

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Jadranka Kralj i Karla Obad

**Utjecaj dodatka različitih hibrida kukuruza, vitamina  
A i izvora minerala u krmne smjese za kokoši  
nesilice na sastav masnih kiselina i parametre  
kvalitete jaja**

**ZAGREB, 2024.**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Nives Marušić Radovčić i predan je za natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

## Sadržaj

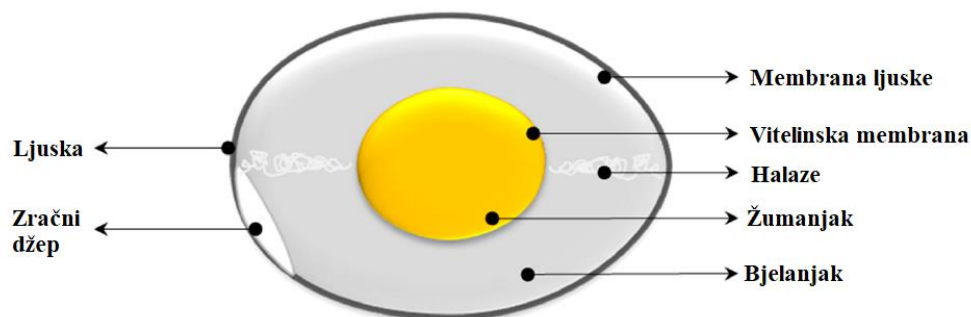
1. UVOD.....	1
1.1. Građa jaja .....	1
1.2. Nutritivni sastav jaja .....	2
1.3. Utjecaj hranidbe na kvalitetu jaja.....	4
1.3.1. Hibridi kukuruza .....	6
1.3.2. Vitamin A.....	7
1.3.3. Minerali .....	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA.....	12
2.1. Cilj istraživanja .....	12
2.2. Hipoteza.....	12
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. Jaja Lohmann Brown kokoši nesilica.....	13
3.1.2. Potpune krmne smjese i hibridi kukuruza .....	14
3.1.3. Kemikalije.....	19
3.1.4. Aparatura .....	19
3.1.5. Pribor .....	19
3.1.6. Programski paketi .....	20
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Određivanje fizikalnih svojstava jaja .....	20
3.2.2. Određivanje udjela masti i sastava masnih kiselina .....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
4.1. Sastav masnih kiselina hibrida kukuruza.....	25
4.2. Utjecaj hibrida kukuruza, vitamina A i izvora minerala na sastav masnih kiselina krmiva <sup>27</sup>	
4.3. Utjecaj hibrida, vitamina A i izvora minerala na sastav masnih kiselina jaja.....	33
4.4. Procjena nutritivne i zdravstvene kvalitete jaja prema sastavu masnih kiselina .....	41
4.5. Pokazatelji kvalitete jaja .....	47
4.5.1. Vanjski pokazatelji kvalitete jaja .....	48

4.5.2. Unutarnji pokazatelji kvalitete jaja.....	52
5. ZAKLJUČAK .....	55
6. ZAHVALE.....	58
7. LITERATURA.....	59
Abstract.....	75

## 1. UVOD

### 1.1. Građa jaja

Jaja se sastoje od tri glavna dijela: ljuske (9 - 11 %), bjelanjka (80 - 63 %) i žumanjka (28 - 29 %) (Slika 1.). Ljuska je građena od sloja kalcijeva karbonata i dvije membrane – opne ljuske. S vanjske strane prekrivena je vlažnim slojem kutikule koji ima zaštitnu ulogu odnosno sprječava kontaminaciju jaja mikroorganizmima iz okoline. Struktura ljuske je ustvari matriks u koji su ugrađeni kalcij i organska tvar. S unutarnje strane ljuska ima dvije opne: vanjsku opna (obavija membranu) i unutarnju opna (obavija bjelanjak). Ljuska se stvara u uterusu i to 5 - 22 sata nakon ovulacije jajne stanice (Radanović, 2023).



