

Ekstrakt kadifice (*Tagetes erecta* L.) u hranidbi nesilica

Čorbić, Karla

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:204:770727>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**EKSTRAKT KADIFICE (*Tagetes erecta* L.) U
HRANIDBI NESILICA: UTJECAJ NA
KVALITETU JAJA I OKSIDACIJSKU
STABILNOST ŽUTANJKA**

DIPLOMSKI RAD

Karla Čorbić

Zagreb, rujan, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Hranidba životinja i hrana

**EKSTRAKT KADIFICE (*Tagetes erecta* L.) U
HRANIDBI NESILICA: UTJECAJ NA
KVALITETU JAJA I OKSIDACIJSKU
STABILNOST ŽUTANJKA**

DIPLOMSKI RAD

Karla Čorbić

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Kristina Kljak

Zagreb, rujan, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Karla Čorbić**, JMBAG 0178120108, rođena 23.10.1999. u gradu Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**EKSTRAKT KADIFICE (*Tagetes erecta* L.) U HRANIDBI NESILICA: UTJECAJ NA
KVALITETU JAJA I OKSIDACIJSKU STABILNOST 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 **Karle Čorbić**, JMBAG 0178120108, naslova

**EKSTRAKT KADIFICE (*Tagetes erecta* L.) U HRANIDBI NESILICA: UTJECAJ NA
KVALITETU JAJA I OKSIDACIJSKU STABILNOST 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

Ovim putem najljepše zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Kljak, koja je svojim neizmjernim trudom, predanošću, dostupnošću i strpljenjem omogućila pisanje ovog rada. Hvala Vam na svakom savjetu i usmjerenju, bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.

Iskreno zahvaljujem i prof. dr. sc. Marku Vincekoviću, doktorandici Lani Živković, mag.chem., doktorandici Dori Zurak, mag.ing.agr. te djelatnicama laboratorija Zavoda za hranidbu životinja na njihovom znanju, savjetima i pomoći prilikom izvođenja laboratorijskih analiza koji su značajno pridonijeli izradi ovog rada.

Također, hvala mojim dragim kolegama i obitelji na podršci i razumijevanju koji su mi olakšali pisanje ovog rada.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Hipoteze i cilj istraživanja	2
2. Pregled literature	3
2.1. Značaj peradarske proizvodnje	3
2.2. Proizvodne karakteristike kokoši nesilica	3
2.3. Nutritivna vrijednost jaja	5
2.3.1. Dizajnirana jaja	6
2.4. Proizvodnja i potrošnja jaja	6
2.5. Hranidba kokoši nesilica	8
2.5.1. Alternativni dodaci u hranidbi kokoši nesilica.....	9
2.6. Biološka svojstva kadifice (<i>Tagetes erecta</i> L.)	10
2.7. Karotenoidi	11
2.7.1. Funkcije karotenoida - utjecaj na boju žutanjka i pozitivan učinak na zdravlje nesilica.....	12
2.8. Tehnologija inkapsulacije.....	13
2.9. Utjecaj karotenoida na kvalitetu jaja i oksidacijsku stabilnost žutanjka	15
3. Materijali i metode rada	19
3.1. Ekstrakcija i inkapsulacija praha cvijeta kadifice (<i>Tagetes erecta</i> L.) kalcijevim alginatom.....	19
3.2. Smještaj i držanje kokoši nesilica.....	21
3.3. Hranidba i hranidbeni tretmani.....	21
3.4. Sakupljanje uzoraka.....	25
3.5. Određivanje parametara kvalitete jaja	25
3.6. Određivanje oksidacijske stabilnosti žutanjka.....	26
3.6.2. TBARS u uvjetima oksidacije inducirane željezom	27
3.7. Statistička obrada podataka	29
4. Rezultati i rasprava.....	30
4.1. Parametri kvalitete jaja	30
4.2. Oksidacijska stabilnost	35
4.2.1. Oksidacijska stabilnost jaja tijekom skladištenja	35
4.2.2. Stabilnost žutanjka u induciranim uvjetima oksidacije.....	37
5. Zaključak.....	40
Popis literature.....	41
Životopis.....	46

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Karle Čorbić**, naslova

EKSTRAKT KADIFICE (*Tagetes erecta* L.) U HRANIDBI NESILICA: UTJECAJ NA KVALITETU JAJA I OKSIDACIJSKU STABILNOST ŽUTANJKA

Prirodni dodaci hrani nesilica poput ekstrakta kadifice mogu pridonijeti oksidacijskoj stabilnosti žutanjka jaja, ali su bioaktivni spojeva tih dodataka nestabilni. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti učinak inkapsuliranih karotenoida ekstrahiranih iz cvijeta kadifice (*Tagetes erecta* L.) sa sintetskim pigmentom (kantaksantinom) na kvalitetu jaja i oksidacijsku stabilnost žutanjka. Karotenoidi iz praha kadifice ekstrahirani su acetonom, otopljeni u suncokretovom ulju i inkapsulirani ionskim geliranjem s pomoću natrijevog alginata i kalcijevog klorida. Nakon sušenja, mikrokapsule su dodane u potpune krmne smjese za nesilice u koncentraciji od 0,5% i 1%. Pokus je proveden prema potpuno nasumičnom rasporedu s tri različita tretmana [T0 – kontrola standardna smjesa, T1 – 0,5%, T2 – 1% (3 tretmana × 5 kaveza, po 3 kokoši u svakom)]. Jaja su sakupljena 19., 20., 21. i 22. dana pokusa. Nakon analize kvalitete, žutanjci su korišteni za određivanje oksidacijske stabilnosti uvjetima željezom inducirane oksidacije dok su cijela jaja korištena za oksidacijsku stabilnost u različitim uvjetima skladištenja. Dodatak mikrokapsula ekstrakta kadifice imao je minimalan utjecaj na parametre kvalitete jaja. Utjecaj na sadržaj malondialdehida (MDA) u žutanjcima tijekom skladištenja jaja nije utvrđen, ali je dodatak mikrokapsula poboljšao oksidacijsku stabilnost žutanjaka u induciranim uvjetima. U žutanjcima kontrolne skupine zabilježen je najveći porast sadržaja MDA (288,42 ng/g) nakon 200 minuta inkubacije, dok su tretmani T1 i T2 imali značajno niži sadržaj MDA ($P = 0,0042$; redom 184,42 i 187,37 ng/g). Dodatak od 0,5% mikrokapsula u hranu nesilica pokazao se dovoljnim za očuvanje oksidacijske stabilnosti žutanjka jaja.

Ključne riječi: ekstrakt kadifice, karotenoidi, inkapsuliranje, kvaliteta jaja, oksidacijska stabilnost

Summary

Of the master's thesis – student **Karla Čorbić**, entitled

MARIGOLD EXTRACT (*Tagetes erecta* L.) IN LAYER HEN DIETS: IMPACT ON EGG QUALITY AND YOLK OXIDATIVE STABILITY

Natural additives, such as marigold extract, can contribute to the oxidative stability of egg yolk, but the bioactive compounds in these additives are unstable. The aim of this study was to compare the effect of encapsulated carotenoids extracted from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) with synthetic pigment (canthaxanthin) on egg quality and the yolk oxidative stability. Carotenoids from marigold meal were extracted with acetone, dissolved in sunflower oil and encapsulated by ionic gelation with calcium alginate. After drying, the microcapsules were added to laying hen diet at proportions of 0.5% and 1%. The experiment was carried out according to a completely randomised design with three different treatments [T0 – control, T1 – 0.5%, T2 – 1% (3 treatments × 5 cages, with 3 hens per cage)]. Eggs were collected on days 19, 20, 21 and 22 of the experiment. After analysing the egg quality, the yolks were used to determine the oxidative stability under iron-induced oxidation conditions, while the whole eggs were used to determine the oxidative stability under different storage conditions. The addition of marigold extract microcapsules had a minimal effect on egg quality. The effect on the malondialdehyde (MDA) content in the yolk during egg storage was not determined, but the microcapsule supplementation improved the oxidative stability of the yolk under induced conditions. The highest increase in MDA content after 200 minutes of incubation was recorded in the control group (288.42 ng/g), while treatments T1 and T2 had significantly lower MDA content ($P = 0.0042$; 184.42 ng/g and 187.37 ng/g, respectively). The addition of 0.5% microcapsules to the laying hen diet proved to be sufficient to maintain the oxidative stability of the egg yolk.

Keywords: marigold extract, carotenoids, encapsulation, egg quality, oxidative stability

1. Uvod

U industriji peradarstva, zbog porasta potrošnje jaja peradi, ključni su faktori kvaliteta jaja i njihova nutritivna vrijednost, kako za proizvođače tako i za potrošače. Peradarska proizvodnja usporedno sa zahtjevima potrošača kontinuirano traži načine za poboljšanje kvalitete jaja, istraživajući alternativna rješenja za tradicionalno korištene sintetske pigmente u hranidbi kokoši nesilica. U posljednje vrijeme, sve veći naglasak se stavlja na korištenje prirodnih izvora u hrani za kokoši nesilice kako bi se povećala i zdravstvena vrijednost jaja koja čine značajan dio ljudske prehrane. Većina potrošača najviše je zainteresirana za vanjski izgled i rok trajanja te boju žutanjka i ljusku jaja. S obzirom na to da perad ne može sintetizirati pigmente, već ih pohranjuje iz hrane, na sadržaj ovih komponenti jaja najviše utječe hranidba peradi sačinjena od različitih sirovina i aditiva kako bi se poboljšala kvaliteta žutanjka (Rezaei i sur., 2019.).

Ekstrakt cvijeta kadifice (*Tagetes erecta* L.) bogat je prirodnim pigmentima karotenoidima te se smatra obećavajućom alternativom sintetskim pigmentima korištenim u hrani peradi. Karotenoidi su prirodni pigmenti žute, narančaste i crvene boje, a dijele se na karotene (npr. β -karoten i α -karoten) i ksantofile (npr. α -kriptoksantin, β -kriptoksantin, lutein i zeaksantin). Navedeni karotenoidi djeluju antioksidativno u organizmu i poboljšavaju boju žutanjka te su karoteni i prekursori vitamina A. Iako je i β -kriptoksantin provitamin vitamina A, ističe se svojim crvenkastim svojstvima za razliku od luteina, stoga pokazuje najveću pigmentacijsku sposobnost. Lutein i zeaksantin štite zdravlje očiju preventivno djelujući na starosnu makularnu degeneraciju i kataraktu kod ljudi (Breithaupt, 2007.). Međutim, najčešće korišteni ksantofil u hranidbi peradi je kantaksantin, najčešće sintetičkog podrijetla i ne pojavljuje se prirodno u hrani kokoši nesilica. Deponiranje sintetskih pigmenata jače je od prirodnih, no prekomjerna upotreba kantaksantina može rezultirati stvaranjem kristala u mrežnici ljudskog oka, stoga se smatra potencijalno opasnom tvari za ljudsko zdravlje (Rezaei i sur., 2019.). S druge strane, jedan od načina primjene prirodnih pigmenata u hranidbi peradi je tehnologijom mikrokapsuliranja ekstrakta kadifice. Konzumacijom inkapsuliranih karotenoida omogućuje se sporo otpuštanje bioaktivnih spojeva koja imaju pozitivan učinak na zdravlje nesilica, a time i potrošača, zbog nutritivno obogaćenih jaja. Iz perspektive potrošača, intenzitet boje žutanjka se smatra važnim pokazateljem kvalitete jaja te su jaja jačeg intenziteta i poželjnija. Nadalje, jedan od najvažnijih pokazatelja kvalitete jaja je i oksidacijska stabilnost žutanjka. Štoviše, oksidacija lipida žutanjka utječe na okus, aromu, kvalitetu i nutritivnu vrijednost jaja uz proizvodnju toksičnih spojeva (Faitarone i sur., 2016.). Jednostavna i brza metoda koja se najčešće koristi za procjenu stabilnosti lipida je TBARS (engl. thiobarbituric acid reactive substances; reaktivni spojevi tiobarbiturne kiseline) koji kvantificira razinu malondialdehida (MDA). MDA je glavni produkt razgradnje lipidnih peroksida kancerogenih svojstava (Faitarone i sur., 2016.).

Korištenje prirodnih dodataka poput ekstrakta cvijeta kadifice ne samo da može poboljšati boju žutanjka i nutritivnu vrijednost jaja, već također može doprinijeti oksidacijskoj stabilnosti žutanjka, čime se smanjuje rizik od degradacije kvalitete jaja tijekom skladištenja. Također, primjena tehnologije inkapsuliranja omogućava stabilnost i učinkovito iskorištavanje karotenoida. Zbog rastuće potražnje za prirodnim dodacima u hranidbi kokoši nesilica, ovo istraživanje će pružiti uvid u potencijal ekstrakta kadifice kao prirodne alternative sintetskim

pigmentima i njegovo moguće pozitivno djelovanje na karakteristike kvalitete jaja te oksidacijsku stabilnost žutanjka.

1.1. Hipoteze i cilj istraživanja

Na temelju dosadašnjih istraživanja postavljene su sljedeće hipoteze:

- Dodatak mikrokapsula ekstrakta kadifice će imati pozitivan učinak na kvalitetu jaja;
- Dodatak mikrokapsula ekstrakta kadifice će imati pozitivan učinak na oksidacijsku stabilnost žutanjka pri različitim uvjetima tijekom skladištenja jaja;
- Dodatak mikrokapsula ekstrakta kadifice će imati pozitivan učinak na oksidacijsku stabilnost žutanjka u uvjetima oksidacije induciranom željezom.

Na temelju postavljenih hipoteza, cilj ovog istraživanja je usporediti učinke prirodnih pigmentata, inkapsuliranih karotenoida ekstrahiranih iz cvijeta kadifice (*Tagetes erecta* L.) sa sintetskim pigmentom (kantaksantinom) na kvalitetu jaja i oksidacijsku stabilnost žutanjka.

2. Pregled literature

2.1. Značaj peradarske proizvodnje

Peradarska proizvodnja je najbrže prilagodljiva grana stočarstva koja radi na uzgoju, selekciji i iskorištavanju više vrsta peradi, a ima veliki značaj u gospodarstvu. Zahvaljujući modernizaciji, peradarska proizvodnja je najjače razvijena grana stočarstva, koja je od ekstenzivnog postala većinski intenzivnog karaktera proizvodnje. S obzirom na to da podrazumijeva uzgoj više vrsta peradi, najveća važnost se pridodaje kokošima čija je zastupljenost 93% populacije (Domaćinović i sur., 2015.). Peradarska proizvodnja je neophodna jer osigurava prehrambene proizvode visoke nutritivne vrijednosti i doprinosi sigurnosti hrane na globalnoj razini za rastuće stanovništvo. Dakle, perad je među primarnim svjetskim izvorima bjelančevina životinjskog porijekla. Nadalje, kokoši imaju visok stupanj iskorištenja hrane koja je najveći trošak u proizvodnji, a karakterizira ih još ranozrelost i snažna reproduktivnost. U ruralnim područjima, prevladava uzgoj lokalnih pasmina peradi u sustavima ekstenzivnog karaktera s ciljem proizvodnje za vlastite potrebe. Nasuprot tome, u industrijaliziranim područjima, prevladava uzgoj visoko produktivnih hibrida u automatiziranim sustavima kako bi se maksimizirala proizvodnja prema potrebama potrošača.

Današnja intenzivna peradarska proizvodnja većinski koristi selekcionirane hibride koji se dijele na teške za proizvodnju mesa i lake tipove koji se koriste za proizvodnju jaja. Cijenjeni animalni proizvodi peradi su meso i jaja, a cilj intenzivne proizvodnje je proizvesti što veću količinu prehrambenih proizvoda uz što manji utrošak hrane. Jaja su tradicionalno neizostavna namirnica mnogih jer su bogata hranjivim tvarima visoke biodostupnosti te su cjenovno pristupačna. U posljednjih nekoliko desetljeća je porasla potražnja za proizvodima peradarske industrije, a 2020. godine je zabilježena globalna populacija kokoši iznad 33 milijarde (FAOSTAT, 2022.). Potražnja raste zbog povećanog stanovništva, a cijena konačnog proizvoda za potrošače je snižena upravo zbog modernih intenzivnih sustava koji omogućuju maksimalnu proizvodnju uz što manje gubitke. Također, od svih grana stočarstva, peradarska industrija se smatra najmanjim zagađivačem zbog niže emisije stakleničkih plinova i sposobnosti prilagodbe različitim uvjetima te konstantnim razvojem sustava uzgoja. Potražnja za peradarskim proizvodima u kontinuiranom je porastu i zbog činjenice da nema vjerskih prepreka, a jaja se općenito smatraju kvalitetnom prehrambenom namirnicom koja pomaže u sprječavanju pothranjenosti.

Dakle, peradarska proizvodnja nije samo važna zbog proizvodnje mesa i jaja, već i zbog svog doprinosa globalnoj sigurnosti hrane, nutritivne i ekonomske vrijednosti, održivosti i smanjenju siromaštva (FAOSTAT, 2022.).

2.2. Proizvodne karakteristike kokoši nesilica

Kokoši nesilice su postale izuzetno produktivne životinje primjenom naprednih sustava uzgoja i kvantitativne genetike (Harrington i sur., 2020.). Uzgajivači su težili stvaranju

„dugovječnih nesilica“ s proizvodnim ciklusom od 100 tjedana kako bi maksimizirali proizvodnju jaja kroz produljeni period (Harrington i sur., 2020.). Genetski gledano, kokoši nesilice se dijele na lake višelinjske hibride koje proizvode jaja smeđe i bijele boje. Proizvodnja jaja nesilica bijele ljuske je veća (300-310 jaja) od nesilica smeđe ljuske (290-300 jaja), ali manju nesivost kod nesilica smeđe ljuske nadoknađuje veća masa jaja za 2-3 g (Domaćinović i sur., 2015.). Poznati hibridi nesilica bijele ljuske su Lohmann, Hisex White, Shaver S 288, Babcock, Kimber, Prelux-N; dok su smeđe Lohmann, Hisex Brown, Hy-line Brown, DeCalb G-Link i Harko (Domaćinović i sur., 2015.). Proizvođači koriste određene genetske materijale na temelju područja u kojemu se nalaze i preferencija potrošača. Primjerice, u Sjedinjenim Američkim Državama jaja smeđe boje ljuske mogu postići i višu cijenu na tržištu (Karcher i Mench, 2018.). Današnji visoko selekcionirani hibridi u prosjeku nesu od 250 do više od 300 jaja godišnje (Karcher i Mench, 2018.). Međutim, kako bi se uspješno iskoristio genetski potencijal nesilica, potrebna je i odgovarajuća hranidba te uvjeti sustava uzgoja. Hibridne nesilice karakterizira vrlo rana spolna zrelost, stoga nesivost započinju s 19-20 tjedana starosti i eksploatiraju se do 12-15 mjeseci starosti u intenzivnim sustavima kada im proizvodnja padne ispod 40% što ovisi o hibridu (Domaćinović i sur., 2015.).

