnu razliku ($P < 0,05$)

Najviša učinkovitost deponiranja ukupnih karotenoida u žutanjak jaja određena je u kontrolnoj skupini sa sintetskim pigmentom kantaksantinom pri čemu je rezultat iznosio 13,23%. Nadalje, u žutanjcima jaja nesilica kontrolne skupine učinkovitost deponiranja je bila 23,02% za lutein i 20,29% za zeaksantin. Uspoređujući sva tri tretmana, kontrolna skupina ostvarila je najvišu učinkovitost deponiranja svih karotenoida osim β-karotena, čija je najviša vrijednost u žutanjcima nesilica hranjenih smjesom tretmana T2 te je iznosila 11,11%.

Kao što je već spomenuto, primijećen je pad učinkovitosti deponiranja sukladno povećanju sadržaja karotenoida hrane. Učinkovitost deponiranja luteina, za kojeg se smatra da ima visoku učinkovitost deponiranja ovisno o sadržaju karotenoida i sastavu obroka (Karadas i sur. 2006.), u tretmanu T1 s 0,5% mikrokapsula ekstrakta kadifice iznosila je 6,17%, dok se učinkovitost deponiranja luteina iz žutanjaka nesilica hranjenih smjesama T2 tretmana s 1% mikrokapsula smanjila na 4,47%. Isti slučaj vrijedi i za zeaksantin za koji je učinkovitost deponiranja u tretmanu T1 iznosila 9,41%, a u tretmanu T2 8,18%.

Vrijednosti učinkovitosti deponiranja u žutanjcima tretmana T0 najviše su za ukupne karotenoide (13,23%) u odnosu na tretman T1 (7,02%) i T2 (5,35%). Također, isto vrijedi za sve pojedinačne karotenoide osim za β-karoten čija je najviša vrijednost

zabilježena u žutanjcima tretmana T2 (11,11%). Kada se usporedi učinkovitost deponiranja unutar tretmana T1, vrijednosti učinkovitosti deponiranja zeaksantina (9,41%) više su od vrijednosti utvrđene za α -kriptoksantin (8,13%), β -kriptoksantin (5,82%), β -karoten (8,37%) te lutein (6,17%). Učinkovitosti deponiranja luteina među najnižima su i usporedbi s drugim istraživanjima, kao što je već spomenuto istraživanje Karadas i sur. 2006. u kojem je učinkovitost deponiranja luteina iz tretmana s dodatkom 2% kadifice iznosilo 36% što je šest puta više u odnosu na rezultat tretmana T1 ovog istraživanja.

Usporedbom učinkovitosti deponiranja unutar tretmana T2, učinkovitost deponiranja luteina iznosila je 4,47% što je najmanja vrijednost u usporedbi s ostalim karotenoidima. Vrijednost učinkovitosti deponiranja β -karotena (11,11%) veća je od luteina (4,47%), zeaksantina (8,18%), α -kriptoksantina (6,77%) te β -kriptoksantina (5,20%). Razlog najveće vrijednosti deponiranja β -karotena u usporedbi s drugim karotenoidima je najvjerojatnije njegov niski sadržaj u smjesi, budući da se povećanjem sadržaja karotenoida smjese smanjuje učinkovitost deponiranja u žutanjku (Kljak i sur. 2021.). S druge strane, Karadas i sur. (2006.) zabilježili su iznimno nisku učinkovitost deponiranja β -karotena čija je vrijednost u kontroli te tretmanu s dodatkom 2% koncentrata lucerne, rajčice, kadifice i 0,2 % koncentrata kombinacije ekstrakta kadifice i rajčice redom iznosila 3,8%, 0,8%, 0,4%, 1,8% i 1,9%.