Slika 1. Građa jajeta (Rehault-Godbert i sur, 2019)

Bjelanjak jajeta se sastoji od četiri različita sloja: vanjskog tankog bjelanjka koji se nalazi uz unutarnju membranu ljuske (23,3 %), viskoznog debelog bijelog sloja (57,3 %), unutarnjeg tankog bijelog sloja koji se nalazi uz sami žumanjak (16,8 %) te spiralnog gustog sloja koji formira halaze (2,7 %). U svježim jajima, gusti bjelanjak dominira i ima veću viskoznost od tankog bjelanjka zbog visokog sadržaja ovomucina. Stajanjem jaja gusti bjelanjak postaje rjeđi smanjuje mu se viskoznost, a halaze postaju tanje i lomljivije (Radanović, 2023).

Halaze su proteinske tvorevine spiralnog oblika. Spirala je uvijena u smjeru kazaljke na satu i prostire se od tupog, odnosno šiljatog dijela jajeta sve do žumanjka. Uloga halaze je da drži žumanjak na sredini. Halaze su blago elastične te dopuštaju ograničenu rotaciju žumanjka (Radanović, 2023).

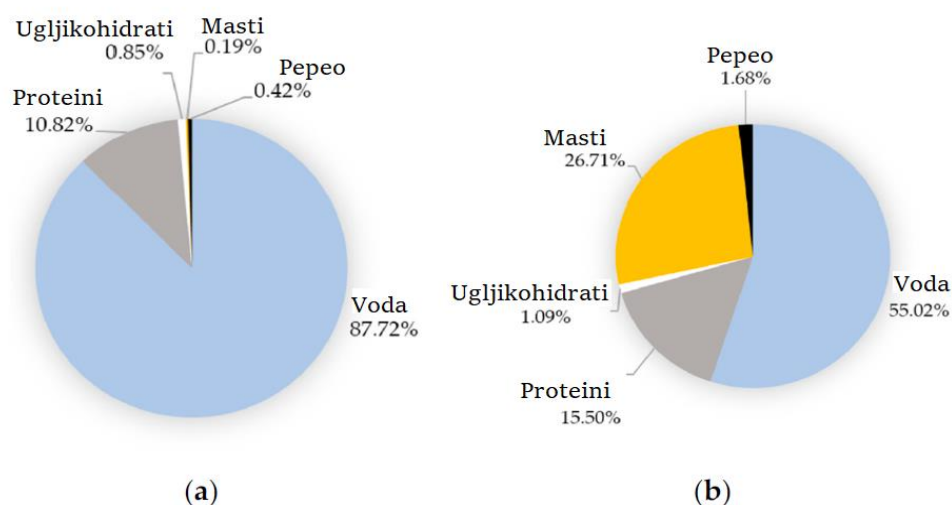
Žumanjak se sastoji od dvije lipoproteinske emulzije svijetlih i tamnih slojeva koji su koncentrično poredani kao krugovi izvana prema centru žumanjka. Slojevi nastaju naizmjenično, što dovodi do kružnog izgleda slojeva žumanjka. Tamni sloj žumanjka je zastupljeniji, dok svijetli dio čini svega 2 % ukupnog žumanjka. Žumanjak je obavijen opnom, tzv. vitelinskom membranom, koja ga odvaja od bjelanjka (Radanović, 2023).

Jaja su uglavnom asimetričnog i ovalnog oblika te upravo takav oblik predstavlja njihovu najznačajniju karakteristiku. Oblik jaja mjerimo indeksom oblika, koji je definiran omjerom širine i dužine jajeta te je ključan faktor u određivanju kvalitete jaja. Prema indeksu oblika, jaja se mogu svrstati u tri klase: oštra jaja (  $SI < 72$ ), normalna ili standardna jaja ( $SI = 72 - 76$ ) i okrugla jaja ( $SI > 76$ ) (Philippe i sur., 2020).