Jedan od najpoznatijih hibrida nesilica koji se koristi u komercijalnoj proizvodnji jaja je Lohmann Brown kojeg karakterizira visoka nesivost jaja smeđe ljuske, kvaliteta jaja te izdržljivost i otpornost jedinki. Proizvodne karakteristike uključuju nesivost, broj prizvedenih jaja po nesilici, prosječnu masu jaja, jajnu masu, čvrstoću i boju ljuske, prosječni dnevni unos hrane (engl. Average Daily Feed Intake, ADFI), konverziju (engl. Feed Conversion Ratio, FCR), masu nesilica te mortalitet. Lohmann Brown nesilice uzgojene su selekcijskim radom usmjerenim na zdravlje i povećanu otpornost na bolesti što je ključno za visoku proizvodnost i profitabilnost. Općenito je poznato da je masa proizvedenih jaja u korelaciji s tjelesnom masom kokoši nesilica, a Lohmann Brown postigne 50% svoje proizvodnje jaja u dobi od 140-145 dana. Broj proizvedenih jaja po nesilici u 72. tjednu starosti iznosi 320, a u 95. tjednu starosti 450 (28,02 kg jajne mase). Isto tako, masa jaja u početku iznosi 45-50 g i raste tijekom cijelog razdoblja nesivosti, odnosno u 72. tjednu starosti iznosi 63,9 g, dok u 95. tjednu starosti iznosi 65,2 g. Prosječni dnevni unos hrane ne prelazi 110-120 g/dan, a konverzija iznosi 2,0-2,2 kg/kg jajne mase što upućuje na izuzetnu učinkovitost u pretvaranju hrane u jaja (Lohmann Breeders GmbH, 2023.).

Proizvodne karakteristike pasmina kokoši nesilica ovise i o sustavima držanja (podni, kavezni, kombinirani), jer se različite pasmine ponašaju različito u svakom od tih sustava (Hilbert i sur., 2014.). Dominantni sustav držanja kokoši nesilica globalno je bio konvencionalni kavez, no povećan interes potrošača za načine proizvodnje hrane i porast brige za dobrobit životinja potaknuli su industriju drugim sustavima držanja (Karcher i Mench, 2018.). Zbog potrebe za omogućavanjem prirodnog ponašanja kokoši, Europska komisija od 1. siječnja 2012. godine prema direktivi 1999/74/EC zahtijeva da sve kokoši nesilice budu držane u obogaćenim kavezima s dodatnim prostorom za gniježđenje, kljucanje, čeprkanje i spavanje ili u alternativnim sustavima (Savjetodavna služba za poljoprivredu i ruralni razvoj, 2012). Iako su posljedice ekonomski troškovi, čimbenici poput osiguranja dobrobiti životinja i smanjeni stres uz pravilnu hranidbu, osvjetljenje i zdravstvenu zaštitu zajedno doprinose proizvodnim karakteristikama kokoši nesilica.

2.3. Nutritivna vrijednost jaja

Jaja se smatraju "cjelovitom hranom" važnom za zdravlje, a potrošači ih prepoznaju kao svestranu namirnicu s uravnoteženim sadržajem esencijalnih hranjivih tvari (bjelančevina, vitamina i minerala) i energije (Chambers i sur., 2017.). Osim što su tradicionalno niskokaloričan izvor visokokvalitetnih bjelančevina, posljednjih godina se sve više istražuju nove tehnologije za obogaćivanje bioaktivnim spojevima kako bi jaja potencijalno doprinosila očuvanju zdravlja. Jedan od ključnih čimbenika koji utječe na nutritivnu vrijednost i kvalitetu te općenito sastav jaja je hranidba peradi, čineći ih tzv. funkcionalnom hranom. Funkcionalna hrana može biti prirodno prisutna namirnica, hrana kojoj je dodan specifičan sastojak ili iz koje je određeni sastojak uklonjen, hrana s izmijenjenim svojstvima ili bioraspoloživošću jednog ili više sastojaka, ili kombinacija svih navedenih mogućnosti (Grčević i sur., 2011.). Funkcionalna hrana posljednjih godina sve više dobiva na značaju i popularnosti jer zadovoljava osnovne prehrambene potrebe te pruža dodatne zdravstvene koristi. Dizajnirana ili obogaćena jaja dobivaju se od nesilica koje se hrane smjesom s izmijenjenim sastavom, a mogu se svrstati u kategoriju funkcionalne hrane (Kralik i Jelić, 2017.).

Jaja se sastoje od žutanjka, bjelanjka i ljuske, a osnovni kemijski sastav jaja vidljiv je u tablici 2.3.1. Jedno cijelo jaje čini 72-75% vode, 12,5-13,3% bjelančevina, 10,7-11,6% masti, 0,7% ugljikohidrata i 1% minerala (Senčić i Samac, 2017.). Općenito je poznato da žutanjak sadrži najviše bjelančevina 15-17%, ali i masti 28-36%, za razliku od bjelanjka koji masti ima samo u tragovima. Prosječno jaje sadrži 6,5 g bjelančevina s visokim udjelom lizina, arginina, valina, izoleucina i leucina. Jaja sadrže omega-3 i omega-6 masne kiseline, uključujući alfa-linolensku kiselinu, arahidonsku kiselinu, linolnu kiselinu, EPA i DHA koje smanjuju razinu kolesterola u krvi i preventivno utječu na bolesti. Jedno jaje sadrži i 200 mg kolesterola, no ustanovljeno je da ne postoji povezanost između konzumacije jaja i razine kolesterola u krvi te kardiovaskularnih bolesti (Chambers i sur., 2017.).

Ugljikohidrati prisutni u jajima većinom su oligosaharidi povezani s bjelančevinama koji imaju pozitivan učinak na crijevnu mikrofloru jer mogu djelovati kao prebiotici, dok je glukoza najzastupljeniji slobodni šećer (Senčić i Samac, 2017.). Jaja sadrže sve čovjeku potrebne makro i mikro elemente od kojih su u najvećim koncentracijama željezo i fosfor u organskom obliku te ljuska sadrži značajnu količinu kalcija (Biđin, 2010.).

Bjelančevine iz jaja iskorištavaju se do 97%, masti do 95%, ugljikohidrati do 98%, a minerali do 76% u ljudskom organizmu što ih čini izuzetno vrijednim animalnim proizvodom naglašene biodostupnosti hranjivih tvari (Domaćinović i sur., 2015.). Jaja su bogata vitaminima topivima u mastima (A, D, E i K) i vitaminima iz B skupine te su također jedan od rijetkih izvora vitamina B12 (Senčić i Samac, 2017.). Dakle, kokošja jaja u žutanjku sadrže sve esencijalne vitamine, osim vitamina C, zbog čega imaju i dijetetski karakter.

Tablica 2.3.1. Osnovni kemijski sastav kokošnjih jaja

SASTOJCI	ŽUTANJAK	BJELANJAK	CIJELO JAJE
	%		
VODA	47,0-50,0	86,0-88,0	72,0-75,0
BJELANČEVINE	15,0-17,0	10,5-12,3	12,5-13,3
MASTI	28,0-36,0	u tragovima	10,7-11,6
UGLJIKOHIDRATI	0,7-1,4	0,1-0,5	0,7
MINERALNE TVARI	0,7-1,6	0,3-0,6	1,0

Izvor: Senčić i Samac (2017.)

2.3.1. Dizajnirana jaja

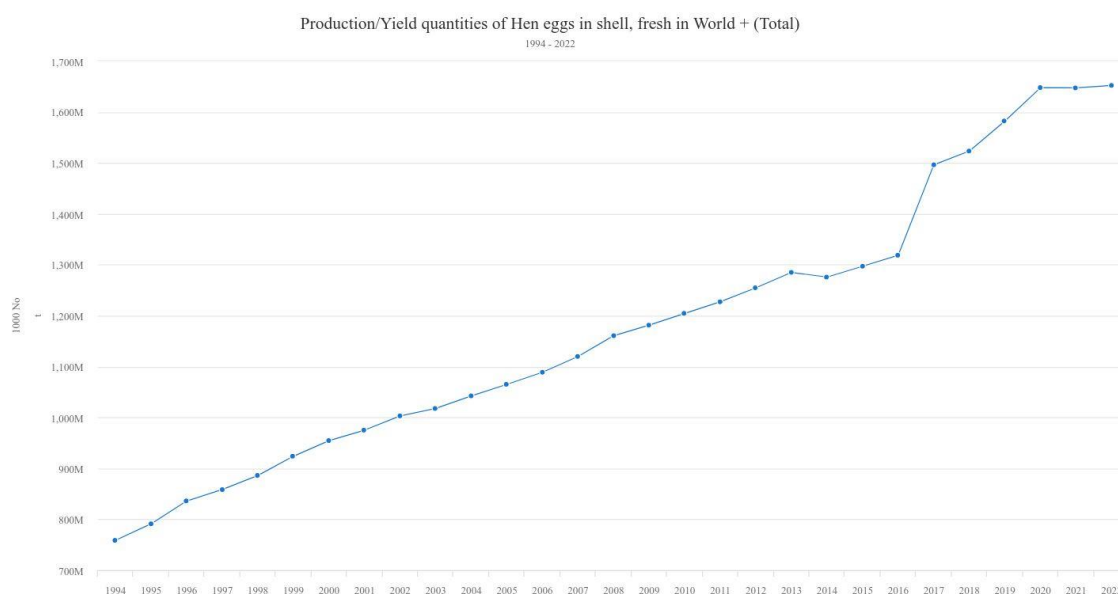
Jaja su postala neizostavna namirnica ljudske prehrane zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti. Međutim, standardna nutritivna vrijednost jaja više ne zadovoljava moderne prehrambene potrebe jer potrošači sve više traže namirnice s dodatnim zdravstvenim koristima koje mogu smanjiti rizik od kroničnih bolesti. To je rezultiralo razvojem obogaćenih, odnosno dizajniranih jaja. Dizajnirana jaja su jaja obogaćena dodatnim hranjivim tvarima, poput omega-3-masnim kiselinama, vitaminima, mineralima i karotenoidima, kako bi se dodatno poboljšala zdravstvena korist i zadovoljile prehrambene potrebe potrošača. Dizajnirana jaja nastaju modifikacijom hrane za kokoši nesilica, pri čemu povećanje određenih sastojaka u hrani za nesilice rezultira većom koncentracijom tih sastojaka u jajima (Kralik i Jelić, 2017.).

Smještaj kokoši također je važan čimbenik koji utječe na sastav i kvalitetu jaja, jer kokoši u kaveznom uzgoju nemaju pristup određenoj hrani prirodnog porijekla. Primjerice, prema radu Chambers i sur. (2017.) jaja kokoši nesilica na ispaši sadrže šest puta više omega-3 masnih kiselina u usporedbi s jajima kokoši iz kaveznog uzgoja, a visoke koncentracije polinezasićenih masnih kiselina u žutanjku pojačavaju antioksidacijski učinak vitamina E. Također, dodavanje vitamina topivih u mastima u hranu za nesilice može povećati njihov sadržaj u žutanjku do 10 puta (Zaheer, 2015.). Obogaćivanje hrane za kokoši nesilice karotenoidima može povećati koncentraciju karotenoida s antioksidacijskim djelovanjem u žutanjku jaja i povećati intenzitet žute boje žutanjka, što je posebno privlačno potrošačima. Prema radu Kralik i sur. (2017.), u usporedbi s konvencionalnim jajima, dokazano je da dizajnirana jaja imaju bolju boju žutanjka, veću visinu bjelanjka i više Haughove jedinice. Dakle, obogaćena hranidba kokoši nesilica pozitivno utječe na unutarnju kvalitetu jaja, ali negativno utječe na čvrstoću ljuske jaja.

2.4. Proizvodnja i potrošnja jaja

Globalna proizvodnja i potrošnja jaja u eksponencijalnom je porastu posljednja tri desetljeća, s obzirom na to da su jaja ekonomičan izvor relativno stabilne hranjive vrijednosti. Na Grafikonu 2.4.1. je prikazano brzo povećanje svjetske proizvodnje jaja u periodu od 1994. godine do 2022. godine. Prema FAOSTAT-ovim (2022.) podacima, svjetska proizvodnja jaja

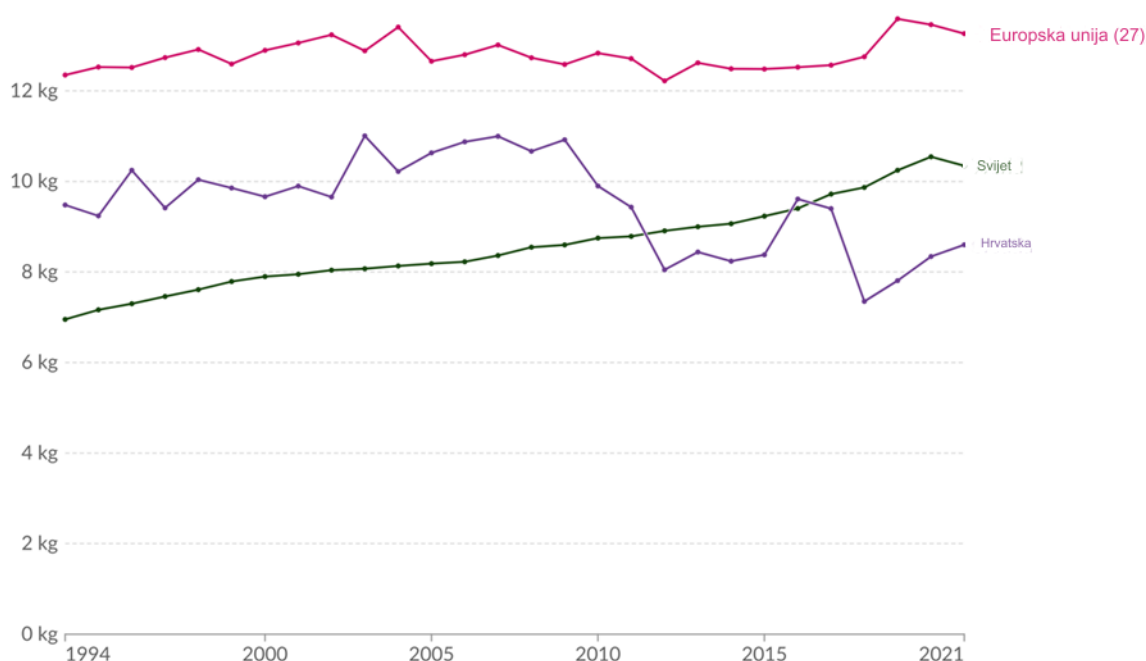
1994. godine je iznosila ~780 milijardi, dok je do 2022. godine bilo 7,9 milijardi kokoši nesilica koje su proizvele ~1 600 milijardi jaja te je industrija procijenjena na 113 milijardi američkih dolara. Najveći svjetski proizvođači jaja su Kina koja čini više od trećine svjetske proizvodnje i posjeduje više od 40 % svjetske populacije nesilica, a zatim slijede SAD i Indija (FAOSTAT, 2022.). U Republici Hrvatskoj u 2022. godini proizvodnja jaja je iznosila ~650 milijuna jaja (Kojić Jurinić i Mišćević, 2024.), dok su vodeće europske zemlje u proizvodnji jaja Francuska, Španjolska, Italija, Njemačka i Nizozemska. Međutim, zabrana upotrebe konvencionalnih kaveza uvedena 2012. godine je ograničila rast proizvodnje jaja u zemljama Europske unije, zbog povećanih troškova proizvodnje. Ipak, trend rasta proizvodnje jaja uspoređan je s trendom potrošnje jaja koji se utrostručio u posljednjih 40 godina, a očekivanja potrošača o kvaliteti jaja su također porasla (Zaheer, 2015.).



Grafikon 2.4.1. Svjetska proizvodnja jaja kroz godine
(izvor: FAOSTAT, 2022. godina)

Jaja su bogata visokokvalitetnim proteinima, esencijalnim aminokiselinama, vitaminima, mineralima te kolinom, luteinom i zeaksantinom, stoga su od velike važnosti za zdravu prehranu ljudi. Nadalje, pojam nutritivno obogaćene hrane odnosi se na dizajnirana jaja obogaćena raznim hranjivim tvarima. Također, prema Guyonnetu (2023.), jaja su neophodna namirnica koja se konzumira bez religijskih ili geografskih ograničenja, a unos kolesterola više se ne smatra zdravstvenim rizikom za opću populaciju. Na Grafikonu 2.4.2., prikazan je porast prosječne potrošnje jaja *per capita* u razdoblju od 1994. do 2021. godine u svijetu, Europskoj Uniji i Republici Hrvatskoj. Prosječna potrošnja jaja *per capita* 1994. godine na globalnoj razini je iznosila 6,95 kg i 12,35 kg u EU, dok je u RH 9,48 kg što je iznad svjetskog prosjeka potrošnje. Međutim, u 2021. godini prosječna potrošnja jaja *per capita* na globalnoj razini je iznosila 10,34 kg što je povećanje od 48 %, dok je u EU povećanje od 7 %, odnosno 13,26 kg (Our World in Data, 2024.). Porast trenda potrošnje jaja rezultat je povećanog interesa i

informiranosti potrošača za nutritivno obogaćenom hranom te modernizacije i prilagodbe sustava proizvodnje peradarske industrije. U RH prosječna potrošnja jaja *per capita* u 2021. godini je iznosila 8,60 kg što je pad potrošnje od 9,28 %.



Grafikon 2.4.2. Prosječna potrošnja jaja *per capita* u svijetu, EU i RH izražena u kg/godini

Izvor: https://ourworldindata.org/grapher/per-capita-egg-consumption-kilograms-per-year?tab=chart&time=1994..latest&country=HRV~OWID_EU27~OWID_WRL – pristup 23.08.2024.

2.5. Hranidba kokoši nesilica

Moderne kokoši nesilice su visoko produktivne životinje čiji se potpuni genetski potencijal ostvaruje pravilnom hranidbom. Pretvorba hrane od sirovih biljnih materijala u životinjske bjelančevine visoke biološke vrijednosti predstavlja veliki metabolički izazov, a neodgovarajuća hranidba može smanjiti proizvodnju i kvalitetu jaja kokoši nesilica (Bouvarrel i sur., 2011.). Kako bi se osigurala optimalna proizvodnja i kvaliteta jaja, ključno je razumjeti specifične hranidbene potrebe kokoši nesilica te prilagoditi hranidbu njihovom fiziološkom stanju i fazi proizvodnje.

Lipidi, bjelančevine i makrominerali u jajima su većinom stabilni, dok se sadržaj masnih kiselina, vitamina, mikrominerala i karotenoida u žutanjku može mijenjati ovisno o sastojcima hrane koju nesilice konzumiraju (Bouvarrel i sur., 2011.). Hranidbene potrebe kokoši nesilica podmiruju se kompletnim i dopunskim krmnim smjesama u intenzivnoj proizvodnji. Krmne smjese za perad sastavljene su od biljnih, životinjskih i mineralnih krmiva uzimajući u obzir pasminu i sustav proizvodnje, a njihov odabir i udio u smjesama temelji se na kemijskom sastavu i probavljivosti hranjivih tvari.