Uzrok niskoj učinkovitosti deponiranja nije poznat, no poznato je kako se sadržaj karotenoida u žutanjku odnosno njihovo deponiranje u žutanjak smanjuje povećanjem sadržaja karotenoida u obroku nesilica. Zurak i sur. (2021.) su uspoređivali sadržaj i biodostupnost karotenoida komercijalnih hibrida kukuruza te su utvrdili kako se biodostupnost karotenoida smanjila s povećanjem njihovog sadržaja u zrnu. Autori pretpostavljaju da je razlog tome kompeticija za ugradnju u micelle tijekom simulirane probave koja oponaša probavu kokoši nesilica pri visokom sadržaju karotenoida u matriksu kukuruza. Padajuća proporcionalnost u spomenutom radu bila je najizraženija za β -karoten, gdje je biodostupnost skupine hibrida s $<15 \mu\text{g/g ST}$ ukupnih karotenoida iznosila 55,9%, a kod skupine s $>30 \mu\text{g/g DM}$ biodostupnost je iznosila 7,2%. Navedeni odnos primjenjiv je i na trenutno istraživanje gdje je učinkovitost deponiranja β -karotena bila najveća (11,11%), a njegov sadržaj u tretmanima T0, T1 i T2 najniži odnosno 0,54, 0,72 i 0,82 $\mu\text{g/g ST}$. Osim toga, nije poznato jesu li mikrokapsule svojom kemijskom i fizikalnom strukturom utjecale na nisku učinkovitost deponiranja u tretmanima T1 i T2. Moguće je da je nastala struktura pripremljenih mikrokapsula ekstrakta kadifice nepovoljno utjecala na otpuštanje karotenoida u probavnom traktu nesilica nakon konzumacije zbog čega je iskorištenje karotenoida tj. njihova učinkovitost deponiranja bila niska. Jedan od mogućih razloga niskog deponiranja u žutanjak je konverzija provitaminskih karotenoida (β -karoten i α -karoten) u vitamin A te skladištenje u jetri ili masnom tkivu, no budući da je njihov sadržaj u smjesi nizak ova je pretpostavka manje vjerojatna.

4.4. Boja žutanjka jajeta

Vrijednosti CIE L*a*b su prikazane u tablici 4.4.1. L* vrijednost (svjetlina) žutanjka najniža je u kontrolnoj skupini te je iznosila 68,91. Primijećeno je povišenje ove vrijednosti u oba tretmana s dodatkom kapsula ekstrakta kadifice, pa je tako u tretmanu T1 iznosila 74,15, a u tretmanu T2 73,79. a* vrijednost (crvenost) žutanjaka kontrolne skupine iznosila je 19,52, a u usporedbi sa žutanjcima tretmana T1 i T2, zamijećen je pad vrijednosti (6,78 i 7,57). Okom vidljiva razlika između boje žutanjaka kontrolne skupine i žutanjaka tretmana T1 i T2 tretmana je u crvenosti (slika 4.4.1.). Žutanjci kontrolne skupine vidno su crveniji od žutanjaka T1 i T2 tretmana čiji su žutanjci žući, u skladu s dobivenim vrijednostima a* i b*.

Tablica 4.4.1. Boja žutanjka istraživanih hranidbenih tretmana prema CIE L*a*b*

TRETMAN		L*	a*	b*
T0	kontrola	68,91	19,52	67,42
T1	0,50%	74,15	6,78	74,28
T2	1%	73,79	7,57	75,71
SEM		0,413	0,396	0,543
P		<0,001	<0,001	<0,001



Slika 4.4.1. Boja žutanjaka tretmana T0 s dodatkom kantaksantina (lijevo), T1 s dodatkom mikrokapsula ekstrakta kadifice 0,5% (sredina) i T2 s dodatkom mikrokapsula ekstrakta kadifice 1% (desno)

U sličnom istraživanju (Mim i sur. 2021.) istraživana je utjecaj dodatka kadifice u sadržaju od 0,5, 1, 2 i 4% te dodatka lišća kadifice u sadržaju od 1% na boju žutanjka jajeta nesilica. $L^*a^*b^*$ vrijednosti kontrolne skupine na bazi pšenice i sojine sačme redom su iznosile 51,67, -4,84 i 16,91, tretmana s dodatkom 0,5% kadifice iznosile su redom 45,37, -0,96 i 21,59, pri čemu negativna a^* vrijednost ukazuje na prisutnost zelenih tonova boje. Vrijednosti tretmana s dodatkom 1% kadifice iznosile su redom 48,01, 1,10 i 24,35. Optimalna boja žutanjka postignuta je tretmanom s dodatkom 4% čije su vrijednosti redom iznosile 45,11, 0,38 i 22,64. Navedene vrijednosti spomenutog istraživanja niže su od rezultata istraživanja prikazanih u tablici 4.4.1. Usporedbom dvaju istraživanja vidljivo je kako su primjenom istog izvora karotenoida u istim količinama postignuti različiti rezultati, odnosno žutanjci ovog istraživanja su svjetlije te intenzivnije žute i crvene boje.