## 1.2. Nutritivni sastav jaja

Jaja se smatraju cjelovitom namirnicom za ishranu ljudi i od posebnog su interesa s nutritivnog stajališta. Cjenovno su pristupačna namirnica, koja sadrži visoke koncentracije esencijalnih makro- i mikronutrijenata poput lipida, proteina, vitamina, minerala i elemenata u tragovima te pritom nudi umjerenu kalorijsku vrijednost (140 kcal/ 100 g) i veliki kulinarski potencijal. Jaja se smatraju najjeftinijim izvorom proteina životinjskog porijekla, vitamina A i B12, željeza, riboflavina i kolina te drugim najjeftinijim izvorom cinka i kalcija. Uz nutrijente sadrži i širok spektar bioaktivnih komponenata. Glavni hranjivi sastojci jajeta su vrlo stabilni i ovise o omjeru bjelanjka i žumanjka, za razliku od mikronutrijenata koji su pod utjecajem nekoliko čimbenika, uključujući prehranu kokoši (Rehault-Godbert i sur, 2019).

Proteini jaja jednoliko su raspoređeni između bjelanjka i žumanjka, dok su lipidi, vitamini topivi u mastima i minerali uglavnom sadržani u žumanjku (Slika 2.). Identificirane su stotine različitih proteina koji su povezani s određenim fiziološkim funkcijama i ispunjavaju specifične zahtjeve tijekom razvoja embrija kokoši. Specifičnost pojedinih proteina može se objasniti činjenicom da su žumanjak i bjelanjak odijeljeni membranama i formirani od različitih tkiva u reproduktivnom sustavu kokoši (Nys i Guyot, 2011). Koncentracija proteina u prosjeku iznosi 12,5 g u 100 g cjelovitog jajeta te ovisi genetici i starosti kokoši (Rehault-Godbert i sur, 2019).



Slika 2. Općeniti sastav jestivih dijelova jajeta: (a) bjelanjak, (b) žumanjak (Rehault-Godbert i sur, 2019).

Žumanjak sadržava 68 % lipoproteina niske gustoće (LDL, low-density lipoproteins), 16% lipoproteina visoke gustoće (HDL, high-density lipoproteins), 10 % livetina i ostalih otopljenih proteina te 4 % fosfitina. Ove komponente raspoređene su između netopivih proteinskih agregata koji čine oko 50 % žumanjka i bistre žute tekućine ili plazme koju čini 77 - 81 % suhe tvari (Anton, 2013). Bjelanjak ima gelastu strukturu i uglavnom je sastavljen od vode, fibrilarnih proteina, glikoproteina, antibakterijskih proteina i peptida, a manjka lipidima (Mann, 2008). Koncentracija proteina u bjelanjku iznosi oko 110 mg/mL bjelanjka. Ukupno je identificirano oko 150 različitih vrsta proteina u njegovom sastavu, a čak 50 % ukupnih proteina čini ovalbumin. Ovalbumin je vrijedan izvor esencijalnih aminokiselina koje imaju važnu fiziološku ulogu u embrionalnom razvoju kokoši i ishrani ljudi (Gautron i sur, 2011). Osim ovoalbumina, u bjelanjku je zastupljen i lizozim, antibakterijski protein koji se koristi kao protuupalni agens u mnogim farmaceutskim i prehrambenim konzervansima (Rehault-Godbert i sur, 2019).

Lipidi su koncentrirani u žumanjku jajeta kao dio lipoproteina koji se sastoje od triglicerida i kolesteril estera, okruženih monomolekularnim slojem fosfolipida i kolesterola s ugrađenim apoproteinima (Anton, 2013). Koncentracija lipida kreće se u rasponu od 8,7 do 11,2 g u 100 g cjelovitog jajeta (Rehault-Godbert i sur, 2019). Omjer nezasićenih i zasićenih masnih kiselina u žumanjku je relativno visok u odnosu na ostale namirnice životinjskog porijekla. Žumanjak je bogat izvor esencijalnih masnih kiselina, a ima i relativno visok sadržaj kolesterola (400 mg / 100 g cjelovitog jajeta) (Rehault-Godbert i sur, 2019). Visok sadržaj kolesterola u jajima pridonio je u smanjenoj konzumaciji jaja u proteklih 30 do 40 godina zbog straha potrošača od razvoja kardiovaskularnih bolesti. No, provedena istraživanja nisu pronašla direktnu poveznicu između konzumacije jaja i povišene razine kolesterola u krvi. Današnje spoznaje ukazuju da na povišenje kolesterola u krvi primarno utječe konzumacija hrane bogate zasićenim masnim kiselinama poput miristinske i palmitinske masne kiseline (Kim i Campbell, 2018).