Različiti hibridi zahtijevaju različite programe hranjenja i udjele hranjivih tvari. Hranidbene potrebe kokoši nesilica mijenjaju se kako nesilice prolaze kroz faze početnog rasta, rasta, prije nesenja, proizvodnje jaja i mitarenja [National Research Council (NRC), 1994.]. Za osiguranje visoke proizvodnje, izuzetno je bitna faza prije početka nesivosti, odnosno prijelazna faza, u kojoj organizam nesilica treba pripremiti na nadolazeći iscrpni period proizvodnje jaja. Dva tjedna prije početka proneska nesilice se hrane prijelaznom smjesom, koja osigurava blagi prijelaz sa smjese niže na višu koncentraciju kalcija, prosječne hranjive vrijednosti 16,6% sirovih bjelančevina (SB), 11,4-12,5 MJ ME/kg i 2,75% Ca (Domaćinović i sur., 2015.). Također, prijelazne smjese osiguravaju usklađivanje hranidbenih potreba jata i akumuliranje kalcija u medularnim kostima potrebnog za izgradnju ljuske jaja. Prema NRC (1994.), prosječne hranidbene potrebe za konzumne kokoši nesilice u fazi nesivosti iznose 16-18% SB, 11,7-13,4 MJ ME/kg i 3,5-4,5% Ca.

Najčešća krmiva koja se koriste u proizvodnji smjesa su kukuruz, koji služi kao glavni izvor energije, kao i pšenično brašno koje ima mali udio sirovih vlakana, a najkvalitetniji izvor biljnog bjelančevinastog krmiva su sačme i pogače soje. Vitamini i minerali (Ca i P) su sastavni dio kompletnih krmnih smjesa jer su ključni za zdravlje kostiju, formiranje čvrste ljuske jaja i održavanje kvalitete jaja. Kod planiranja hranidbe kokoši nesilica, ključno je ne samo zadovoljiti njihove osnovne nutritivne zahtjeve, već i prilagoditi sastav hrane specifičnim potrebama proizvodnje i očuvanju zdravlja životinja. Pravilna formulacija smjesa, uz određene dodatke, može značajno poboljšati proizvodne rezultate, kvalitetu jaja i opće stanje nesilica.

2.5.1. Alternativni dodaci u hranidbi kokoši nesilica

Europska agencija za sigurnost hrane (engl. European Food Safety Authority, EFSA) definira dodatke kao tvari koje se dodaju u hranidbi životinja s ciljem unapređenja kvalitete hrane i proizvoda životinjskog podrijetla, ili za poboljšanje performansi i zdravlja životinja (Pirgozliev i sur., 2019.). Na poboljšanje proizvodnje utječu razni dodaci koji se dijele na hranjive tvari (masne kiseline, vitamini, minerali, aminokiseline), probiotike, enzime, aromatske tvari, antioksidanse i pigmentne tvari (Domaćinović i sur., 2015.). Osim podmirenja hranidbenih potreba u cilju održavanja maksimalne proizvodnje i kvalitete jaja, treba uzeti u obzir zdravlje i dobrobit životinja. S globalnim naglaskom na smanjenje upotrebe antibiotika i poboljšanje dobrobiti peradi, sve izraženija je primjena raznih dodataka prirodnog porijekla u hranidbi nesilica (Harrington i sur., 2020.). Alternativa tradicionalnim antibioticima, probioticima i prebioticima su biljni dodaci za koje se smatra da su prirodni proizvodi, koji imaju stimulirajući učinak na probavni sustav povećanjem proizvodnje probavnih enzima i poboljšanjem učinkovitosti iskorištenja hrane kroz poboljšanje funkcija jetre (Abou-Elkhair i sur., 2018.). Biljni ili fitogeni dodaci u hranidbi peradi imaju blagotvoran učinak na zdravlje nesilica zbog prisutnih bioaktivnih spojeva, poput polifenola, s antimikrobnim, antioksidacijskim, imunomodulatornim i protuupalnim svojstvima (Darmawan i sur., 2022.).

Nadalje, jaja sadrže visok udio polinezasićenih masnih kiselina (engl. polyunsaturated fatty acid, PUFA), što ih čini podložnim peroksidaciji i povećava potrebu za antioksidansima, poput prirodnih antioksidansa vitamina E i selena, čija se razina u jajima odražava hranidbom nesilica. Vitamin E je prirodni antioksidans topiv u mastima koji doprinosi oksidacijskoj stabilnosti jaja,

a njegovo djelovanje je još učinkovitije kada djeluje u sinergiji sa selenom. Vitamin E neutralizira slobodne radikale i sprječava oksidaciju lipida, dok selen dodatno razgrađuje perokside koji nastaju tijekom oksidacije lipida (Mohiti-Asli i sur., 2008.).

Također, prirodne pigmentne tvari s antioksidacijskim djelovanjem poput karotenoida, mogu utjecati na boju žutanjka, zadovoljavajući tržišne zahtjeve za poželjnom bojom i pritom poboljšavajući vizualnu privlačnost jaja. Međutim, zbog niske stabilnosti prirodnih pigmenata i više cijene, većina pigmenata koja se koristi u današnjoj peradarskoj industriji je sintetičkog porijekla upitne sigurnosti (Wang i sur., 2016.). Također, dodaci prirodnog porijekla povećavaju hranjivu vrijednost jaja, a potrošači njihovom konzumacijom u svoj organizam unose tvari koje pozitivno djeluju na njihovo zdravlje.

2.6. Biološka svojstva kadifice (*Tagetes erecta* L.)

Tagetes erecta L., poznata kao afrička kadifca, je visoka, uspravna biljka s razgranatim stabljikama i perasto razdijeljenim listovima. Cvjetovi su veliki, okruglasti i mogu biti jednostruki, polupuni ili puni, u rasponu boja od svijetlo žute do zlatno žute i narančaste (Slika 2.6.1.) (Datta i Gupta, 2022.). Rasprostranjena je po cijelome svijetu i smatra se osnovnom vrstom svih modernih vrtova, a Meksiko se priznaje kao njezino izvorno područje. Kadifca je ukrasna biljka prepoznata po svojim cvjetovima žarkih boja i intenzivnog mirisa koji se tradicionalno koriste u mnogim društvenim i religijskim običajima te u narodnoj medicini zbog svojih ljekovitih svojstava (Chitrakar i sur., 2019.). Latice kadifce se mogu koristiti svježe, kao sušeni prah ili kao ekstrakt. Lišće kadifce koristi se kao antiseptik i za bolove u mišićima te je bogato aromatičnim eteričnim uljem (*Tagetes* ulja). Dakle, kadifca sadržajem nekoliko vrsta sekundarnih metabolita poput eteričnog ulja, flavonoida, sterola, tanina, saponina, polisaharida, triterpenskih alkohola, gorke tvari, sluzi i smole posjeduje snažne terapijske učinke, a u cvijetu je najveći sadržaj karotenoida (Ćetković i sur., 2004.). Zbog sekundarnih metabolita, prema radu Singh i sur. (2020.), kadifca posjeduje antibakterijska, protuupalna, antioksidativna, antikancerogena, hepatoprotektivna, antiepileptička, antidiabetička, antifungalna, antidepresivna i larvicidna svojstva uz aktivnost zarastanja rana.

Razlog intenzivne boje cvijeta je visoki sadržaj žutih karotenoida, ponajviše ksantofila, od kojih je lutein najzastupljeniji, a slijedi ga zeaksantin. Lutein je prisutan u različitim količinama ovisno o boji cvijeta, od 4 mg/g u zeleno žutim do 800 mg/g u narančastim cvjetovima, stoga se kadifca smatra važnim komercijalnim izvorom luteina (Chitrakar i sur., 2019.). Ekstrakt kadifce je mješavina ksantofilnih pigmenata dobivenih iz cvjetova, a glavni aktivni sastojci ekstrakta su vrste karotenoida, koje su prirodno prisutne u jestivim biljkama i smatraju se sigurnima za konzumaciju (Wang i sur., 2016.). Osim žutih karotenoida poput karotena (α - i β -karoten) i ksantofila (lutein, zeaksantin), cvjetne latice su izvor i crvenih karotenoida kao što su kapsantin, kantaksantin i astaksantin (Hojnik i sur., 2008.). Ekstrakti dobiveni iz kadifce najviše se koriste u hranidbi peradi kao prirodni pigmenti snažnih antioksidacijskih svojstava.



Slika 2.6.1. Afrička kadifica (*Tagetes erecta* L.)

Izvor: <https://www.thespruce.com/growing-mexican-marigolds-tagetes-erecta-5101113> - pristup 31.08.2024.

2.7. Karotenoidi

Karotenoidi su široko zastupljeni prirodni žuti, narančasti ili crveni pigmenti, prisutni u brojnim biljkama, algama, bakterijama i gljivama. Procjenjuje se da se svake godine u prirodi stvori oko 100 milijuna tona, a postoji približno 750 poznatih karotenoida, od kojih je oko 500 detaljno istraženo i 40 je uključeno u ljudsku prehranu (Rodríguez-Amaya, 2016.). Karotenoidi su bioaktivni spojevi složene strukture te posjeduju mnogobrojne funkcije i učinke, uključujući zaštitu od oksidacijskog stresa, sudjelovanje u fotosintezi i doprinos zdravlju kroz antioksidacijska svojstva.

Kemijski gledano, karotenoidi su terpenoidi s 40 ugljikovih atoma pri čemu je osnovna strukturna jedinica izopren (Kiokias i sur., 2016.). Građeni su od osam izoprenskih jedinica, s cikličkim ili linearnim strukturama na krajevima ugljičnih lanaca, što rezultira različitim cis i trans izomerima, pri čemu su stabilniji trans izomeri češći u prirodi (González-Peña i sur., 2023.). Osnovno su podijeljeni u dvije podklase prema prisutnosti ili odsutnosti kisika u njihovoj kemijskoj strukturi: ako je u molekuli prisutan barem jedan atom kisika, nazivaju se ksantofili, dok se u suprotnom nazivaju karoteni (Breithaupt, 2007.). Karoteni su ugljikovodični karotenoidi poput α -karotena, β -karotena, γ -karotena i likopena. Hidroksilacijom karotena nastaju ksantofili poput luteina, zeaksantina, fukoksantina, violaksantina, α - i β -kriptoksantina. Također, ksantofili su topljivi u organskim i polarnim otapalima, dok su karoteni topljivi samo u organskim otapalima te općenito karotenoidi nisu topljivi u vodi.

Karotenoidi su prisutni u mnogim vrstama narančastog i crvenog voća i povrća, bobičastog voća, zeleno lisnatog povrća, tropskog voća i citrusima te cvijeću poput nevena i kadifice, a nalaze se unutar plastida. U plodovima, cvjetovima i korijenju, karotenoidi su smješteni u kromoplastima odgovornima za boju, dok se u žitaricama i uljaricama pohranjuju u amiloplastima koji pohranjuju škrob i elaioplastima za pohranu lipida. Za razliku od toga, ksantofili su prisutni u zelenim dijelovima biljaka, a u plodovima i cvjetovima pojavljuju se u obliku estera masnih kiselina (González-Peña i sur., 2023.). α - i β -karoten variraju od žute do crvene boje, a najčešće se nalaze u mrkvi, marelici, naranči, batatu, mangu, bundevi i zelenom

povrću. β -kriptoksantin varira od žute do narančaste boje, a prisutan je u citrusima, dinji, krumpiru i jabuci. Lutein i zeaksantin su izomeri koji se prirodno nalaze u žutom kukuruzu i cvijetu nevena i kadifice, ali i u brokuli, bundevi, paprici, zelenom povrću, sjemenkama i mahunarkama (Rodriguez-Amaya, 2016.). Karotenoidi su intenzivno obojeni zbog svoje specifične strukture, odnosno njihovi π elektroni su raspoređeni kroz sustav konjugiranih dvostrukih veza i lako se aktiviraju zbog niske energije, koja odgovara svjetlu u vidljivom spektru (400–500 nm) (Rodriguez-Amaya, 2016.). Ovaj konjugirani sustav veza djeluje kao kromofor, što znači da daje karotenoidima njihovu boju i omogućuje identifikaciju prema njihovim apsorpcijskim spektrima.

Biosinteza karotenoida odvija se u kloroplastima. Konjugirani polien kromofor u molekuli karotenoida određuje apsorpciju svjetlosti, boju te fizikalno-kemijska svojstva, dok veličina, oblik i polaritet omogućuju pravilno uklapanje karotenoida u okolinu i ostvarivanje bioloških funkcija poput fotosinteze i zaštite od svjetlosti (Kiokias i sur., 2016.). S druge strane, životinje ne mogu sintetizirati karotenoide *de novo*, već ih unose putem hranidbe. Kod životinja, ksantofili se uglavnom nalaze u mesu, koži riba (pastrva, losos), u oklopu rakova (škampi, jastozi, antarktički kril) te u potkožnom masnom tkivu, koži, žutanjcima, jetri, pokrovima i perju peradi (Breithaupt, 2007.). Bioraspoloživost karotenoida ovisi o sastavu i vrsti karotenoida, udjelu masti u hrani i interakciji karotenoida s drugim tvarima u hrani te fiziološkim čimbenicima, poput brzine apsorpcije karotenoida, nutritivnog stanja, genetskih čimbenika i metabolizma. Prema istraživanju González-Peña i sur. (2023.), topiva vlakna mogu smanjiti dostupnost karotenoida, jer utječu na viskoznost sadržaja u probavnom sustavu, veličinu lipidnih kapljica, prisutnost žučnih soli, te proces enzimske razgradnje triglicerida. Također, bioraspoloživost β -karotena iz biljnih izvora je niska zbog toga što su karotenoidi vezani uz proteinske komplekse, vlakna i stanične stijenke, što otežava njihovu probavu i apsorpciju u organizmu. S druge strane, dodavanje masti u hranu povećava apsorpciju karotenoida jer lipidi pospješuju formiranje micela oslobađanjem žučnih soli.

2.7.1. Funkcije karotenoida - utjecaj na boju žutanjka i pozitivan učinak na zdravlje nesilica

Boja žutanjka je važan faktor u formiranju preferencija potrošača u raznim zemljama. Potrošači često povezuju intenzivnu žutu ili zlatno-narančastu boju s kvalitetnim i zdravim jajima, dok blijedu boju žutanjka smatraju znakom zdravstvenih problema nesilica ili uzgojem u neodgovarajućim uvjetima. Međutim, boja žutanjka zapravo ne odražava nutritivnu vrijednost jaja te najviše ovisi o hranidbi kokoši nesilica. Ipak, kako bi se zadovoljili zahtjevi tržišta za bojom žutanjka, pigmenti se često dodaju u krmne smjese, kako bi se postigla intenzivnija žuta boja žutanjka u komercijalnoj proizvodnji, pri čemu je konačna boja uglavnom rezultat taloženja pigmenata u jajetu (Wang i sur., 2016.).

Sinteza pigmenata u peradarskoj industriji već dugi niz godina uključuje pretežno sintetičke pigmente koji se proizvode biotehnološkim procesima, cjenovno su prihvatljiviji i stabilniji, no sve je veća zabrinutost potrošača oko njihove sigurnosti. Prema Regulativi 1831/2003 o dodacima hrani za životinje, ksantofili koji se smiju dodavati u hranu za životinje uključuju kapsantin, etilni ester β -apo-8'-karotenska kiseline, lutein, kantaksantin, zeaksantin i

citranaksantin (Europska komisija, 2021.). Maksimalni dozvoljeni sadržaj kantaksantina je 8 mg/kg u hrani za nesilice, dok je u hrani za perad osim nesilica dozvoljena količina do 25 mg/kg. Ostali sintetički ksantofili mogu imati maksimalni sadržaj od 80 mg/kg prema EU Regulativi dodataka hrani za životinje (Europska komisija, 2021.). Industrija nutraceutika proizvodi pet sintetskih karotenoida (likopen, β -karoten, kantaksantin, zeaksantin i astaksantin) koji se koriste kao aditivi u hrani za životinje (Cazzonelli, 2011.). Iako kantaksantin postoji u prirodi, danas se većinom koristi proizveden kemijskom sintezom zbog njegove učinkovitije pigmentacije u odnosu na citranaksantin ili astaksantin, stoga se sintetički kantaksantin preferira kao crveni ksantofil u peradarskoj industriji (Breithaupt, 2007.). Regulacija sintetskih karotenoida posljedica je njihovog potencijalnog štetnog djelovanja na zdravlje čovjeka. Pri vrlo visokim dozama kantaksantina može doći do stvaranja sitnih kristala u mrežnici kroz proces taloženja koji je reverzibilan (Breithaupt, 2007.).

Upravo zbog sve veće zabrinutosti i informiranosti potrošača, raste interes za korištenjem prirodnih pigmenata karotenoida zbog brojnih funkcija poput poboljšanja zdravlja i prevencije bolesti kroz antioksidativno djelovanje, zaštite kože od UV zračenja te doprinosa očuvanju vida. Karotenoidi su najviše korišteni kao bojila, no određeni karotenoidi su prekursori vitamina A ako njihova struktura uključuje barem jedan β -jononski prsten povezan s lancem od 11 ugljikovih atoma. Najpoznatiji primjer za to je β -karoten, koji ima veći potencijal za pretvorbu u vitamin A u usporedbi s α -karotenom i β -kriptoksantinom (Rutz i sur., 2016.). Biljni karotenoidi su glavni prehrambeni izvori provitamina A, čiji nedostatak može uzrokovati sljepoću, no karakteriziraju ih slabija pigmentacijska svojstva (Marounek i Pebriansyah, 2018.). Osim svoje uloge u sintezi vitamina A, karotenoidi su poznati po snažnim antioksidacijskim svojstvima zahvaljujući konjugiranim dvostrukim vezama, koje im omogućuju neutralizaciju slobodnih radikala (Rutz i sur., 2016.). Ipak, zbog tih dvostrukih veza, karotenoidi su osjetljivi na promjene pod utjecajem kisika, svjetlosti i topline, što može dovesti do smanjenja njihove boje, antioksidacijskih svojstava i vitaminske aktivnosti. Iako svi karotenoidi pokazuju antioksidacijska svojstva, likopen, astaksantin i β -karoten su učinkovitiji u uklanjanju singletnog kisika u usporedbi s drugim karotenoidima (González-Peña i sur., 2023.). Nadalje, β -karoten, lutein i likopen, štite kožu od UV-induciranih oštećenja zahvaljujući svojoj sposobnosti neutraliziranja reaktivnih kisikovih vrsta i protuupalnim svojstvima, čime doprinose u zaštiti kože od štetnih učinaka sunčeve svjetlosti (Cazzonelli, 2011.). U radu Gopinath i sur. (2020.) dokazan je učinak umjerene konzumacije jaja bogatih karotenoidima na značajno smanjenje rizika od razvoja kasne faze makularne degeneracije povezane sa starenjem (engl. age-related macular degeneration, AMD) tijekom 15-godišnjeg razdoblja. Također, s obzirom na to da se lutein i zeaksantin nakupljaju u mrežnici oka, istovremeno smanjuju i rizik od razvoja katarakte, čime prenošenje ksantofila u ljudskom prehrambenom lancu postaje korisno za zdravlje (Marounek i Pebriansyah, 2018.).