Xue i sur. (2013.) također su istražili utjecaj prirodnih dodataka na promjenu boje žutanjka. Potpuna krmna smjesa na bazi kukuruza (65%) i pšenice (10,9%) obogaćena je inkapsuliranim ekstraktom kore rajčice u sadržaju od 5%. $L^*a^*b^*$ vrijednosti kontrolne skupine iznosile su redom 57,42, 2,64 i 39,86, dok su vrijednosti tretmana s dodatkom mikrokapsula ekstrakta rajčice iznosile redom 56,34, 9,80 i 42,13. Budući da rajčica sadrži značajan sadržaj likopena (crvenog pigmenta) primijećeno je povećanje a^* vrijednosti odnosno crvenosti. U provedenom istraživanju likopen nije određen iako je a^* vrijednost tretmana T2 relativno blizu vrijednosti tretmana s ekstraktom rajčice u istraživanju Xue i sur. (2013). Žutanjci tretmana T1 i T2 svjetliji su i žući u usporedbi sa žutanjcima tretmana s dodatkom rajčice navedenog istraživanja.

5. Zaključak

Na temelju rezultata istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

- Dodatak inkapsuliranog ekstrakta kadifice u potpune krmne smjese u udjelima od 0,5 i 1% utjecao je na karotenoidni profil žutanjaka kokoši nesilica. Žutanjci jaja kokoši nesilica hranjenih tretmanom s dodatkom 1% inkapsuliranog ekstrakta kadifice sadržavali su najviše ukupnih karotenoida (28,13 $\mu\text{g/g}$) te najviše pojedinačnih karotenoida. Lutein i zeaksantin su imali više vrijednosti učinkovitosti deponiranja (6,17 i 9,41%) od β -kriptoksantina (5,82%) i β -karotena (8,37%) u žutanjcima s dodatkom 0,5% mikrokapsula T1, što nije bio slučaj u žutanjcima s dodatkom 1% mikrokapsula gdje je β -karoten (11,11%) imao najvišu učinkovitost deponiranja u usporedbi sa spomenutim karotenoidima.
- Dodatak inkapsuliranog ekstrakta kadifice u udjelima od 0,5 i 1% utjecao je na boju žutanjaka kokoši nesilica. L^* (svjetlina) i b^* vrijednosti (žutost) su se povisile, dok se a^* vrijednost (crvenost) snizila u odnosu na kontrolnu skupinu s dodatkom kantaksantina. Prema tome, žutanjci nesilica hranjenih smjesama s dodatkom mikrokapsula ekstrakta kadifice su žutije boje u odnosu na narančastije žutanjke kontrolne skupine.

6. Popis literature

1. Boon C.S., McClements D.J., Weiss J., Decker E.A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 50: 515-532.
2. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (Eds.) (2004). *Carotenoids: handbook*. Springer Basel AG, Basel.
3. Burlec A.F., Pecio Ł., Kozachok S., Mircea C., Corciovă A., Veres,tiuc L., Cioancă O., Oleszek W., Hăncianu M. (2021). Phytochemical profile, antioxidant activity, and cytotoxicity assessment of *Tagetes erecta* L. flowers. *Molecules*. 26: 1201.
4. Commission Internationale de l'Eclairage.(1978). Recommendations on Uniform Colour Spaces-colour Difference Equations, Psychometric Colour Terms. Supplement No. 2 to CIE Publication.15 (E-1.3.1) 1971/(TC-1.3).
5. Dansou D. M., Zhang H., Yu Y., Wang H., Tang C., Zhao O., Qin Y., Zhang J (2023). Carotenoid enrichment in eggs: From biochemistry perspective. *Animal Nutrition*. 14: 315-333.
6. Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo (DZNM; 2001): *Stočna hrana – Određivanje vode i udjela drugih hlapljivih tvari*, Zagreb, Hrvatska
7. EFSA (2014). Scientific opinion on the safety and efficacy of canthaxanthin as a feed additive for poultry and for ornamental birds and ornamental fish. *EFSA Journal*. 12: 3527.
8. EFSA (2016). Safety and efficacy of ethyl ester of β -apo-8'- carotenoic acid as a feed additive for poultry for fattening and poultry for laying. *EFSA Journal*. 14: 4439.
9. FAOSTAT (2022). Food and agriculture data. <https://www.fao.org/faostat/en/#home> (pristupljeno 21. kolovoza 2024.)
10. Fernandes A. S., do Nascimento, Jacob-Lopes E., De Rosso V.V., Queiroz Zepka L. (2018). Introductory chapter: Carotenoids: a brief overview on its structure, biosynthesis, synthesis, and applications. InTech. [online] doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79542> (pristupljeno 21. kolovoza 2024.)
11. Gençdağ E., Özdemir E. E., Demirci K., Görgüç A., Yılmaz F. M. (2022). Copigmentation and stabilization of anthocyanins using organic molecules and encapsulation techniques. *Current Plant Biology*. 29, 100238.
12. Ghosh S., Sarkar T., Das A., Chakraborty R. (2022). Natural colorants from plant pigments and their encapsulation: An emerging window for the food industry. *LWT- Food Science and Technology*. 153: 112527.
13. Giuliano G., Tavazza R., Diretto G., Beyer P., Taylor M.A. (2008). Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in biotechnology*. 26:3.
14. González-Peña M.A., Ortega-Regules A.E., de Parrodi C.A., Lozada-Ramírez J.D. (2023). Chemistry, occurrence, properties, applications, and encapsulation of carotenoids - a review. *Plants*. 12, 313.