Sadržaj ugljikohidrata u jajima je relativno nizak (oko 0,7%). Ugljikohidrate jaja pronalazimo u žumanjku i bjelanjku. Glukoza je dominantni šećer zastupljen u jajima i njena koncentracija iznosi oko 0,37 g u 100 g cjelovitog jajeta te je prvenstveno zastupljena u bjelanjku. U tragovima su zastupljene fruktoza, laktoza, maltoza i galaktoza. Visok udio ugljikohidrata jaja zapravo se nalazi u proteinskim strukturama – glikoproteinima, koji nastaju izlučivanjem iz reproduktivnog sustava kokoši tijekom formiranja žumanjka, bjelanjka i membrana (Rehault-Godbert i sur, 2019).

Jaja sadrže sve vitamine, osim vitamina C što je pripisano mogućnosti kokoši da samostalno proizvodi dostatne količine vitamina C kroz *de novo* sintezu iz glukoze. Žumanjak sadrži visoke koncentracije vitamina A, D, E, K, B1, B2, B5, B6, B9 i B12, a bjelanjak B2, B3 i B5 te relativno visoke koncentracije vitamina B1, B6, B8 i B12 (Rehault-Godbert i sur, 2019). Konzumacija

dva jajeta dnevno pokriva od 10% do 30 % dnevnog zahtjeva ljudskog organizma za vitaminima. Uz vitamine, jaja su važan izvor kolina koji je uglavnom zastupljen u žumanjku te njegova koncentracija iznosi oko 680 mg u 100 g žumanjka. Kolin ima važne i raznolike funkcije u održavanju i rastu stanice tijekom svih životnih faza, razvoju mozga, očuvanju integriteta kostiju i neurotransmisije. Od minerala, jaja su bogata fosforom, kalcijem i kalijem, a imaju i umjerene količine natrija (142 mg/100 g cjelovitog jajeta). Također sadrže sve esencijalne elemente u tragovima uključujući bakar, željezo, magnezij, mangan, selen, jod i cink, koji su uglavnom zastupljeni u žumanjku. Zastupljenost vitamini topivih u mastima (A, D, E i K) i koncentracija pojedinih elemenata u tragovima (selen i jod) u žumanjku znatno ovise o ishrani kokoši (Rehault-Godbert i sur, 2019).

### **1.3. Utjecaj hranidbe na kvalitetu jaja**

Hranidba životinja utječe na njihovo zdravlje, ponašanje i dobrobit, a osim toga i na kvalitetu i sigurnost proizvoda životinjskog porijekla te održivost cjelokupnog lanca hrane. Klimatske promjene i rastuća ljudska populacija postaju glavni izazov u proizvodnji hrane. U tom kontekstu definiran je koncept održive prehrane za životinje koji se temelji na četiri dimenzije održivosti, a to su ljudi, planet, profit i etika. Objedinjujući važnost učinkovitog korištenja prirodnih resursa, zaštitu okoliša, poboljšanje dobrobiti životinja s trenutno priznatim nutritivnim kriterijima za isporuku ekonomski isplativih i sigurnih životinjskih proizvoda. Na taj način, nastoji se težiti poboljšanju socio-ekonomskih uvjeta poljoprivrednika i uzgajivača, umanjiti tržišna konkurencija i smanjiti glad u svijetu (Makkar, 2013).