2.8. Tehnologija inkapsulacije

Karotenoidi imaju brojne pozitivne karakteristike, no s obzirom da su to bioaktivne tvari osjetljive na pH, toplinu, svjetlost i oksidaciju, njihova stabilnost i učinkovitost često su

umanjene, što zahtijeva posebne metode zaštite poput inkapsulacije. Tehnologija inkapsulacije u prehrambenoj industriji koristi se za zaštitu tekućih i čvrstih sastojaka od kisika, svjetla i slobodnih radikala, zatvarajući ih unutar materijala za oblaganje te poboljšavajući stabilnost bioaktivnih spojeva i osiguravajući njihovu bolju zaštitu i učinkovitost (Eun i sur., 2019.). Tehnologije inkapsulacije uključuju mikroinkapsulaciju, nanoinkapsulaciju i superkritičnu inkapsulaciju. Karotenoidi su podložni izomerizaciji i oksidaciji kada su izloženi kisiku, svjetlu i toplini, što može dovesti do gubitka boje, antioksidacijske aktivnosti i vitaminske aktivnosti. Mikroinkapsulacija pomaže u očuvanju stabilnosti karotenoida i potiče njihovo sporo oslobađanje u specifičnim uvjetima (Rutz i sur., 2016.).

Inkapsulacija je postupak gdje su tvari obavijene zaštitnim materijalom kako bi bile zaštićene od vanjskih utjecaja stvarajući male kapsule, a može se podijeliti na fizičke metode (sušenje raspršivanjem i sušenje zamrzavanjem), fizikalno-kemijske metode (kompleksna koacervacija, ionska gelacija i elektrostatno taloženje sloj-po-sloj) te kemijske metode (interfacijalna polimerizacija i *in situ* polimerizacija) (da Silva i sur., 2022.). Zaštitni materijali su obično biorazgradivi polimeri koji mogu biti prirodni, modificirani prirodni ili sintetički te također omogućuju postupno oslobađanje aktivnih tvari u određenim dijelovima tijela (Rutz i sur., 2016.). Zaštitni materijali ili nosači uključuju polisaharide (maltodekstrin, škrob, natrijev alginat), gume (arapska i rogačeva guma) te proteine (gluten, kazein, želatina, proteini soje, albumin i oligopeptidi) (González-Peña i sur., 2023.).

Jedna od čestih metoda mikroinkapsulacije je sušenje raspršivanjem koja stvara sitne čestice prolaskom suspenzije kroz raspršivač u kojem protječe stlačeni zrak visoke temperature. Vrući zrak dehidrira čestice pretvarajući ih u prah u kojem je inkapsulirana tvar. S druge strane, sušenje zamrzavanjem ili liofilizacija je postupak inkapsulacije u kojem nastaju veće čestice, a primjenjuje se za termolabilne bioaktivne spojeve. Postupkom liofilizacije, dehidrira se zamrznuti materijal (-80 do -40 °C) koristeći vakuumsku sublimaciju pri niskom tlaku (González-Peña i sur., 2023.). Dakle, sušenje raspršivanjem i zamrzavanjem su dvije najčešće korištene metode mikrokapsulacije, no prema istraživanju Milivojević i sur. (2023.), kada se karotenoidi podvrgnu tim procesima, često dolazi do značajnih gubitaka u njihovom sastavu ili funkcionalnosti. Ionsko geliranje je fizikalno-kemijska metoda mikroinkapsulacije koja je stekla značajnu pažnju posljednjih desetljeća, a koristi kemijsku reakciju između iona i polimera kako bi se stvorila gel struktura koja može obuhvatiti aktivne tvari (Slika 2.8.1.) (da Silva i sur., 2022.). Ionsko geliranje počinje s vodenom polimernom otopinom, u kojoj ioni male molekulske mase reagiraju s polielektrolitima suprotnih naboja kako bi se stvorio netopljivi gel, dok se aktivni materijal koji se treba inkapsulirati otapa ili emulgira u toj polimernoj otopini (da Silva i sur., 2022.). Kada kapljice te otopine dospiju u ionsku otopinu, potiču formiranje sfernih gel struktura koje sadrže aktivni materijal unutar polimerne matrice. Natrijev alginat se najčešće koristi za ionsko geliranje zbog svojih izvrsnih svojstava geliranja i kemijske strukture. Geliranje Na-alginata uz pomoć dvovalentnih kationa, kao što je kalcijev klorid (CaCl_2), odvija se brzo i ireverzibilno. Međutim, zbog visoke topljivosti soli CaCl_2 , geliranje može postati nekontrolirano, što može otežati postizanje ravnotežnih struktura i željenih mehaničkih svojstava gela, stoga je važno regulirati brzinu geliranja kako bi se osigurala uniformnost struktura i optimalna svojstva gela (Milivojević i sur., 2023.).

Inkapsulacija je jedna od najperspektivnijih metoda očuvanja bioraspoloživosti tvari koje se zatim mogu implementirati u hranidbu kokoši nesilica. Ionsko geliranje karotenoida može

poboljšati njihovu bioraspoloživost i zaštititi ih od probavnih enzima u gastrointestinalnom traktu (Milivojević i sur., 2023.). Mnogi autori su naveli da inkapsulirani karotenoidi pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na slobodne karotenoide jer mikrokapsule povećavaju stabilnost karotenoida stvaranjem polupropusne barijere, koja omogućuje difuziju kisika i reaktivnih spojeva, koji zatim reagiraju s antioksidansima i bivaju neutralizirani (González-Peña i sur., 2023.). Također, dodavanje inkapsuliranog luteina u hranidbu nesilica poboljšalo je boju žutanjka svježih jaja te je bio učinkovitiji u povećanju sadržaja luteina u žutanjku u usporedbi s neinkapsuliranim luteinom (Wen i sur., 2021.). Primjena inkapsuliranih pigmentata u prehrambenoj industriji otvara nove mogućnosti u razvoju funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Ghosh i sur., 2022.).



Slika 2.8.1. Shema ionskog geliranja (Vemmer i Patel, 2013.)

2.9. Utjecaj karotenoida na kvalitetu jaja i oksidacijsku stabilnost žutanjka

Kvaliteta jaja ocjenjuje se prema preferencijama potrošača te obuhvaća procjenu žutanjka, bjelanjka i ljuske, dijeleći se na unutarnje i vanjske pokazatelje. Vanjski pokazatelji uključuju masu jaja, oblik, čistoću i kvalitetu ljuske koja se dijeli na čvrstoću i debljinu. Unutarnji pokazatelji najvažniji su potrošačima, a uključuju indeks žutanjka i bjelanjka, Haughove jedinice (HU), boju žutanjka, veličinu zračne komorice i stupanj starenja te pH bjelanjka i žutanjka (Kralik i sur., 2024.). Svi pokazatelji kvalitete jaja ovise o nekoliko čimbenika poput genotipa i starosti kokoši nesilica, hranidbe, sustava uzgoja te intenzitetu nesivosti (Duman i sur., 2016.).

Masa jaja je izrazito varijabilna jer ovisi o genotipu i masi nesilica te u prosjeku iznosi od 58 do 62 g (Ledvinka i sur., 2012.). Prema Pravilniku o kakvoći konzumnih jaja (NN 115/06, 69/07, 76/08), jaja se klasificiraju prema svježini, odnosno klasa A ili svježa jaja i klasa B ili jaja za industrijsku preradu. Također, s obzirom na masu, jaja se dijele u četiri razreda: XL -

vrlo velika jaja od 73 g i više, L - velika jaja od 63 do 73 g, M - srednje velika jaja od 53 do 63 g i S - mala jaja mase manje od 53 g. Tijekom nesivosti se povećava masa jaja, dok debljina i čvrstoća ljuske opadaju. Indeks oblika jajeta, koji se definira kao omjer širine i dužine jajeta, značajno utječe na varijaciju čvrstoće jajeta na drobljenje (Duman i sur., 2016.). Jaja ovalnog oblika svrstavaju se u razrede AA (skoro savršena) ili A (lošija od AA), dok se jaja neobičnih oblika (duga, uska, ravna s bočnih strana) ne mogu svrstati u te razrede zbog veće sklonosti pucanju (Duman i sur., 2016.). Kvaliteta ljuske jajeta je definirana kao količina prisutne ljuske te njezina specifična težina i lomljivost (Trpčić i sur., 2010.). Ljuska jajeta je polupropusne porozne strukture koja ograničava prolazak mikroorganizama, zraka i vode, stoga bi trebala biti čista i bez pukotina, a sastoji se od 94% kristala kalcijevog karbonata (Zaheer, 2015.). Također, ljuske su najčešće smeđe ili bijele boje, što je povezano s genetikom i ne utječe na kvalitetu ili okus jaja.

Indeks žutanjka i bjelanjka odnosi se na širinu i visinu, a pokazuje spljoštenost žutanjka koji bi trebao biti okrugao i nepokretan u sredini jaja, dok je bjelanjak bistar, proziran i kompaktan (Trpčić i sur., 2010.). Klasični međunarodni indeks za procjenu unutarnje kvalitete jaja je Haughova jedinica, s kojom je usko povezan i pH bjelanjka, a kvaliteta bjelanjka je bolja što je Haughova jedinica viša (Malfatti i sur., 2021.). Nadalje, pH svježeg položenog žutanjka je oko 6, a tijekom skladištenja raste na 6,4 do 6,9, dok se pH bjelanjka povećava sa 7,6 na 9,7 zbog poremećaja ravnoteže kemijskih spojeva jaja (Dansou i sur., 2023.). Tijekom skladištenja raste i visina zračne komorice proporcionalno 0,32 mm dnevno zbog prodora zraka kroz pore ljuske, dok visina od 3 mm ukazuje na svježije jaje (Trpčić i sur., 2010.). Prema radu Dansou i sur. (2023.), nekoliko istraživanja je izvijestilo da karotenoidi ne utječu na fizičku kvalitetu jaja, poput mase jaja, debljine ljuske, visine bjelanjka i Haughove jedinice, dok su s druge strane zabilježeni pozitivni učinci na određene pokazatelje kvalitete jaja. Masa jaja i žutanjka kod kokoši hranjenih dodatkom likopena (62,80 g i 18,66 g za jaje i žutanjak) ili rajčicom u prahu (63,01 g i 18,75 g) bila je veća nego kod kokoši hranjenih kontrolnom dijetom (60,50 g i 16,49 g).

Boja žutanjka varira od svjetložute do intenzivno žute ovisno o hranidbi kokoši nesilica, koje nisu sposobne sintetizirati pigmente, ali mogu prenijeti oko 20-60 % pigmenta iz unesene hrane u žutanjak (Lokaewmanee i sur., 2010.). Ksantofili poput luteina i zeaksantina se nalaze u prirodnim izvorima hrane za nesilice kao što su kukuruz ili lucerna te su rezultat boje žutanjka. Obogaćivanje hrane nesilica masnim kiselinama rezultira poboljšanjem lipidnog profila u žutanjku, što je važno za karotenoide jer su topivi u mastima te se bolje apsorbiraju i prenose u organizam u prisutnosti zdravih masnih kiselina (omega-3 masne kiseline i ostale nezasićene masti). Kantaksantin, β -kriptoksantin, likopen i astaksantin daju žutanjku boju u nijansama od narančaste do crvene, dok lutein i zeaksantin daju žutanjku žutu boju (Slika 2.9.1.) (Dansou i sur., 2023.). Intenzitet boje žutanjka je važan pokazatelj kvalitete jaja jer ima ključnu ulogu u prihvaćanju jaja od strane potrošača čije se preferencije razlikuju među zemljama. Za vizualnu procjenu boje žutanjka koristi se lepeza boja (eng. Yolk Colour Fan, YCF) koja se sastoji od 16 krilaca, a svako krilce prikazuje različitu nijansu boje žutanjka, ovisno o omjeru žutih i crvenih karotenoida u hranidbi nesilica (Slika 2.9.2.) (Grashorn, 2016.). U Europi, potrošači preferiraju boju žutanjka između 10 i 14 prema YCF ljestvici (Lokaewmanee i sur., 2010.). Crvenija boja žutanjka može se postići i dodavanjem ekstrakta kadifice te paprike (Lokaewmanee i sur., 2010.). Paprika je izvor crvenih ksantofila, dok je kadifica dobar izvor žutih karotenoida, što

omogućuje kombinirano poboljšanje boje žutanjka iz prirodnih izvora i postizanje željenog intenziteta žute i crvene nijanse.

Međutim, boja žutanjka nije nužno odraz nutritivne vrijednosti jer intenzivnija boja ne znači nužno viši sadržaj karotenoida. Ako se u hranidbi koriste karotenoidi poput luteina i zeaksantina, intenzitet boje žutanjaka je pokazatelj sadržaja karotenoida u žutanjku. Primjerice, prema istraživanju Grčević i sur. (2019.), viši intenzitet boje žutanjka se postiže dodatkom većeg sadržaja luteina u potpune krmne smjese (250 mg/kg) u odnosu na niži sadržaj luteina. Štoviše, zabilježen je i veći intenzitet boje žutanjka u skladištenim jajima za razliku od svježih zbog antioksidacijskih svojstva luteina. S druge strane, viši intenzitet boje žutanjka (viša vrijednost na YCF skali) se može postići dodatkom malog udjela crvenih pigmenata u hranu nesilica i pri tome boja žutanjka ne upućuje na sadržaja karotenoida žutanjaka (Kljak i sur., 2021).



Slika 2.9.1. Žutanjci jaja proizvedeni s različitim sadržajem i kombinacijama žutih i crvenih karotenoida u hrani nesilica (gore lijevo - bez karotenoida; dolje lijevo - žuti i crveni karotenoidi; dolje desno - žuti karotenoidi; gore desno - crveni karotenoidi).

Izvor: Grashorn 2016.



Slika 2.9.2. Yolck Colour Fan (YCF) lepeza boje žutanjka

Izvor: <https://www.dsm.com/anh/products-and-services/tools/yolckfan.html#> - pristup 07.09.2024.

Osim što prirodni ksantofili u hranidbi nesilica doprinose postizanju optimalne boje žutanjka, posjeduju i antioksidacijska svojstva (Rezaei i sur., 2019.). Na kvalitetu jaja više nije

moguće utjecati nakon što je jaje položeno, no moguće je poduzeti preventivne mjere u očuvanju kvalitete jaja i produljiti rok trajanja. Svježina jaja opada nakon nesenja te ovisi o vremenu i temperaturi skladištenja. Tijekom skladištenja dolazi do smanjenja bjelanjka, porasta pH, slabljenja i rastezanja vitelinske membrane, što uzrokuje povećanje tekućeg dijela žutanjka, promjene u strukturi bjelančevina i gubitak vitamina B1 (Trpčić i sur., 2010.). Jedan od najvažnijih pokazatelja kvalitete jaja je stabilnost lipida u žutanjku prema oksidaciji tijekom skladištenja. Upravo zbog masnih kiselina koje su podložne oksidaciji je poželjno povećati sadržaj antioksidansa poput karotenoida u potpunim krmnim smjesama za nesilice. Karotenoidi kao prirodni antioksidansi inhibiraju oksidacijske procese i ograničavaju oksidacijske produkte u sustavima životinja i hrane (Dansou i sur. 2023.). Oksidacija lipida utječe na hranjivu vrijednost, okus i aromu te se proizvode toksični spojevi. Glavni produkt razgradnje lipidnih peroksida je malondialdehid (MDA), mutagenih i kancerogenih svojstava, koji se može koristiti kao indikator za procjenu stupnja oksidacije lipida (Rezaei i sur., 2019.). Uobičajena jednostavna i brza metoda za procjenu oksidacije lipida u hrani bogatoj masnim kiselinama je određivanje spojeva koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS, eng. thiobarbituric acid reactive substance), koji kvantificira razinu MDA nastalog tijekom oksidacije polinezasićenih masnih kiselina (Faitarone i sur., 2016.). Hrana pogodna za konzumaciju trebala bi imati vrijednosti oksidacije lipida ispod 3 mg MDA/kg uz gornju granicu od 7-8 mg MDA/kg (Faitarone i sur., 2016.). Faitarone i sur. (2016.) navode da, kada se jaja skladište na sobnoj temperaturi, njihov rok trajanja iznosi između 4-15 dana nakon nesenja, bez pogoršanja unutarnje kvalitete. Međutim, uočen je gubitak kvalitete žutanjka uzrokovan progresivnom oksidacijom lipida tijekom do 14 dana skladištenja, te su zaključili da skladištenje jaja na sobnoj temperaturi ne očuva unutarnju kvalitetu. Prema istraživanju Botsoglou i sur. (2012.), prirodni antioksidansi, poput najaktivnijeg oblika vitamina E, α -tokoferola, značajno poboljšavaju oksidacijsku stabilnost jaja. Vitamin E u sadržaju od 60 ili 120 mg/kg hrane rezultira smanjenjem TBARS vrijednosti u žutanjcima jaja tijekom skladištenja na +4 °C (Kralik i Jelić, 2017.). Isto tako, prema istraživanju Skřivan i sur. (2016.), dodavanje luteina (250 mg/kg) i *Chlorelle* (12,5 g/kg) u potpune krmene smjese za nesilice je značajno povećalo sadržaj luteina i zeaksantina u žutanjcima, što je rezultiralo boljom oksidacijskom stabilnošću lipida u svježim jajima i jajima skladištenim 28 dana.

3. Materijali i metode rada

Svi postupci vezani uz držanje, uzorkovanje i provođenje analiza na nesilicama tijekom eksperimenta bili su u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (OG 102/17) i Uredbom o zaštiti životinja korištenih u znanstvene svrhe (OG 55/13), a odobreni su od strane 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 Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nesilice starosti od 18 tjedana, zaprimljene su s peradarske farme Nujić Marko d.o.o. iz Ribnice te su prebačene u objekt 30. kolovoza 2023. Istraživanje je započelo 4. ožujka 2024. godine kada su nesilice imale 44 tjedna, a završeno je 7. travnja 2024. godine. Dva tjedna prije početka istraživanja, nesilice su prošle pripremni period tijekom koje su bile hranjene potpunom krmnom smjesom za kokoši nesilice bez dodatka pigmenata, kako bi se očistio organizam od rezervi karotenoida iz prethodne hrane.