15. Gopi G., Elumalai A., Jayasri P. (2012.). A concise review on *Tagetes erecta*. International Journal of Phytopharmacy Research. 3 (1): 16-19.
16. Grashorn M. (2016). Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages. U: Feed additives for influencing chicken meat and egg yolk color (ur. Carle R. i Schweiggert R.), Woodhead Publishing, Cambridge, MA.14: 284-302
17. Hussain S., Gulfreen E., Abid S., Khalil S., Rizwan M., Batool N., Aziz A., Yousra Abid H. M. U., Mahmood N. (2024). Investigating the impact of marigold supplementation on egg yolk color intensity: A study on dietary additives. Journal of Health and Rehabilitation Research. 4(1): 1744-1751.
18. Juric S., Vlahovicek-Kahlina K., Duralija B., Bandic L., Nekic P., Vincekovic M. (2021). Stimulation of plant secondary metabolites synthesis in soilless cultivated strawberries (*Fragaria x ananassa Duchesne*) using zinc-alginate microparticles. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 45(3): 324-334.
19. Jurić S., Jurić M. , Król-Kilińska Ž. , Vlahoviček Kahlina K., Dragović-Uzelac V., Donsi F. (2020). Sources, stability, encapsulation and application of natural pigments in foods. Food Reviews International. 38(8), 1735-1790.
20. Karadas F., Grammenidis E., Surai P.F., Acamovic T., Sparks N.H.C. (2006). Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. British Poultry Science. 47(5): 561-566.
21. Kavtarashvili A.S., Stefanova I.L., Svitkin V.S. (2019). Functional egg production. III. The role of the carotenoids. Agricultural Biology. 54(4): 681-692.
22. Kljak K., Carović-Stanko K. Kos I., Janječić Z., Kiš G., Duvnjak M., Safner T., Bedeković D. (2021). Plant carotenoids as pigment sources in laying hen diets: Effect on yolk color, carotenoid content, oxidative stability and sensory properties of eggs. Foods. 10: 721.
23. Kralik G., Has-Schön D., Šperanda M. (2008.). Peradarstvo; biološki i tehnički principi. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
24. Kurilich, A. C., Juvik, J. A. (1999). Simultaneous quantification of carotenoids and tocopherols in corn kernel extracts by HPLC. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 22: 2925-2934.
25. Lohmann Breeders GmbH. (2022). Lohmann Brown-Classic Layers. Management Guide. Cage Housing. <https://lohmann-breeders.com/media/strains/cage/management/LOHMANN-Brown-Classic-Cage.pdf> (pristupljeno 5.veljače 2024.)
26. Mahanta S., Talukdar M.C., Nath S., Das P., Saikia R., Hazarika H., Hazarika D. (2022). Effect of addition of marigold petals in poultry feed to increase the carotenoids content in egg yolk and to enhance yolk colour in laying hens. Ecology, Environment & Conservation. 28(1): 385-389.
27. Maoka T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. Journal of Natural Medicines. 74:1-16.
28. Marounek M., Pebriansyah A. (2018). Use of carotenoids in feed mixtures for poultry: a review. Agricultura tropica et subtropica. 51(3): 107-111.