Promjene u cijenama hrane i hrane za životinje tijekom posljednjeg desetljeća, nepovoljne vremenske prilike te geo-političke promjene navele su poljoprivrednike i uzgajivače na traženje novih rješenja u pogledu povećanja prihoda i maksimalnog iskorištenja proizvodnje. Jedna od strategija uključuje modifikaciju sastojaka hrane za životinje, uvođenjem alternativnih i multifunkcionalnih sastojaka ili sastojaka koji povećavaju probavljivost (Spring i Switzerland, 2013)

Proizvodnja jaja je jedna od ključnih grana stočarstva. Način hranidbe kokoši nesilica, nutritivni sastav i energetska vrijednost krmiva utječu ne samo na fizička svojstva jajeta (npr. masa, debljina ljuske), već i na omjer žumanjka i bjelanjka te samim time na nutritivni sastav jajeta (Rehault-Godbert i sur, 2019). Nesilice preferiraju određene hranjive tvari u hranidbi, kao što su proteini, vlakna i kalcij, te su sposobne uravnotežiti svoju prehranu povećanjem unosa hrane bogate deficitarnom hranjivom tvari (Herrera i sur., 2018). Osim toga, imaju sposobnost deponiranja hranjivih tvari u žumanjku, što znači da dodavanje hranjivih tvari u njihovu hranidbu ima pozitivan učinak na nutritivnu vrijednost jaja. Nedavna istraživanja su pokazala da su jaja izvrsna funkcionalna hrana i otkriveno je da su idealan nositelj za biofortifikaciju vitamina, folne



kiseline, selena, polinezasićenih masnih kiselina,  $\omega$ -3 masnih kiselina i karotenoida (Kljak i sur., 2021; Liu i sur., 2020).

Istraživanjima je potvrđeno da na masu jajeta utječe energetska vrijednost krmiva. Viša energetska vrijednost krmiva postiže se kroz povećanje količine dijetetskih proteina iz biljnih izvora, prvenstveno kukuruza, soje i pšenice. Također, utvrđen je i pozitivan utjecaj prisustva aminokiseline metionina na povećanu masu jaja (Bregendahl i sur, 2008). Prisustvo antinutrijenata, poput inhibitora proteaza i teško probavljivih proteina (konvicilin, glicin, kruciferin), utječe na probavljivost krmiva i naknadno na masu samog jajeta zbog slabe iskoristivosti nutrijenata (Recoules i sur, 2017).

Kao što je već navedeno, nutritivni sastav jaja je relativno stabilan i udio pojedinih komponenti ovisi uglavnom o omjeru žumanjka i bjelanjka u jajetu. No, na sastav masnih kiselina u žumanjku može se relativno lako utjecati obogaćivanjem krmiva (Bouvarel i sur, 2011). Sastav masnih kiselina unutar triglicerida i fosfolipida izravan je odraz sastava masnih kiselina u krmivu kojim su hranjene kokoši nesilice (Rehault-Godbert i sur, 2019). Optimizacija sadržaja zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u krmivu mijenja se korištenjem ulja ili hrane za životinje, koja pokazuje visok stupanj nezasićenih masnih kiselina, a to su primjerice riblje, laneno, maslinovo i sojino ulje (Coorey i sur, 2015; Sirri i Meluzzi, 2011). Uključivanjem maslinovog ulja u ishranu nesilica, unose se vrijedne mononezasićene masne kiseline, prvenstveno oleinska kiselina, a sojinog ulja povećava udio nezasićenih n-6 masnih kiselina kao što je linolenska kiselina (Sirri i Meluzzi, 2011). Također, obogaćivanjem krmiva mikroalgama ili sjemenkama lana otkriven je tri do četiri puta veći sadržaj n-3 masnih kiselina u jajima (Baéza i sur, 2015). Slični rezultati postignuti su s dodatkom ekstrakta nevena u prahu (Grčević i sur, 2019), mikroalge *Schizochytrium* (Park i sur, 2015) te kombinacijom prebiotika i probiotika (Tang i sur, 2015).