3.1. Ekstrakcija i inkapsulacija praha cvijeta kadifice (*Tagetes erecta* L.) kalcijevim alginatom

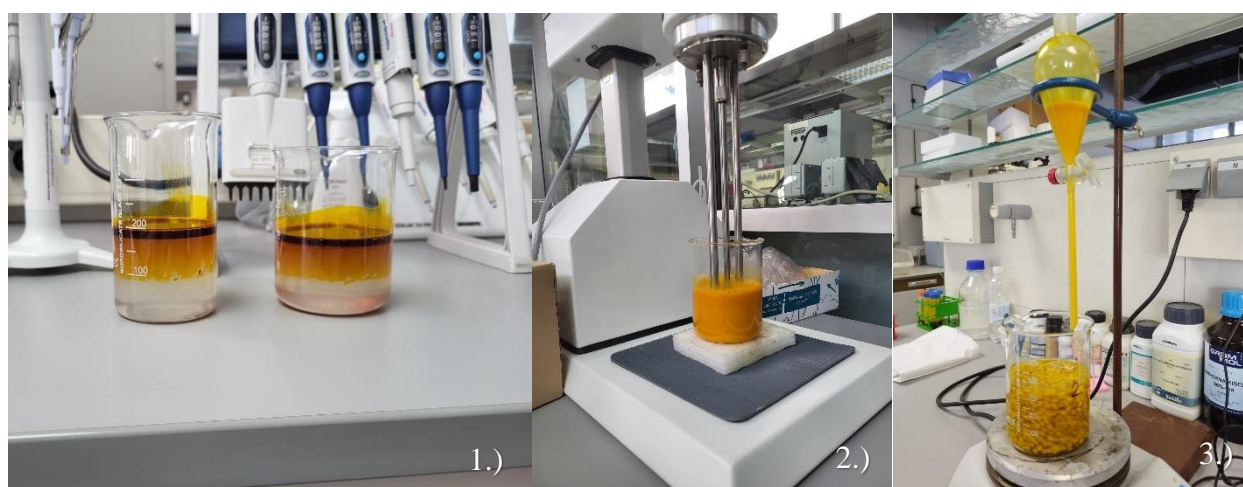
Prah cvijeta kadifice (*Tagetes erecta* L.) pribavljen je od tvrtke TRAKO-AGROLUDBREG d.o.o. (V. Bukovec, Hrvatska). Ekstrakcija karotenoida provedena je acetonom u Soxhlet ekstraktoru (SoxTherm 416, Gerhardt, Njemačka). Dobiveni suhi ekstrakt otopljen je u suncokretovom ulju, pri čemu je ekstrakt 20 g praha kadifice (jedna serija ekstrakcije) otopljen u 70 mL ulja. Ukupni sadržaj karotenoida u ulju određen spektrofotometrijski iznosio je 1,40 mg/mL. Slika 3.1.1. prikazuje shematski proces ekstrakcije praha cvijeta kadifice.



Slika 3.1.1. Shematski prikaz procesa ekstrakcije sljedećim redoslijedom: 1.) prah cvijeta kadifice; 2.) ekstrakcija u Soxhlet ekstraktoru; 3.) ekstrakt kadifice nakon uparavanja etanola; 4.) ekstrakt otopljen u suncokretovom ulju

Mikročestice ispunjene karotenoidima pripremljene su metodom ionskog geliranja pri sobnoj temperaturi, pri čemu je 70 mL uljnog ekstrakta (uljna komponenta) dodano u 150 mL

2%-tne otopine natrijevog alginata (vodena komponenta). Zbog ne miješanja uljne i vodene komponente, emulzija je pripravljena uz pomoć laboratorijskog homogenizatora (Solverson L5M-A, SAD) na maksimalnoj brzini od 10000 rpm tijekom 10 minuta, kako bi se izbjeglo zagrijavanje emulzije (Juric i sur. 2021.). Nakon toga, emulzija je kap po kap dodavana u 200 mL 2%-tne otopine kalcijevog klorida s pomoću lijevka za dokapavanje, uz stalno miješanje na magnetskoj miješalici (IKA topolino, SAD) tijekom 30 minuta. Ovim postupkom izvršeno je ionsko geliranje i formiranje mikročestica kalcijevog alginata – mikro kapsula ispunjenih karotenoidnim ekstraktima (Juric i sur., 2021). Slika 3.1.2. prikazuje miješanje uljne i vodene komponente, pripremu emulzije na homogenizatoru te dodavanje emulzije u 2%-tnu otopinu kalcijevog klorida. Nakon inkapsulacije, mikrokapsule su filtrirane, isprane destiliranom vodom i sušene na zraku u zatamnjenu prostoru tijekom 24 sata.



Slika 3.1.2. 1.) Uljni ekstrakt dodan u 2%-tnu otopinu natrijevog alginata; 2.) priprema emulzije pomoću homogenizatora; 3.) dodavanje emulzije pomoću lijevka za dokapavanje u 2%-tnu otopinu kalcijevog klorida

Karotenoidni profil nastalih mikrokapsula analiziran je HPLC metodom, pri čemu je određen sljedeći sadržaj karotenoida: 553,2 $\mu\text{g/g}$ luteina, 105,1 $\mu\text{g/g}$ zeaksantina, 3,4 $\mu\text{g/g}$ α -kriptoksantina, 2,8 $\mu\text{g/g}$ β -kriptoksantina i 2,9 $\mu\text{g/g}$ β -karotena. Slika 3.1.3. prikazuje sušenje na zraku nastalih mokrih mikrokapsula te suhe mikrokapsule kojima je određen karotenoidni profil.



Slika 3.1.3. Sušenje mokrih mikrokapsula na zraku (lijevo); suhe mikrokapsule (desno)

3.2. Smještaj i držanje kokoši nesilica

Postupkom randomizacije, 45 kokoši nesilica pasmine Lohmann Brown smještene su u 15 obogaćenih kaveza, s po tri jedinke u svakom kavezu. Kavezi su bili postavljeni u jednom slobodnostojećem baterijskom sustavu s ukupno 24 kaveza. Dimenzije svakog kaveza iznosile su 60 cm visine, s površinom od 60×64 cm, što je svakoj nesilici omogućilo prostor od $1\,280$ cm². Unutar kaveza nalazile su se dvije nipl pojilice i drvene prečke (15 cm/nesilici), dok su s vanjske strane prednjeg dijela kaveza bile postavljene pocinčane žljebaste hranilice (12 cm/nesilici). Ispod kaveza, nalazile su se postavljene limene posude za prikupljanje izmeta, dok je ispod hranilica bio žlijeb za sakupljanje jaja. Temperatura u pokusnom objektu je iznosila 18 ± 2 °C, a svjetlosni režim se sačinjavao od 16 sati svjetla i 8 sati tame. Uvjeti temperature i vlage održavani su automatiziranim ventilacijskim sustavom, uz pomoć električnih radijatora za dodatno dogrijavanje prostora u slučaju potrebe.

3.3. Hranidba i hranidbeni tretmani

Prije početka istraživanja, proveden je pripremni period u trajanju od dva tjedna, od 19. veljače do 3. ožujka 2024. godine. Svrha pripremnog perioda bila je pripremiti organizam nesilica za istraživanje i očistiti probavni trakt od rezervi karotenoida nastalih iz hrane koju su konzumirale prije početka pokusa. Tijekom pripremnog perioda, nesilice su hranjene standardnom potpuno krmnom smjesom za kokoši nesilice bez dodataka pigmenta. Smjese su bile sastavljene tako da zadovoljavaju potrebe komercijalnih Lohmann Brown nesilica u početnoj fazi proizvodnje jaja prema National Research Council (NRC, 1994.) i uputama Lohmann Breeders GmbH (2022.). Potpuna krmna smjesa za nesilice je pripremljena u dovoljnim količinama za cijelo trajanje pokusa, kako ne bi bilo razlika u rezultatima zbog promjena sastojka smjese, te je proizvedena u tvornici stočne hrane Kušić promet d.o.o. iz Sv. Ivana Zeline. Sirovinski sastav potpune krmne smjese i vitaminsko-mineralnog premiksa prikazani su u tablicama 3.3.1. i 3.3.2.

Tablica 3.3.1. Sirovinski sastav potpune krmne smjese za kokoši nesilice

Krmiva	Udjel
	%
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 3.3.2. Vitamini i minerali premiksa dodani u 1 kg potpune krmne smjese za kokoši nesilice

Vitamini	Količina	Mikroelementi-Biopleksi iz TNT	
		Layer Pack	mg
Vitamin A	10000 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		
Nikotin amid	30 mg		
Folna kiselina	0.5 mg		
Biotin	50 mg		
Kolin	400 mg		

Pokusne smjese za hranidbene tretmane pripremljene su umješavanjem pigmenata u standardnu potpunu krmnu smjesu za kokoši nesilice. U smjesu za pozitivnu kontrolu (T0) dodan je pigment Carophyll red (DSM-Firmenich AG, Švicarska) kako bi smjesa sadržavala 8 mg/kg kantaksantina, dok su u smjesu tretmana T1 i T2 dodani različiti udjeli inkapsuliranih karotenoida. U T1 smjesu ručno je umiješano 0,5% mikrokapsula, dok je u T2 smjesu umiješano 1% (Slika 3.3.1.). Pojedinačni i ukupni sadržaj karotenoida u smjesi određen je HPLC metodom, a vidljiv je na tablici 3.3.3. U T1 smjesi ukupan sadržaj karotenoida je iznosio 45,89 µg/g ST, dok je u T2 iznosio 78,10 µg/g ST.



Slika 3.3.1. Ručno umješavanje mikrokapsula u potpunu krmnu smjesu za kokoši nesilice

Pet kaveza je postupkom randomizacije (Slika 3.3.2.) dodijeljeno svakom od tri tretmana (T0, T1 i T2) te je pokus započeo 4. ožujka 2024. Tijekom istraživanja, nesilice su imale neograničen pristup hrani i vodi. S namjerom da se smanji rasipanje smjese, izračunato je da je svakoj nesilici potrebno 125 g smjese dnevno. Prema tome, hranilice su tri puta tjedno (utorkom, četvrtkom, subotom) punjene sa 700 g smjese, dok se ostale dane (ponedjeljkom) dodavalo 300 g po potrebi.

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	76 –

Slika 3.3.2. Raspodjela kaveza na hranidbene tretmane postupkom randomizacije (T0 – pozitivna kontrola, T1 - dodatak 0,5% i T2 – dodatak 1% mikrokapsula)

Tablica 3.3.3. Pojedinačni i ukupni sadržaj karotenoida u potpunim krmnim smjesama za nesilice korištene u pokusu

tretman	Dodatak mikrokapsula %	lutein	zeaksantin	kantaksantin	α- kriptoksantin	β- kriptoksantin	α- karoten	β- karoten	ukupni karotenoidi
					μg/g ST				
kontrola	/	3,60	5,34	8,41	0,47	1,03	0,12	0,54	19,52
T1	0,5	31,33	11,83	nd	0,62	1,23	0,16	0,72	45,89
T2	1	58,79	16,33	nd	0,80	1,23	0,13	0,82	78,10

ST – suha tvar; nd – nije detektiran.

3.4. Sakupljanje uzoraka

Jaja za analizu kvalitete jaja sakupljena su 20., 21. i 22. dana pokusa. Iz svakog kaveza je uzeto jedno jaje te su sva jaja raspoređena prema tretmanima i kavezima (Slika 3.4.1.). Nakon provedene analize kvalitete jaja, odvojeni su žutanjci koji su korišteni za određivanje oksidacijske stabilnosti žutanjka u induciranim uvjetima. Jaja sakupljena 19. i 20. dana korištena su za određivanje oksidacijske stabilnosti žutanjka pri različitim uvjetima skladištenja jaja.



Slika 3.4.1. Sakupljena jaja označena prema kavezima

3.5. Određivanje parametara kvalitete jaja

Parametri kvalitete jaja određeni su u svježim jajima neposredno nakon sakupljanja. Svakom jajetu izmjerena je visina i širina digitalnom pomičnom mjerkom. Upotrebom instrumenta Digital Egg Tester (DET6000, NABEL Co., Ltd., Japan), u razbijenim jajima izmjerena je visina bjelanjaka te pripadajuće Haughove jedinice, boja žutanjka prema Yolk Color Fan skali, te čvrstoća i debljina ljuske. U istim jajima je zatim izvagana masa ljuske, žutanjka i bjelanjka. Slika 3.5.1. prikazuje uređaj Digital Egg Tester i određivanje debljine ljuske.



Slika 3.5.1. Instrumentalno određivanje kvalitete jaja pomoću Digital Egg Testera (lijevo); određivanje debljine ljuske jaja digitalnom pomičnom mjerkom (desno)

3.6. Određivanje oksidacijske stabilnosti žutanjka

Kako bi se odredio utjecaj inkapsuliranih karotenoida kalcijevim alginatom na oksidacijsku stabilnost žutanjka, TBARS metodom je ispitan utjecaj u uvjetima oksidacije inducirane željezom te u uvjetima skladištenja jaja pri različitim temperaturama. Oksidacijska stabilnost jaja određena je mjerenjem sadržaja MDA u žutanjku pri čemu viši sadržaj MDA ukazuje na lošiju oksidacijsku stabilnost.

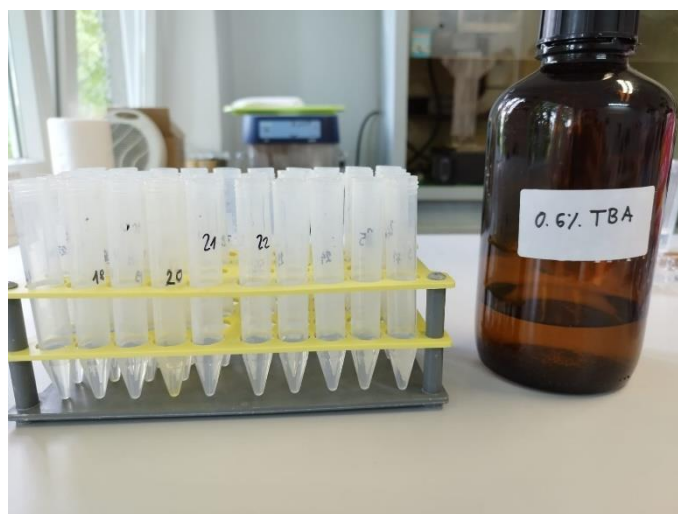
3.6.1. TBARS u različitim uvjetima skladištenja

Različiti uvjeti skladištenja jaja uključivali su utjecaj temperature na oksidacijsku stabilnost žutanjka u usporedbi sa svježim jajima. Za svaki kavez svakog hranidbenog tretman, nasumično su izabrana su četiri jaja od jaja sakupljenih 19. i 20. dana pokusa od kojih je je jedno jaje analizirano odmah, a ostala su postavljena na različite uvjete skladištenja. Jaja su skladištena na 4 °C, sobnoj temperaturi i 30 °C tijekom tri tjedna. Nakon razbijanja jaja, žutanjak je odvojen od bjelanjka. Žutanjci su dodatno odvojeni od bjelanjka valjanjem na papirnatom ubrusu, nakon čega su prebačeni u plastičnu čašu, a sadržaj MDA u žutanjcima je određene metodom prema Botsoglou i sur. (1994.).

Svaki uzorak žutanjka izvagan (2 g) je u duplikatu u Falcon epruvete od 50 mL. U sadržaj svake epruvete je zatim dodano 8 mL 5%-tne otopine trikloroctene kiseline (TCA) i 5 mL heksana koji sadrži 0,8% butilhidrokisoluena (BHT). Epruvete su zatim vorteksirane i centrifugirane (Centric 322A, Tehnica, Slovenija) na 4000 rpm 5 minuta. Nakon centrifugiranja, gornji heksanski sloj je odvojen kapaljkom, dok je donji vodeni sloj s produktima oksidacije profiltriran kroz filter papir plave vrpce. Nakon što su svi filtrati sakupljeni u epruvete, korišteni su za detekciju MDA.

Ishodna otopina standarda pripravljena je inkubiranjem pri vrenju 73,2 mg 1,13,3-tetrametoksipropana (TMP) u 10 mL 0,1 mol/L otopine HCl tijekom 5 minuta. Nakon hlađenja, sadržaj epruvete je kvantitativno prebačen u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjen destiliranom vodom. Koncentracija tako pripravljene ishodne otopine MDA iznosila je 328,87 µg/mL. Radna otopina standarda pripravljena je razrjeđenjem 1 mL ishodne otopine u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL. Zatim su pripravljena dodatna razrjeđenja za 6 točaka baždarnih pravaca u rasponu od 70 do 420 ng/mL koja su korištena prilikom detekcije sadržaja MDA u alikvotima uzoraka.

Alikvoti od 2,5 mL filtrata otpipetirani su u duplikatu u Falcom epruvete od 15 mL. Istovremeno su uz uzorke, pripravljene i epruvete za slijepu probu (2,5 mL otopine TCA) i za 6 točaka baždarnog pravca. Nakon toga, u sve epruvete je otpipetiran 1,5 mL 0,6% otopine tiobarbituratne kiseline (TBA; slika 3.6.2.1.), te su inkubirane 30 minuta na 90 °C. Nakon hlađenja, konačan sadržaj produkata oksidacije određen je spektrofotometrijski (Helios γ, Thermo Electron Corporation, Velika Britanija), a apsorpcija je mjerena pri valnoj duljini od 532 nm (program TBARS).



Slika 3.6.2.1. Falcon epruvete sa sadržajem alikvota od 2,5 mL filtrata + 1,5 mL 0,6 % otopine TBA prilikom provođenja TBARS metode

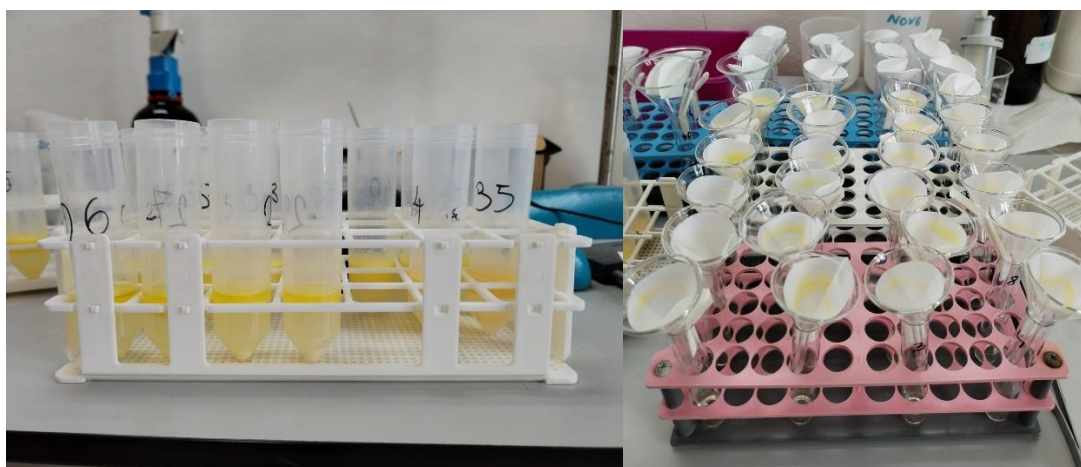
3.6.2. TBARS u uvjetima oksidacije inducirane željezom

Po jedno jaje iz svakog kaveza istog tretmana sakupljena 20., 21. i 22. dana pokusa spojena kako bi predstavljali jedan uzorak kaveza u ovoj analizi. Nakon razbijanja jaja, žutanjak je odvojen od bjelanjka. Žutanjci su dodatno odvojeni od bjelanjka valjanjem na papirnatom ubrusu, nakon čega su bili spojeni u plastične čaše označene prema brojevima kaveza. Žutanjci istog kaveza istog dana su spojeni u istoj čaši i pomiješani. Analiza je provedena prema metodi opisanoj u radu Botsoglou i sur. (2012).