29. Matache C.C., Panaite T.D., Cornescu G.M., Drăgotoiu D. (2024). influence of natural pigments on egg quality and yolk colour intensity – A review. *Animal Science and Biotechnologies*. 57(1): 184-194.
30. Mim Y.Z., Sultana F., Dey B., Ray B.C., Nishat N.J., (2021). Effects of Marigold petal and leaves on yolk pigmentation in laying hens. *Journal of Bangladesh Agricultural University*. 19(3): 325-331.
31. National Research Council (NRC). (1994). *Nutrient Requirements of Poultry*. 9. revidirano izdanje. Natl. Acad. Press, Washington.
32. Park Y.J., Park S., Arasu M.V., Al-Dhabi N.A., Ahn H., Kim J.K., Park S.U. (2017). Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different cultivars of *Tagetes* flowers. *Molecules*. 22, 313
33. Réhault-Godbert S., Guyot N., Nys Y. (2019). The golden egg: Nutritional value, bioactivities, and emerging benefits for human health. *Nutrients*, 11(3): 684.
34. Saini R.K., Prasad P., Lokesh V., Shang X., Shin J., Keum Y., Lee J. (2022.). Carotenoids: dietary sources, extraction, encapsulation, bioavailability, and health benefits- a review of recent advancements. *Antioxidants*. 11(4): 795
35. Santos D.T., Meireles M. A. A. (2010). Carotenoid pigments encapsulation: Fundamentals, techniques and recent trends. *The Open Chemical Engineering Journal*. 4: 42-50.
36. Skřivan M., Marounek M., Englmaierová M., Skřivanová E. (2016). Effect of increasing doses of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract on eggs carotenoids content, colour and oxidative stability. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 25: 58-64.
37. Skřivanová V., Englmaierová M., Bendová M., Skřivan M. (2017). Effect of the source and level of carotenoids in diets on their retention in eggs. *Czech Journal Animal Science*. 62: 323-330.
38. Spasevski N., Tasić T., Vukmirović Đ., Banjac V., Rakita S., Lević J., Đuragić O. (2017). Effect of different levels of marigold and paprika on egg production and yolk colour. *Archiva Zootechnica*. 20(2): 51-57.
39. Surai, P. F., Sparks, N. H. C. (2001). Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Science & Technology*. 12(1): 7-16.
40. Tokas J., Malik K., Punia H. (2018). Analysis of carotenoid composition in petal extracts of marigold (*Tagetes erecta*). *International Journal of Chemical Studies*. 6(1): 741-744.
41. Trpčić I., Njari B., Zdolec N., Cvrtila Fleck Ž., Fumić T., Kozačinski L. (2010.). Mikrobiološka kakvoća i ocjena svježine konzumnih jaja. *MESO*. 12(5): 286-293.
42. Vinceković M., Viskiće M., Jurić S., Giacometti J., Bursać Kovačević D., Putnik P., Donsi F., Barba F.J., Jambrak A.R. (2017). Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. *Trends in Food Science & Technology*. 69: 1-12.
43. Wen C., Su Y., Tao Z., Cheng Z., Zhou D., Wang T., Zhou Y. (2021). Dietary supplementation with microencapsulated lutein improves yolk color and lutein

- content in fresh and cooked eggs of laying hens. *Journal Poultry Science Association*. 58(2): 97-102
44. Wen C., Xu X., Zhou D., Yu Q., Wang T., Zhou Y. (2022). The effects of canthaxanthin microencapsulation on yolk color and canthaxanthin deposition in egg yolk of laying hens. *Poultry Science*. 101: 101889.
 45. Xue F., Li C., Pan S. (2013). In vivo antioxidant activity of carotenoid powder from tomato byproduct and its use as a source of carotenoids for egg-laying hens. *Food & Function*. 4:610-617.
 46. Zurak D., Grbeša D., Duvnjak M., Kiš G., Međimurec T., Kljak K. (2021). Carotenoid content and bioaccessibility in commercial maize hybrids. *Agriculture*. 11: 586
 47. Zurak D., Slovenec P., Janječić Z., Bedeković D., Pintar J., Kljak, K. (2022) Overview on recent findings of nutritional and non-nutritional factors affecting egg yolk pigmentation. *World's Poultry Science Journal*. 78: 531-560.

Životopis

Barbara Vuk rođena je 11. srpnja 2000. godine u Zagrebu, gdje nastavlja živjeti i školovati se. Nakon osnovne škole završila je IV. jezičnu gimnaziju. Završetkom srednje škole 2019. godine upisuje preddiplomski studij animalnih znanosti na Agronomskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. 2022. godine postaje prvostupnica (baccalaurea) inženjerka animalnih znanosti, nakon čega upisuje diplomski studij Hranidba životinja i hrana na Agronomskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.