Na sadržaj elemenata u tragovima kao što su selen i jod, te u manjim razmjerima željezo, cink, fluor i magnezij, može se također utjecati ishranom nesilica. Prosječna količina selena u jajima iznosi 5  $\mu$ g po jajetu i može se povećati 3 do 6 puta dodatkom 0,3 do 0,5 mg selena u krmivo. Ovakvim obogaćivanjem ishrane, jaja sadržavaju čak 50 do 70 % dnevnih potreba za selenom (Nys i sur, 2018). Slično tome, moguće je obogaćivanje jaja lipofilnim (A, D, E, K) i hidrofilnim (folati, B12, pantotenska kiselina) vitaminima kroz hranidbu. Tako se može povećati sadržaj vitamina A i do 10 puta dodatkom 30 000 IJ retinola u krmivo, vitamina D3 čak 15 puta dodatkom 15 000 IJ vitamina D3 u krmivo, te sadržaj vitamina E do 20 puta ovisno o količini dodanoj u krmivo. Za vitamine topljive u vodi, povećanje sadržaja dodatkom vitamina u smjese za ishranu je manje te iznosi oko 2 puta za dodatak folata, riboflavina i kobalamina, a za tiamin, biotin, pantotensku kiselinu, pirodaksin i niacin je još i manje (Bouvarel i sur, 2011).

### 1.3.1. Hibridi kukuruza

Žuti kukuruz (*Zea mays* L.) jedna je od najznačajnijih žitarskih kultura u svijetu. Kao takva koristi se kao sirovina za proizvodnju različitih proizvoda za prehranu ljudi, sadržaj je većine krmiva za domaće životinje te jedna od glavnih sirovina u proizvodnji biogoriva (Kaul i sur., 2019). Zrno kukuruza sadrži 70 - 72 % ugljikohidrata pretežno u obliku škroba te oko 7 - 10 % u obliku vlakana, između 8 - 10 % proteina od kojih je najzastupljeniji zein, te 3 - 5 % masti (Grabovskiy i sur., 2023). Gotovo 95 % kukuruznog ulja se sastoji od palmitinske (C16:0), stearinske (C18:0), oleinske (C18:1) i linolne (C18:2) kiseline, dok sadržaj linolenske (C18:3) kiseline varira od 0,5 do 2,0%, kao takvo ulje predstavlja dobar izvor esencijalnih polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) te vitamina E. Izvor je i minerala kao što su fosfor, kalij, magnezij i cink te vitamina kao što su vitamin A i B-kompleksa (posebno tiamin, riboflavin i niacin) (Sanjeev i sur., 2014).

Većina komercijalnih hibrida kukuruza korištenih u prehrani kokoši nesilica su tipa dent, ali se razlikuju prema genetski predodređenom omjeru između tvrdog i mekog endosperma, što utječe na fizikalno-kemijska svojstva zrna, ponašanje tijekom obrade i konačno iskorištenje hranjivih tvari (Kljak i sur., 2018). Izborom hibrida kukuruza za prehranu kokoši nesilica uzgajivači direktno mogu utjecati na sadržaj masnih kiselina u žumanjku. Prisutnost lipida smatra se važnim čimbenikom koji povećava apsorpciju i bioraspoloživost liposolubilnih hranjivih tvari iz različitih prehrambenih izvora. Važnost tipa i količine masti u potpunim krmnim smjesama prikazana je u istraživanju Papadopoulou i sur. (2019), čiji su rezultati pokazali da je sadržaj luteina, zeaksantina, cis-luteina i ukupnih karotenoida bio veći u jajima nesilica hranjenih sa smjesama niske energetske vrijednosti i višim omjerom nezasićenih i zasićenih masnih kiselina u usporedbi s jajima nesilica hranjenih smjesom s niskom energetskom vrijednošću i nižim omjerom nezasićenih i zasićenih masnih kiselina. Slično tome, jaja nesilica hranjenih hranidbenim tretmanima s visokim udjelom oleinske kiseline iz kikirikija imala su intenzivniju boju žumanjka i višu razinu  $\beta$ -karotena nego jaja nesilica hranjenih konvencionalnim krmivima od kukuruza i soje (Toomer i sur., 2019). Ferreira i sur. (2022) navode da dodatak 0,01 % emulgatora u krmne smjese za kokoši nesilice na bazi soje i kukuruza rezultira povećanim vrijednostima boje žumanjka. Ovo poboljšanje moglo bi biti rezultat učinkovitog stvaranja i stabilizacije emulzija, što povećava enzimatsku probavu karotenoida, njihovu ugradnju u micelle i, posljedično, veći sadržaj u žumanjku. Dodavanje egzogenih emulgatora u hranidbu nesilica moglo bi biti jedna od strategija za poboljšanje potencijala pigmentacije kukuruznog zrna.