Prije početka same analize, pripravljene su 1,15%-tna otopina KCl i TRIS pufer, pH 7,4. TRIS pufer je pripremljen otopljenjem 4,8456 g TRIS i 4,6428 maleinske kiseline u 450 mL vode, a nakon namještanja pH na 7,4 otopinama natrijeve lužine (28 % i 1 mol/L), smjesa je

kvantitativno prebačena u odmjernu tikvicu od 500 mL i nadopunjen destiliranom vodom. Svježe na sam dana analize dodatno su pripremljene 5 mmol/L otopina $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ i 2 mmol/L otopina askorbinske kiseline.

Analiza je započela pripremom ishodne emulzije žutanjka svakog kaveza. 9 g uzorka žutanjka izvagano je u paraleli u Falcon epruvete od 50 mL. U svaku epruvetu dodan je 21 mL 1,15%-then otopine KCl te je smjesa homogenizirana. Alikvot od 2,5 mL ishodne emulzije otpipetiran je u nove Falcon epruvete od 50 mL te je u svaku dodano 12,5 mL TRIS pufera (pH 7,4), 5 mL otopine $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ i 5 mL otopine askorbinske kiseline. Ovako pripremljene radne emulzije korištene su za indukciju oksidacije željezom tijekom inkubacije na 37 °C. Po 2 mL radne emulzije uzorkovano je neposredno nakon pripreme te nakon 100 i 200 min inkubacije. Detekcija MDA u uzorkovanim alikvotima provedena je prema istom postupku opisanom u poglavlju 3.6.1. Pri tome je zabilježena masa uzorkovanog alikvota, a pojedini koraci tijekom postupka detekcije prikazani su slikama 3.6.1.1. i 3.6.1.2. Sadržaj MDA u radnim emulzijama istog uzorka korišten je za izradu grafa ovisnosti sadržaja MDA o vremenu inkubiranja i izračunu nagiba pravca kao pokazatelja intenziteta lipidne oksidacije.



Slika 3.6.1.1. Gornji heksanski sloj odvojen od donjeg s produktima oksidacije (lijevo); filtriranje donjeg sloja s produktima oksidacije preko filter papira (desno)



Slika 3.6.1.2. Sakupljanje filtrata u epruvete (lijevo); svi sakupljeni filtrati u epruvetama spremni za daljnju detekciju (desno)

3.7. Statistička obrada podataka

Provedeno istraživanje na 15 kaveza (3 tretmana \times 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. Dobiveni rezultati kvalitete jaja obrađeni su kao ponovljena mjerenja korištenjem MIXED procedure softverskog paketa SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, SAD) s tretmanom kao fiksnim utjecajem. Dobiveni rezultati oksidacijske stabilnosti žutanjka obrađeni su analizom varijance korištenjem MIXED procedure istog softverskog paketa. Razlike su smatrane značajnima ako je $P \leq 0,05$.

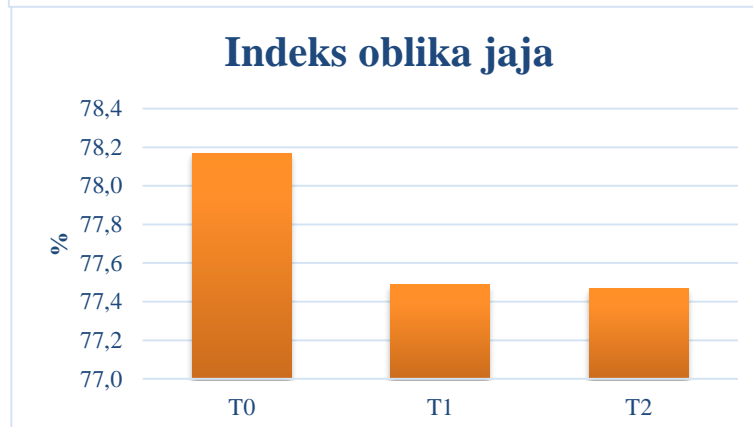
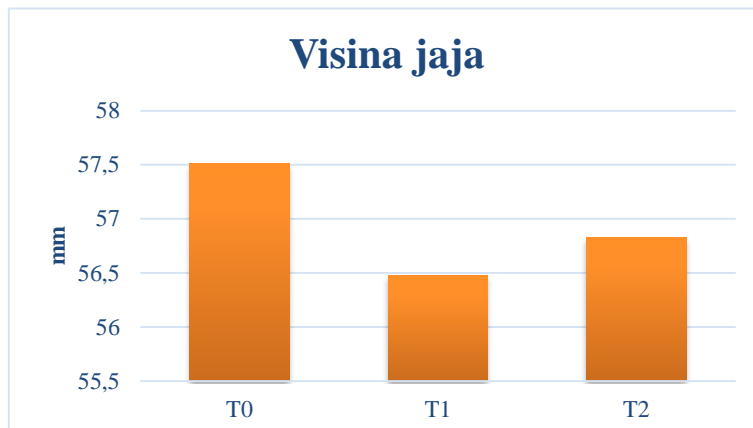
4. Rezultati i rasprava

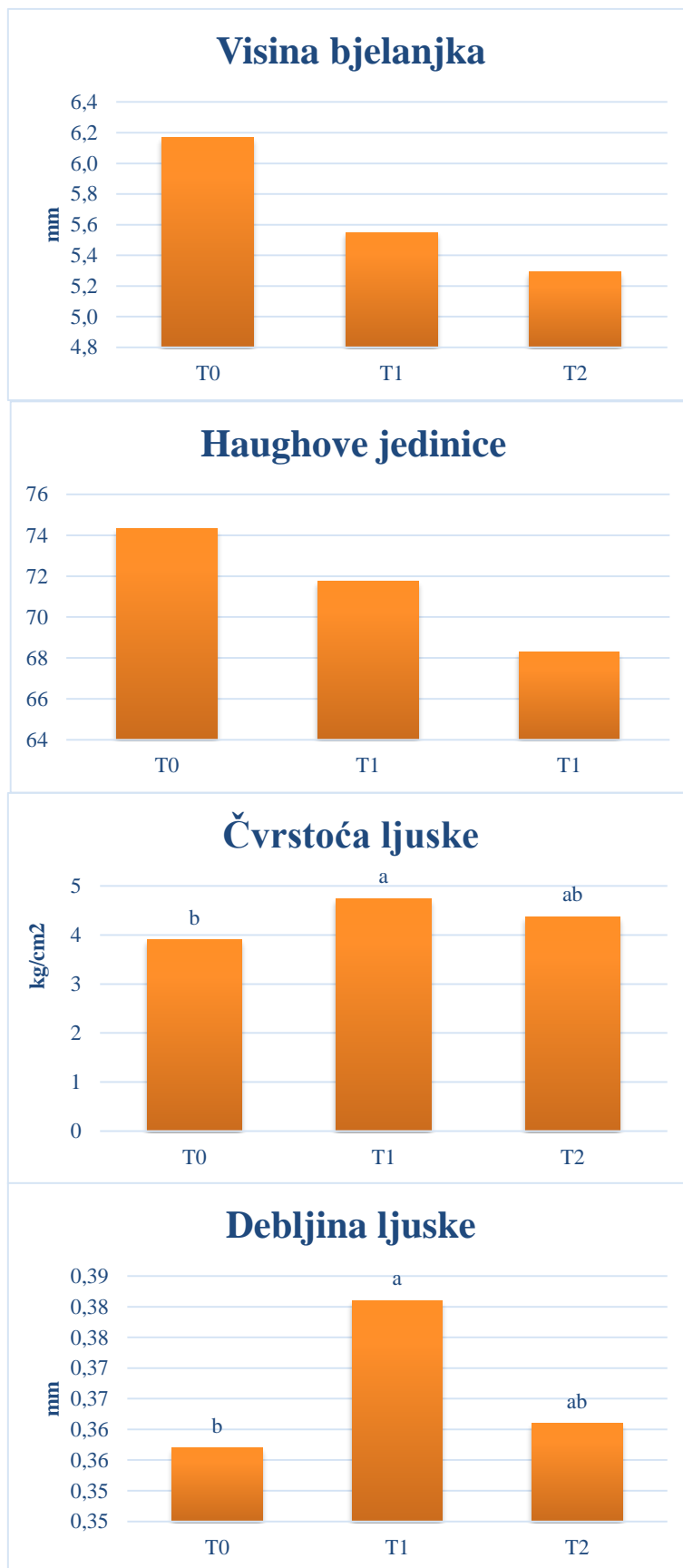
4.1. Parametri kvalitete jaja

Prilikom određivanja kvalitete jaja određeni su sljedeći parametri: visina jaja, širina jaja, masa jaja, indeks oblika, visina bjelanjka, boja žutanjka prema YCF lepezi, Haughove jedinice, čvrstoća i debljina ljuske. Unutarnji i vanjski pokazatelji kvalitete jaja prikazani su na grafikonu 4.1.1. U ovom istraživanju utvrđen je minimalan utjecaj dodatak mikrokapsula ekstrakta kadifice na parametre kvalitete jaja. Visina jaja, indeks oblika, masa žutanjka i ljuske, visina bjelanjka i Haughove jedinice su bili slični u jajima svih istraživanih hranidbenih tretmana. Istraživani hranidbeni tretmani su se razlikovali u širini jaja, masi bjelanjka i YCF boji i čvrstoći ljuske, a utvrđena je i tendencija razlike u debljini ljuske.

Rezultati visine jaja ovog istraživanja u skladu su s istraživanjem Grčević i sur. (2019.) u kojem je korišten ekstrakt cvijeta kadifice u hranidbi kokoši nesilica (hibrid Tetra SL starosti 31 tjedan) u sadržaju od 1 i 2 g/kg. U navedenom istraživanju, rezultati visine jaja, indeks oblika i širina jaja su bili slični u svim ispitivanim tretmanima. Međutim, u ovom istraživanju jaja nesilica hranjenih potpunim krmnim smjesama s dodatkom mikrokapsula je bila manja od jaja nesilica hranjenih kontrolnom smjesom (T0 – 44,94 mm, T1 – 43,75 mm, T2 – 44,02 mm). S obzirom na prethodne rezultate da dodatak ekstrakta kadifice ne utječe na dimenzije jaja (Grčević i sur., 2019), moguće je da je povećanje udjela suncokretovog ulja zbog većeg dodataka mikrokapsula (70 mL uljnog ekstrakta dodano u 150 mL 2%-tne otopine natrijevog alginata) utjecalo negativno na širinu jaja u ovom istraživanju.

Hanusová i sur. (2015.) su uspoređivali parametre kvalitete jaja između dviju različitih pasmina nesilica (Oravka i Rhode Island Red) hranjenih standardnom potpunom krmnom smjesom za nesilice, te su utvrdili značajne razlike u visini i širini jaja, ali ne i u indeksu oblika. Navedeni autori navode kako čimbenici poput pasmine i starosti nesilica uz hranidbu značajno utječu na dužinu i širinu jaja. Štoviše, mnogi istraživači izvještavaju o korelaciji širine ili visine jajeta s indeksom oblika (Duman i sur., 2016.). Mikrokapsule ekstrakta cvijeta kadifice u ovom istraživanju nisu imale značajan utjecaj na indeks oblika jaja (T0 – 78,17 %, T1 – 77,49 % i T2 – 77,47 %), dok su Radwan i sur. (2008.) u svom istraživanju zabilježili numerički porast postotka indeksa oblika jaja, dodavanjem 200 mg vitamina E/kg hrane ili 0,5-1,0% timijana, ružmarina, origana ili kurkume u hranidbu kokoši. U navedenom istraživanju, najveće numeričke vrijednosti zabilježene za indeks oblika jaja bile su kod nesilica hranjenih smjesama s dodatkom 1% kurkume (*Curcuma Longa*) (75,58% naspram 73,71% kod kontrolne skupine). Rezultate svog istraživanja povezali su s dodatkom esencijalnih ulja (200 mg) ili 0,5-1% timijana ružmarina, origana i kurkume s povećanim lučenjem probavnih enzima koji su poboljšali probavljivost i tako utjecali na povećanje indeksa oblika jaja.





Grafikon 4.1.1. Vanjske i unutarnje karakteristike kvalitete jaja istraživanih tretmana
^{a-b} tretmani označeni različitim slovima iznad stupaca pokazuju tendenciju razlike ($P < 0,05$)

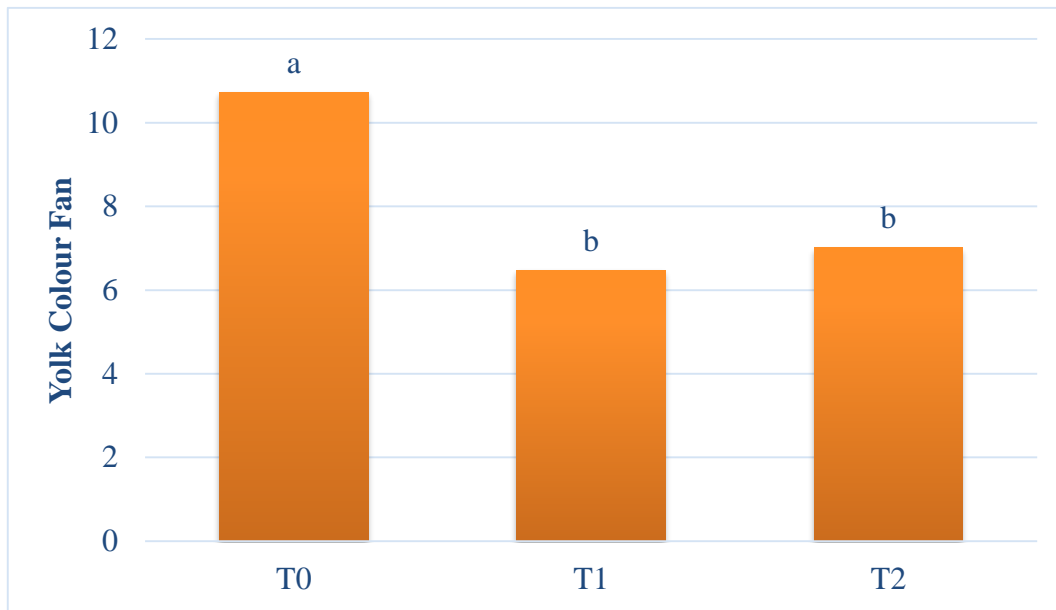
Analizom podataka mase jaja, nisu utvrđene značajne razlike u masi žutanjka ($P = 0,4185$) i masi ljuske ($P = 0,1838$) što je u skladu s ostalim istraživanjima, no utvrđene su razlike u masi bjelanjka ($P = 0,0239$). Najveća vrijednost mase bjelanjka zabilježena je u jajima nesilica hranjenih kontrolnom smjesom (38,61 g), dok su tretmani T1 (34,99 g) i T2 (32,88 g) imali jaja nižih masa bjelanjaka. Prema navedenim vrijednostima, primijećeno je postupno numeričko smanjivanje mase bjelanjka porastom udjela mikrokapsula ekstrakta kadifice. Iako je u ovom istraživanju utvrđena statistička razlika između kontrolne skupine i tretmana s dodatkom mikrokapsula, u dostupnoj literaturi nije zabilježen utjecaj dodatka kadifice ili njenog ekstrakta na masu bjelanjka. S druge strane, u ovome istraživanju nije primijećena značajna razlika ni u masi žutanjka, što bi moglo biti posljedica inkapsulacije uljnog ekstrakta. Prema Gao i sur. (2021.), dodatak 5% ulja repice značajno povećava masu žutanjka jaja te sadržaj DHA i n-3 masnih kiselina. Također, Sangkaew i sur. (2017.) je proveo istraživanje sa suncokretovim uljem visokog sadržaja oleinske kiseline (HOSO) u kojem je istraživana utjecaj različitih razina HOSO na kvalitetu jaja. Zabilježili su značajan porast mase žutanjka tretmana s 3% HOSO (~18,9 g) u usporedbi s kontrolnom grupom s 3% kukuruznog ulja (~19,5 g). Rezultati ovih istraživanja pokazuju kako dodatak ulja u smjese peradi može pozitivno utjecati na masu žutanjka. Međutim, Cherian i sur. (2009.) navode kako je više autora potvrdilo značajno smanjenje mase žutanjka zbog povećanog udjela ulja u hranidbi nesilica.

U ovom istraživanju nije utvrđena značajna razlika u visini bjelanjka i Haughovim jedinicama između ispitivanih tretmana, što upućuje na to da tretmani nisu imali značajan utjecaj na svježinu jaja niti na kvalitetu bjelanjka što je u skladu s ostalim istraživanjima. S druge strane, Chowdhury i sur. (2008.) navode smanjenje vrijednosti Haughovih jedinica kod Shaver 579 nesilica zbog dodataka 40 mg/kg kadifice, 40 g/kg narančine kore i 30 g/kg sintetičkog pigmenta u smjese u usporedbi s kontrolom, što pokazuje da učinci mogu varirati ovisno o količini dodataka i uvjetima istraživanja.

Prilikom određivanja kvalitete ljuske, utvrđeno je da se istraživani tretmani razlikuju u čvrstoći ljuske ($P = 0,0223$) dok je debljina ljudske imala tendenciju biti viša u jajima nesilica hranjenih smjesama s dodatkom mikrokapsula u usporedbi s kontrolnom skupinom. Niže vrijednosti čvrstoće ljuske zabilježene su jajima tretmana T0 (3,90 kg/cm²), dok je tretman T1 imao jaja najviše čvrstoće ljuske (4,74 kg/cm²). Tretman T2 s vrijednošću od 4,37 kg/cm² nalazio se između T0 i T1. Debljina ljuske bila je najveća kod tretmana T1 (0,381 mm), a zatim T2 (0,361 mm), dok je kontroli zabilježena najmanja debljina ljuske (0,357 mm). Uzrok ovih rezultata može biti inkapsulacija ekstrakta kadifice kalcijevim alginatom čime se povećao udio kalcija u smjesama, što objašnjava pozitivan učinak tretmana na debljinu i čvrstoću ljuske, ali zbog rasipanja te probiranja smjesa nesilica tijekom konzumacije, nastale su varijacije u rezultatima. Lokaewmanee i sur. (2010.) potvrdili su u svom istraživanju na nesilicama, kako dodatak od 0,1 % paprike i 0,1% paprike + 0,1 % kadifice u smjesama tretmana, nema značajan utjecaj na debljinu ljuske što je u skladu i s ostalim autorima. Međutim, Oliveira i sur. (2017.) su izvijestili kako je uključivanje ekstrakta kadifice (1 g/kg smjese za nesilice), smanjilo udio ($P < 0,02$) i debljinu ($P < 0,01$) ljuske jaja. Autori su naveli da lutein i zeaksantin, karotenoidi prisutni u ekstraktu kadifice, mogu inhibirati estrogeničku aktivnost u nekoliko tkiva, što vjerojatno objašnjava smanjenje mase i debljine ljuske jaja.

Istraživani tretmani razlikovali su se u boji prema YCF lepezi ($P < 0,001$; grafikon 4.1.2.). Žutanjci jaja nesilica hranjenih kontrolnom smjesom su imali najvišu YCF vrijednost (10,73),

što ukazuje na veći intenzitet boje žutanjka u usporedbi s tretmanima s dodatkom mikrokapsula ekstrakta kadifice u smjese. Tretmani T1 i T2 imaju značajno niže vrijednosti, što ukazuje na manji intenzitet boje žutanjka. Tretman T1 s 0,5 % mikrokapsula ima najnižu zabilježenu vrijednost (6,48), dok T2 s 1 % mikrokapsula ima značajno nižu u odnosu na kontrolu, ali višu vrijednost od T1 zbog većeg udjela inkapsuliranih karotenoida (7,02). Sadržaj ksantofila luteina (553,2 µg/g) i zeaksantina (105,1 µg/g) u mikrokapsulama ekstrakta kadifice te kukuruza (prirodni izvor pigmenata luteina i zeaksantina) u smjesama tretmana, nije značajno utjecao na postizanje željenog intenziteta boje žutanjka. Međutim, rezultati T2 tretmana numerički su viši u odnosu na T1 što upućuje da povećanje sadržaja karotenoida u smjesama ipak dovodi do postupnog, ali nedovoljno izraženog povećanja intenziteta boje žutanjka. Također, Faitarone i sur. (2016.), spominju utjecaj izvora lipida u hranidbi na boju žutanjka nesilica. Boja je bila intenzivnija kada su nesilice bile hranjene s dodatkom suncokretovog ulja u usporedbi s onima koje su hranjene smjesom koja nije sadržavala biljno ulje. U već spomenutom istraživanju Lokaewmanee i sur. (2010.) istraživao se utjecaj dodataka na boju žutanjka. U pokusu su korišteni sljedeći tretmani: kontrolna grupa koja je hranjena osnovnom smjesom od žutog kukuruza, grupa koja je primala dodatak 0,1% paprike te grupa s dodatkom 0,1% paprike i 0,1% kadifice. Rezultati su pokazali da su boje žutanjka u nesilicama grupe s dodatkom paprike i kadifice (12,17) bile značajno intenzivnije u usporedbi s kontrolnom grupom (8,64) i grupom s paprikom (11,47). Nadalje, Hasin i sur. (2006.) su utvrdili da korištenje 4% praha kadifice u smjese nesilica rezultira s jajima s ocjenom boje 11,0, što je blizu hranidbi sa sintetičkim pigmentom od 30 mg/kg (nakon 12 tjedana suplementacije), dok su nesilice hranjene s 4% narančine kore proizvele jaja s ocjenom boje 5,0 tijekom 12 tjedana suplementacije, što upućuje da se kadifica može učinkovitije koristiti za pigmentaciju žutanjka. Međutim, treba imati na umu da su prosječne YCF vrijednosti postignute s prirodnim pigmentima uvijek nešto niže nego sa sintetičkim pigmentima (Rezaei i sur., 2019.). Spasevski i sur. (2017.) su u smjese sa kukuruzom, sojinom sačmom i suncokretovom pogačom dodali različite udjele kadifice i paprike, zamijenivši sintetski pigment s paprikom i cvijetom kadifice kao izvorima prirodnih pigmenata. Dodavanje 1,5% kadifice u hranidbu nesilica nije utjecalo na boju žutanjka određenu prema YCF lepezi. Vrijednosti 7,67 (kontrola bez pigmenata) i 8,60 (1,5% kadifice) prema YCF lepezi ne zadovoljavaju potrošače u većini zemalja Europe i Azije, što znači da kadifica sama u udjelu od 1,5% ne može osigurati boju žutanjka veću od 10 na YCF lepezi, što potrošači tih zemalja zahtijevaju. Dodavanje paprike, bilo samostalno ili u kombinaciji s kadificom, povećalo je sadržaj β-karotena, te vrijednosti crvenosti (a*) i YCF. Optimalna boja žutanjka od 12,56 postignuta je u skupini s dodatkom 1% kadifice + 0,5% paprike, što zadovoljava potrošače u većini europskih zemalja koji preferiraju žuto-narančastu boju žutanjka. Prema prikazanim rezultatima, može se zaključiti da se kadifica i paprika uspješno mogu dodati u hranidbu nesilica kao alternativni izvori pigmenata za intenziviranje boje žutanjka, što je u skladu i s ostalim autorima (Spasevski i sur., 2017.).



Grafikon 4.1.2. Boja žutanjka istraživanih tretmana prema Yolk Colour Fan lepezi
^{a-b} tretmani označeni različitim slovima iznad stupaca značajno se razlikuju ($P < 0,05$)

4.2. Oksidacijska stabilnost

Oksidacija lipida je biokemijski proces u kojem slobodni radikali preuzimaju elektrone iz masnih kiselina u staničnim membranama, čime ih oštećuju. U nedostatku antioksidansa, razvija se lančana lipidna oksidacija koja prolazi kroz tri faze: inicijaciju, propagaciju i terminaciju (Kralik i sur., 2024.). Sprječavanje ove pojave postiže se djelovanjem antioksidansa u fazi inicijacije. Lipidna oksidacija predstavlja veliki problem u prehrambenoj industriji i proizvodnji hrane koja sadrži lipide i vitamine topive u mastima, utječući na rok trajanja i nutritivnu vrijednost takvih proizvoda (Kralik i sur., 2024.). Žutanjci jaja sadrže visok udio masti zbog koje su podložni lipidnoj oksidaciji, no nesilice imaju sposobnost pohranjivanja karotenoida antioksidacijskih svojstava iz hrane u žutanjke (Kljak i sur., 2021.). Prilikom određivanja utjecaja mikrokapsula ekstrakta kadifice na doseg lipidne oksidacije, ispitan je utjecaj skladištenja jaja pri različitim uvjetima (na 4 °C, sobnoj temperaturi i 30 °C) tijekom tri tjedna i utjecaj promotora oksidacije (željeza) na pripremljene emulzije žutanjka.

4.2.1. Oksidacijska stabilnost jaja tijekom skladištenja

Prilikom utvrđivanja utjecaja mikrokapsula ekstrakta kadifice na oksidacijsku stabilnost jaja tijekom skladištenja, koristila se TBARS metoda (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) za spektrofotometrijsko mjerenje sadržaja malondialdehida (MDA).

Prema rezultatima prikazanim u tablici 4.2.1.1, tretmani s dodatkom mikrokapsula ekstrakta kadifice su imale viši sadržaj MDA nulti dan ($P = 0,0144$; T1 – 31,92 ng/g i T2 – 31,60 ng/g, u usporedbi s kontrolnim tretmanom (21,77 ng/g) Rezultati upućuju na to da su tretmani s dodatkom inkapsuliranog ekstrakta kadifice u početku skladištenja rezultirali većom razinom

oksidacijskih proizvoda, što može biti povezano s interakcijom mikrokapsula s lipidima u žutanjku i dodatkom ulja tijekom procesa inkapsulacije.

Tablica 4.2.1.1. Sadržaja malondialdehida žutanjaka jaja hranidbenih tretmana tijekom skladištenja jaja na različitim temperaturama tri tjedna

tretman	dodatak mikrokapsula	skladištenje			
		0. dan	4 °C	sobna temperatura	30 °C
		ng/g			
T0	/	21,77b	28,08	27,56	41,83
T1	0,5%	31,92a	23,69	32,26	39,30
T2	1%	31,60a	23,16	27,82	37,10
P		0,0144	0,6368	0,3209	0,7953

^{a-b} vrijednosti unutar stupca označene različitim slovima značajno se razlikuju ($P < 0,05$)

Prilikom skladištenja jaja na 4 °C, zabilježena je numerički viša razina MDA (28,08 ng/g) žutanjcima kontrolne tretmane, u odnosu na tretmane T1 i T2 s dodatkom mikrokapsula ekstrakta kadifice. Tretmani T1 (23,69 ng/g) i T2 (23,16 ng/g) pokazali su niže razine MDA, što ukazuje na poboljšanu oksidacijsku stabilnost žutanjka. Iako razlike nisu bile statistički značajne ($P = 0,6368$) između tretmana pri 4 °C skladištenja, u tretmanima T1 i T2 je primijećena sklonost smanjenja oksidacijskih produkata. S druge strane, tijekom skladištenja jaja na sobnoj temperaturi, najviša razina oksidacije primijećena je kod tretmana T1 (32,26 ng MDA/g) i T2 (27,82 ng MDA/g) u usporedbi s kontrolom (27,56 ng MDA/g), no razlike isto nisu bile statistički značajne ($P = 0,3209$). Ovi rezultati ukazuju na mogući potencijal mikrokapsula ekstrakta kadifice u očuvanju oksidacijske stabilnosti pri nižim temperaturama skladištenja, dok je utjecaj pri sobnoj temperaturi manje izražen. Međutim, pri skladištenju na 30 °C, kontrolni tretman je imao najvišu vrijednost MDA (41,83 ng/g), dok su tretmani T1 (39,30 ng/g) i T2 (37,10 ng/g) imali nešto niže vrijednosti, ali razlike nisu bile statistički značajne ($P = 0,7953$). Dakle, nakon 3 tjedna skladištenja jaja na različitim temperaturama (4 °C, sobna temperatura i 30 °C), nije zabilježena statistički značajna razlika između tretmana ($P > 0,05$). Ovi podaci ukazuju da su svi tretmani, uključujući kontrolnu skupinu, pokazali sličnu oksidacijsku stabilnost tijekom skladištenja. Štoviše, tijekom skladištenja tri tjedna na različitim uvjetima, čak i na najvišoj temperaturi (30 °C), nema razlike u tretmanima i žutanjci svih jaja su oksidacijski stabilni. Važno je napomenuti kako je dodatak mikrokapsula u hranidbi nesilica potencijalno povećao unos luetina i zeaksantina, pigmenta antioksidacijskog djelovanja koji imaju ulogu u smanjenju oksidacijskog stresa.

Slični rezultati zabilježeni su u već spomenutom radu Grčević i sur. (2019.), u kojemu se sadržaja MDA u žutanjcima povećavao tijekom skladištenja jaja, a sadržaj MDA u žutanjcima pokusnih skupina bile su nešto niže nakon 28 dana skladištenja u usporedbi s kontrolnom skupinom, no te razlike nisu bile statistički značajne. U njihovom radu najniži sadržaj MDA u

svježim jajima zabilježena je u skupini s 2 g ekstrakta kadifice/kg smjese (545 ng/g), dok je u skladištenim jajima u skupini s 1 g ekstrakta kadifice/kg smjese određen sadržaj od 615 ng/g. S druge strane, prema istraživanju Matache i sur. (2024.) utvrđena je učinkovitost dodataka ekstrakta kadifice i crvene paprike na oksidaciju lipida u žutanjcima. U usporedbi s kontrolnom skupinom, značajne TBARS vrijednosti su smanjene nakon 28 dana za sve pokusne tretmane (E1 s 0,07% ekstrakta kadifice, E2 s 0,07% ekstrakta crvene paprike i E3 s ekstraktima kadifice i crvene paprike), što ukazuje na učinkovito odgađanje oksidacije masti u žutanjku zahvaljujući antioksidacijskim svojstvima oba prirodna ekstrakta. Također, Matache i sur. (2024.) navode da dodatak od 950 mg ekstrakta kadifice po kilogramu smjese smanjuje razinu lipidne peroksidacije te dodatne razine ekstrakta kadifice (150, 350, 550 i 750 mg/kg smjese) značajno poboljšavaju oksidacijsku stabilnost lipida u jajima skladištenim 28 dana na 18 °C.

Nadalje, u istraživanju Rezaei i sur. (2019.) uspoređivan je utjecaj pigmenata ekstrahiranih iz cvijeta kadifice i sintetskih pigmenata na oksidacijsku stabilnost jaja. Autori su zaključili kako je oksidacijska stabilnost žutanjka kod nesilica hranjenih dodatkom pigmenata kadifice (40 mg/kg smjese) značajno poboljšana nakon 3 tjedna skladištenja pri 18 °C ($P < 0,05$). Naime, sadržaj MDA u žutanjku je porastao sa 690 ng/g tek na 700 ng/g, dok je u kontrolnoj skupini s dodatkom kantaksantina (25 mg/kg smjese) zabilježen sadržaj MDA od 710 ng/g nulti dan te 910 ng/g 21. dan skladištenja. Sadržaj MDA povećavao se tijekom skladištenja i u ovom istraživanju, što je u skladu s rezultatima drugih autora koji su naveli da temperatura, kao i razina i vrsta dodataka hrani, mogu značajno utjecati na kvalitetu jaja i oksidacijsku stabilnost žutanjka. Hrana prikladna za konzumaciju trebala bi imati vrijednosti oksidacije lipida ispod 3000 ng/g uz gornju granicu 7000-8000 ng/g (Rezaei i sur., 2019.). Iako su na početku skladištenja razine MDA u ovom istraživanju bile više u tretmanima s dodatkom mikrokapsula ekstrakta kadifice, dugoročno gledano nije zabilježen negativan učinak na oksidacijsku stabilnost jaja tijekom skladištenja na različitim temperaturama.

4.2.2. Stabilnost žutanjka u induciranim uvjetima oksidacije

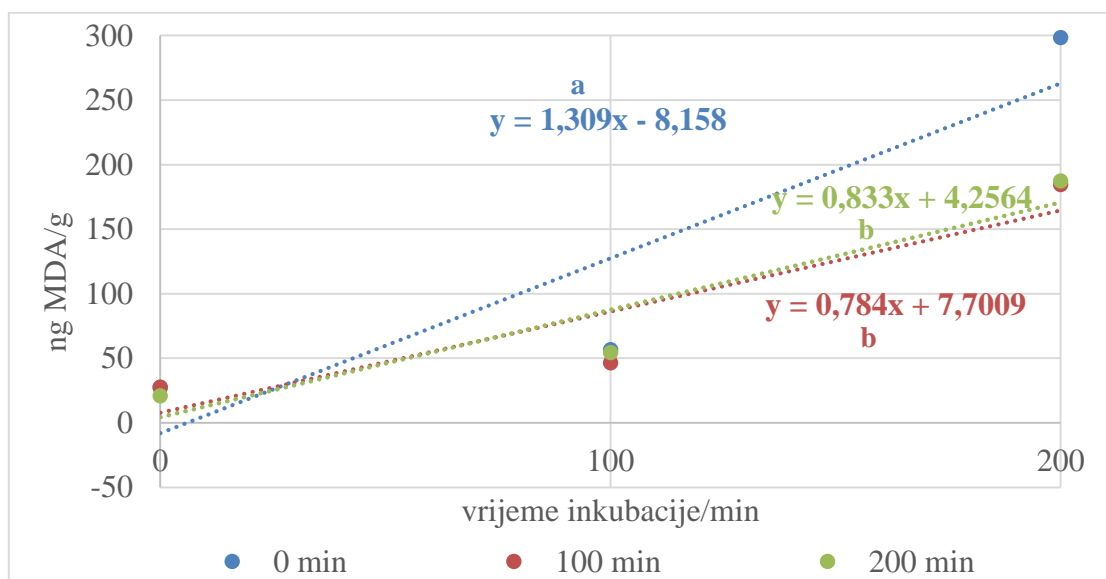
Utjecaj mikrokapsula ekstrakta kadifice na oksidacijsku stabilnost žutanjaka određen je u uvjetima oksidacije inducirane sa željezom (poticanje oksidacije) te određivanjem sadržaja MDA tijekom različitih vremenskih točaka inkubacije (0, 100 i 200 minuta). Prema rezultatima prikazanim u tablici 4.2.2.1., u žutanjcima kontrolne skupine zabilježen je najveći porast sadržaja MDA (288,42 ng/g) nakon 200 min inkubacije emulzije žutanjaka, dok su tretmani T1 (184,42 ng/g) i T2 (187,37 ng/g) s dodatkom mikrokapsula ekstrakta kadifice od 0,5 i 1 % imali značajno niže vrijednosti MDA ($P = 0,0042$). Rezultati ukazuju da jaja tretmana T0, bez dodataka mikrokapsula ekstrakta kadifice i s dodatkom sintetskog pigmenta kantaksantina, nemaju dovoljno antioksidansa za oksidacijsku zaštitu te lipidi u žutanjcima ubrzano oksidiraju tijekom inducirane oksidacije. Dakle, stabilnost lipida je niska u odsutnosti prirodnih karotenoida. S druge strane, tretman T1 pokazuje značajno manje povećanje MDA nakon 200 minuta inkubacije emulzije žutanjaka u usporedbi s kontrolom, što potvrđuje potencijal inkapsuliranog ekstrakta kadifice u smanjenju oksidacije, odnosno usporava oksidaciju lipida. Inkapsuliranje ekstrakta kadifice može povećati stabilnost bioaktivnih spojeva karotenoida (luteina i zeaksantina), čime se osim zaštite karotenoida dobiva i učinak sporog otpuštanja

karotenoida u organizmu nesilica (sigurnije i preciznije deponiranje karotenoida) te se tako poboljšava oksidacijska zaštita žutanjaka. Tretman T2 također pokazuje značajno niži sadržaj MDA nakon 200 minuta inkubacije u usporedbi s kontrolom te tek neznatno viši sadržaja od žutanjaka tretmana T1, što može biti utjecaj probiranja nesilica tijekom konzumacije smjesa ili mogućnosti da povećanje mikrokapsula ne donosi proporcionalno veći učinak na smanjenje oksidacije lipida. Također, rezultati sadržaja MDA na početku inkubacije (T0 – 26,59, T1 – 27,59 i T2 – 20,81 ng/g) i nakon 100 inkubacije (T0 – 53,14, T1 – 46,39 i T2 – 54,43 ng MDA/g) pokazuju određene razlike koje nisu statistički značajne, što ističe da antioksidacijski učinci mikrokapsula još nisu u potpunosti izraženi ili su minimalni jer oksidacija tek počinje. Sukladno s ovim istraživanjem, žutanjci kontrolne skupine su imali najvišu vrijednost nagiba pravca ovisnosti sadržaja MDA o vremenu inkubacije u usporedbi sa žutanjcima tretmana T1 i T2 (redom 1,309, 0,784 i 0,833) (Grafikon 4.2.2.1.).

Tablica 4.2.2.1. Sadržaj malondialdehida u žutanjcima jaja hranidbenih tretmana u induciranim uvjetima oksidacije

tretman	dodatak mikrokapsula	vrijeme inkubacije		
		0	100	200
		min		
		ng MDA/g		
T0	/	26,59	53,14	288,42a
T1	0,5%	27,59	46,39	184,42b
T2	1%	20,81	54,43	187,37b
P		0,3651	0,7393	0,0042

^{a-b} vrijednosti unutar stupca označene različitim slovima značajno se razlikuju ($P < 0,05$)



Grafikon 4.2.2.1. Pravac ovisnosti sadržaja malondialdehida (MDA) o vremenu inkubacije u žutanjcima hranidbenih tretmana u induciranim uvjetima oksidacije

^{a-b} nagibi pravca označeni različitim slovima značajno se razlikuju ($P < 0,05$)

U radu Kljak i sur. (2021.) istražen je utjecaj dodataka sušenog bosiljka, cvjetova nevena i kadifice te maslačka na boju, sadržaj karotenoida i oksidacijsku stabilnost u induciranim uvjetima sa željezom te senzorna svojstva žutanjka. Prirodni dodaci dodani su u udjelima od 1 i 3% u potpune krmne smjese za nesilice, dok se kontrola sastojala od potpune krmne smjese za nesilice s dodatkom sintetskog pigmenta kantaksantina. U navedenom istraživanju, prirodni izvori pigmenata značajno su utjecali na oksidacijsku stabilnost žutanjaka ($P < 0,0001$). U kontrolnom tretmanu i tretmanu s dodatkom 1% nevena zabilježena je najveći sadržaj MDA tijekom 250 min inkubacije (179,22 i 187,95 ng/g). Također, autori su pokazali kako je dodatak 3% nevena u smjesama rezultirala 41% nižim sadržajem MDA nakon 250 minuta u odnosu na tretman s 1% nevena. Nadalje, najniže koncentracije MDA detektirane su u žutanjcima tretmana s bosiljkom i kadificom (u prosjeku 50,40 i 42,88 ng/g). Rezultati ukazuju da su dodaci s prirodnim izvorom karotenoida imali značajan utjecaj na smanjenje oksidacije lipida, unatoč niskom sadržaju karotenoida. Osim toga, primijetili su da su žutanjci iz tretmana s bosiljkom i kadificom imali značajno niže koncentracije MDA u usporedbi s kontrolom, što je u skladu s ovim istraživanjem koje pokazuje da mikrokapsule ekstrakta kadifice pozitivno utječu na smanjenje oksidacije lipida (proizvodnju MDA), u usporedbi s dodatkom sintetskog pigmenta kantaksantina (kontrola).

Pozitivan učinak prirodnih dodataka također je potvrđen i u istraživanju Botsoglou i sur. (2012.), gdje je procijenjen utjecaj dodataka maslinovih listova i α -tokoferil acetata u hranidbi kokoši nesilica na oksidacijsku stabilnost žutanjka. Nesilice u kontrolnoj skupini hranjene su smjesom na bazi kukuruza i soje uz dodatak 4% lanenog ulja, dva su tretmana imala smjese dodatno obogaćene s 5 ili 10 g/kg mljevenih maslinovih listova, dok je u četvrtom tretmanu smjesa bila obogaćena s 200 mg/kg α -tokoferil acetata. Oksidacija lipida inducirana željezom povećala je sadržaj MDA u žutanjcima svih skupina, pri čemu je povećanje bilo veće ($P \leq 0,05$) u kontrolnoj skupini i skupini s dodatkom 5 g maslinovih listova/kg već nakon 50 minuta inkubacije. Skupina s dodatkom 10 g maslinovih listova/kg imala je niže vrijednosti MDA u usporedbi s kontrolom, što ukazuje na antioksidacijski učinak maslinovih listova na jaja obogaćena n-3 masnim kiselinama, ali više ($P \leq 0,05$) nego skupina s α -tokoferil acetatom, koja je imala najniže koncentracije MDA. Rezultate navedenog istraživanja vrijedi usporediti s ovim istraživanjem zbog potvrđenih antioksidacijskih učinaka različitih prirodnih izvora pigmenata na stabilnost lipida u žutanjcima.

5. Zaključak

Na temelju rezultata istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

- Dodatak mikrokapsula ekstrakta kadifice u potpune krmne smjese za kokoši nesilice u udjelima od 0,5 i 1 % imao je minimalan utjecaj na parametre procjene kvalitete jaja. Jedine razlike su utvrđene u širini jaja, masi bjelanjka i boji žutanjka određenoj YCF skalom, koje su bile niže, te u čvrstoći ljuske koja je bila viša u jajima nesilica hranjenih s dodatkom mikrokapsula.
- Dodatak mikrokapsula ekstrakta kadifice nije utjecao na sadržaj MDA u žutanjcima tijekom skladištenja jaja pri različitim uvjetima (4 °C, sobna temperatura, 30 °C).
- Dodatak mikrokapsula ekstrakta kadifice je imao značajan utjecaj na oksidacijsku stabilnost žutanjaka u uvjetima oksidacije inducirane željezom. Nakon 200 minuta inducirane oksidacije, kontrolni tretman (T0) imao je najveći porast razine MDA, dok su tretmani s mikrokapsulama ekstrakta kadifice (T1 i T2) imali značajno niže razine MDA, što ukazuje na poboljšanu oksidacijsku stabilnost žutanjaka. Tretmani s dodatkom mikrokapsula se nisu međusobno razlikovali što upućuje da je 0,5% dovoljan dodatak pripremljenih kapsula kako bi se očuvala oksidacijska stabilnost žutanjaka u induciranim uvjetima oksidacije.

Popis literature

1. Abou-Elkhair R., Selim S., Hussein E. (2018). Effect of supplementing layer hen diet with phytogetic feed additives on laying performance, egg quality, egg lipid peroxidation and blood biochemical constituents. *Animal Nutrition*. 4: 394-400.
2. Bidin M. (2010). Jaja domaće peradi – visokovrijedna namirnica u prehrani ljudi. *MESO*. 12 (6): 356-359.
3. Botsoglou E., Govaris A., Fletouris D., Iliadis S. (2012). Olive leaves (*Olea europea* L.) and α -tocopheryl acetate as feed antioxidants for improving the oxidative stability of α -linolenic acid-enriched eggs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 97(4): 740-753.
4. Botsoglou N. A., Fletouris D. J., Papageorgiou G. E., Vassilopoulos V. N., Mantis A. J., Trakatellis A. G. (1994.). Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42 (9): 1931-1937.
5. Bouvarel I., Nys Y., Lescoat P. (2011). Hen nutrition for sustained egg quality. In: *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products* (Nys Y., Bain M., Van Immerseel F., Ur.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 261-299.
6. Breithaupt D. E. (2007). Modern application of xanthophyll in animal feeding: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 18: 501506.
7. Cazzonelli C. I. (2011). Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Functional Plant Biology*. 38: 833-847.
8. Chambers J. R., Zaheer K., Akhtar H., Abdel-Aal E.-S. M. (2017). Chicken Eggs. In: *Egg Innovations and Strategies for Improvements* (Hester P. Y., Ur.), Academic Press, Cambridge, MA, 1-9.
9. Cherian G., Campbell A., Parker T. (2009). Egg quality and lipid composition of eggs from hens fed *Camelina sativa*. *Journal of Applied Poultry Research*. 18: 143-150.
10. Chitrakar B., Zhang M., Bhandari B. (2019). Edible flowers with the common name “Marigold”: Their therapeutic values and processing. *Trends in Food Science and Technology*. 89: 76-87.
11. Chowdhury D. S., Hassin B. M., Das S. C., Rashid Md. H., Ferdous A. J. M. (2008). Evaluation of marigold flower and orange skin as sources of xanthophyll pigment for the improvement of egg yolk color. *The Journal of Poultry Science*. 45: 265-272.
12. Četković G. S., Djilas S. M., Čanadanović-Brunet J. M., Tumbas V. T. (2004). Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Research International*. 37(7): 643-650.
13. da Silva L. C., Menezes Castelo R., Cheng H. N., Biswas A., Fero Furtado R., Alves C. R. (2022). Methods of microencapsulation of vegetable oil: Principles, stability and applications – a minireview. *Food Technology and Biotechnology*. 60 (3): 308-320.
14. 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.

15. Darmawan A., Hermana W., Suci D. M., Mutia R., Sumiati, Jayanegara A., Ozturk E. (2022). Dietary phytogetic extracts favorably influence productivity, egg quality, blood constituents, antioxidant and immunological parameters of laying hens: A meta-analysis. *Animals*. 12 (17): 2278.
16. Datta S. K., Gupta, Y. C. (ur.) (2022). *Floriculture and Ornamental Plants*. Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapur.
17. Domaćinović M., Antunović Z., Džomba E., Opačak A., Baban M., Mužic S. (2015). *Specijalna hranidba domaćih životinja*. Poljoprivredni fakultet Osijek; Osijek.
18. Duman M., Şekeroğlu A., Yıldırım A., Eleroğlu H., Camcı Ö. (2016). Relation between egg shape index and egg quality characteristics. *European Poultry Science*. 80:1612-9199.
19. Eun J.-B., Maruf A., Das P. R., Nam S.-H. (2019). A review of encapsulation of carotenoids using spray drying and freeze drying. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 60: 3547-3572.
20. European Commission. (2021). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council on additives for use in animal nutrition. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2003/1831/oj> - pristup: 02.09.2024.
21. Faitarone A. B. G., Garcia E. A., Roça R. O., Andrade E. N., Vercese F., Pelícia K. (2016). Yolk color and lipid oxidation of the eggs of commercial white layers fed diets supplemented with vegetable oils. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 18 (1): 009-016.
22. FAOSTAT (2022). Food and agriculture data. <https://www.fao.org/faostat/en/#home> – pristup 21.08.2024.).
23. Gao Z., Zhang J., Li F., Zheng J., Xu G. (2021). Effect of oils in feed on the production performance and egg quality of laying hens. *Animals*. 11 (12): 3482.
24. 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.
25. 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.
26. Gopinath B., Liew G., Tang D., Burlutsky G., Flood V. M., Mitchell P. (2020). Consumption of eggs and the 15-year incidence of age-related macular degeneration. *Clinical Nutrition*. 39 (2): 580-584.
27. Grashorn, M. (2016). *Feed Additives for Influencing Chicken Meat and Egg Yolk Color. Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*. University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.
28. Grčević M., Gajčević-Kralik Z., Kralik G., Ivanković S. (2011). Kokoške jaje kao funkcionalna namirnica. *Krmiva*. 53 (2): 93-100.
29. Grčević M., Kralik Z., Kralik G., Galović D., Radišić Ž., Hanžek D. (2019). Quality and oxidative stability of eggs laid by hens fed marigold extract supplemented diet. *Poultry Science*. 98: 3338-3344.
30. Guyonnet V. (2023). World egg production and marketing trends. U: *Handbook of egg science and technology* (Mine Y., Hatta H., Nau F., Qiu N.). Boca Raton: CRC Press.
31. Hanusová E., Hrnčár C., Hanus A., Oravcová M. (2015.). Effect of breed on some parameters of egg quality in laying hens. *Acta fytotechn. zootechn.* 18 (1): 20-24.

32. Harrington D., Hall H., Wilde D., Wakeman W. (2020). Application of aromatic plants and their extracts in the diets of laying hens. *Feed Additives*. 11: 187-203.
33. Hasin B. M., Ferdaus A. J. M., Islam M. A., Uddin M. J., Islam M. S. (2006) Marigold and Orange Skin as Egg Yolk Color Promoting Agents. *International Journal of Poultry Science*. 5 (10): 979-987.
34. Hilbert F., Paulsen P., Smulders F. J. M. (2014). Safety of Food and Beverages: Poultry and Eggs. In: *Encyclopedia of Food Safety* (Motarjemi Y., Ur.), Academic Press, Cambridge, MA, 280-284.
35. Hojnik M., Škerget M., Knez Ž. (2008). Extraction of lutein from Marigold flower petals – Experimental kinetics and modelling. *LWT - Food Science and Technology*. 41(10): 2008-2016.
36. 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 × ananassa* Duchesne) using zinc-alginate microparticles. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 45(3): 324-334.
37. Karcher D. M., Mench J. A. (2018). Overview of commercial poultry production systems and their main welfare challenges. In: *Advances in Poultry Welfare* (Mench J. A., Ur.), Woodhead Publishing, Duxford, 3-25.
38. Kiokias S., Proestos C., Varzakas T. (2016). A review of the structure, biosynthesis, absorption of carotenoids-analysis and properties of their common natural extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science*. 4 (1): 25-37.
39. 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.
40. Kojić Jurinić M., Mišćević Z. (2024) Perad i jaja. Tržišni cjenovni informacijski sustav u poljoprivredi, Ministarstvo poljoprivrede RH. <https://tisup.mps.hr/onama.aspx> - pristup 21.08.2024.
41. Kralik Z., Grčević M., Kralik G., Hanžek D., Zelić A. (2017). Quality of table eggs on the Croatian market. *Poljoprivreda*. 23(1): 63-68.
42. Kralik Z., Jelić S. (2017). Dizajnirana jaja i njihova nutritivna svojstva. *Krmiva*. 59 (1): 31-38.
43. Kralik Z., Kralik G., Košević M., Radanović A. (2024). Proizvodni pokazatelji i kvaliteta jaja kokoši nesilica hranjenih dizajniranim omega-3 krmnim smjesama. *Krmiva*. 66 (1): 3-12.
44. Ledvinka Z., Zita L., Klesalová L. (2012.). Egg quality and some factors influencing it. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 43 (1): 46-52.
45. 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> – pristup 02.08.2024.
46. Lokaewmanee K., Yamauchi K., Komori T., Saito K. (2010). Effects on egg yolk color of paprika or paprika combined with marigold flower extracts. *Italian Journal of Animal Science*. 9 (67): 356-359

47. Malfatti L. H., Zampar A., Galvao A. C., Robazza da S. W., Boiogo M. M. (2021). Evaluating and predicting egg quality indicators through principal component analysis and artificial neural networks. *LWT - Food Science and Technology*. 148: 111720
48. Marounek M., Pebriansyah A. (2018). Use of carotenoids in feed mixtures for poultry: a review. *Agricultura Tropica et Subtropica*. 51(3): 107-111.
49. Matache C.-C., Cornescu G. M., Drăgotoiu D., Cișmileanu A. E., Untea A. E., Sărăcilă M., Panaite T. D. (2024.) Effects of marigold and paprika extracts as natural pigments on laying hen productive performances, egg quality and oxidative stability. *Agriculture*. 14(9):1464.
50. Milivojević M., Popović A., Pajić-Lijaković I., Šoštarić I., Kolašinac S., Stevanović Z. D. (2023.) Alginate gel-based carriers for encapsulation of carotenoids: On challenges and applications. *Gels*. 9, 620.
51. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva. (2006). Pravilnik o kakvoći jaja: Pročišćeni tekst. *Narodne novine*, br. 115/06, 69/07, 76/08.
52. Mohiti-Asli M., Shariatmadari F., Lotfollahian H., Mazuji, M. T. (2008). Effects of supplementing layer hen diets with selenium and vitamin E on egg quality, lipid oxidation and fatty acid composition during storage. *Canadian Journal of Animal Science*. 88(3): 475-483.
53. National Research Council (NRC). (1994). *Nutrient Requirements of Poultry*. 9. revidirano izdanje. Natl. Acad. Press, Washington.
54. Oliveira M. C. de, Silva W. D. da, Oliveira H. C., Moreira E. Q. de B., Ferreira L. O. de, Gomes Y. S. de, Souza Junior M. A. P. de (2017). Paprika and/or marigold extracts in diets for laying hens. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 18 (2): 293-302.
55. Our World in Data. (2024.). Per capita egg consumption (kilograms per year). https://ourworldindata.org/grapher/per-capita-egg-consumption-kilograms-per-year?tab=chart&time=1994..latest&country=HRV~OWID_EU27~OWID_WRL (pristup: 23.08.2024.)
56. Pirgozliev V., Rose S. P., Ivanova S. (2019). Feed additives in poultry nutrition. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 25 (1): 8-11.
57. Radwan Nadia L., Hassan R. A., Qota E. M., Fayek H. M. (2008.). effect of natural antioxidant on oxidative stability of eggs and productive and reproductive performance of laying hens. *International Journal of Poultry Science*. 7 (2): 134-150.
58. Rezaei M., Zakizadeh S., Eila N. (2019). Effects of pigments extracted from the marigold flower on egg quality and oxidative stability of the egg yolk lipids in laying hens. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 9: 541-547.
59. Rodriguez-Amaya D. B. (2016). *Food carotenoids: chemistry, biology and technology*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
60. Rutz J. K., Borges C. D., Zambiasi R. C., da Rosa C. G., da Silva M. M. (2016). Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. *Food Chemistry*. 202: 324-333.
61. Sangkaew M., Rahman M., Koh K. (2017). Effects of high oleic acid sunflower oil on egg quality and fatty acid composition of egg yolk in laying hens. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*. 4 (2): 180-184.
62. Savjetodavna služba za poljoprivredu i ruralni razvoj (2012). *Europska komisija pozvala 13 zemalja članica EU da prestanu koristiti neobogaćene kaveze za kokoši nesilice*.

<https://www.savjetodavna.hr/2012/02/02/europska-komisija-pozvala-13-zemalja-clanica-eu-da-prestanu-koristiti-neobogacene-kaveze-za-kokosi-nesilice/> -pristup: 19.08.2024.

63. Senčić Đ., Samac D. (2017). Nutritivna vrijednost jaja u prehrani ljudi. MESO. 19 (1): 68-72.
64. Singh Y., Gupta A., Kannoja P. (2020). *Tagetes erecta* (Marigold) - A review on its phytochemical and medicinal properties. Current Medical and Drug Research. 4 (1): 1-6.
65. Skřivan M., Englmaierová M., Skřivanová E., Bubancová I. (2015) Increase in lutein and zeaxanthin content in the eggs of hens fed marigold flower extract. Czech Journal of Animal Science. 60 (3): 89-96.
66. Skřivan M., Marounek M., Englmaierová M., Skřivanová E. (2016). Effect of increasing doses of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract on eggs carotenoids content, color and oxidative stability. Journal of Animal and Feed Sciences. 25: 58-64.
67. 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.
68. 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.
69. Vemmer M., Patel A. V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. Biological Control. 67(3): 380-389.
70. Wang S., Zhang L., Li J., Cong J., Gao F., Zhou G. (2016). Effects of dietary marigold extract supplementation on growth performance, pigmentation, antioxidant capacity and meat quality in broiler chickens. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 30(1): 71-77.
71. 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.
72. Zaheer K. (2015) An updated review on chicken eggs: Production, consumption, management aspects and nutritional benefits to human health. Food Nutrition Science. 6: 1208-1220.

Životopis

Karla Čorbić rođena je 23. listopada 1999. godine u gradu Zagrebu, gdje nastavlja živjeti i obrazovati se. Nakon završetka osnovne škole, upisuje i završava XVI. jezičnu gimnaziju. Studij animalnih znanosti upisuje 2018. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2022. stječe akademski stupanj sveučilišne prvostupnice (lat. *baccalaureus*), nakon čega upisuje diplomski studij Hranidba životinja i hrana na Agronomskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.