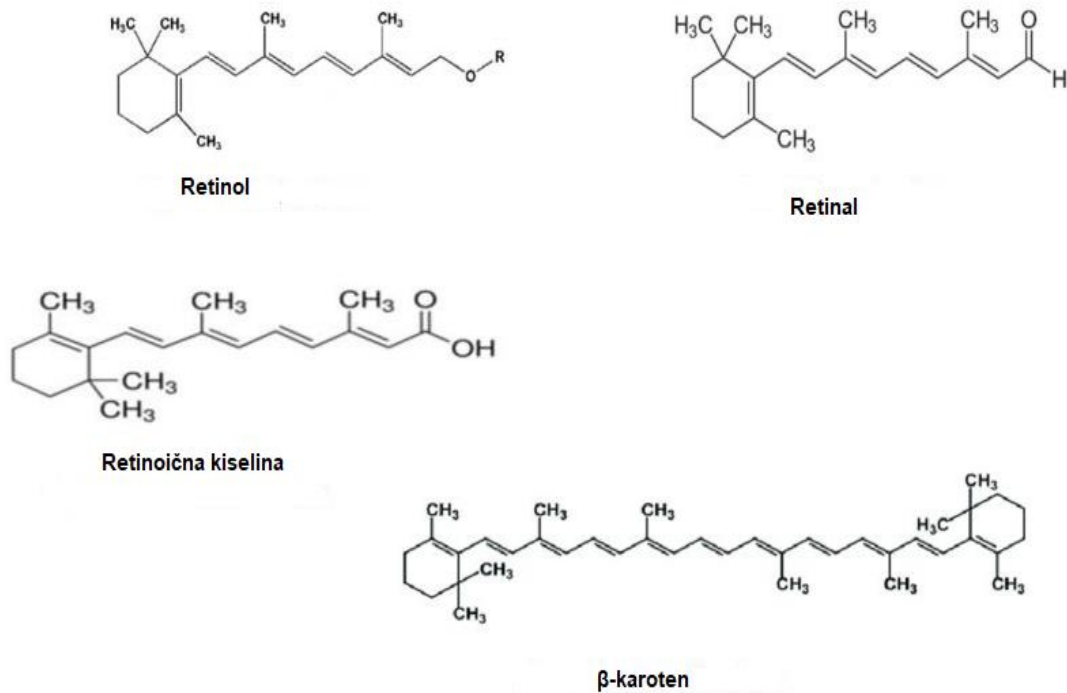
Slika 1. Prikaz različitih hibrida kukuruza (lijevo) te različitog omjera tvrdog i mekog endosperma (desno) (prema: Kljak i sur., 2024)

U krmivima za kokoši nesilice žuti kukuruz ne predstavlja samo primarni izvor energije, nego i prirodni izvor karotenoida. Sadržaj karotenoida u ishrani kokoši nesilica direktno utječe i na sadržaj karotenoida u žumanjku jajeta te na intenzitet njegove boje (Nabi i sur., 2020). Hibridi žutog kukuruza pokazuju značajne varijacije u sadržaju karotenoida (14,48 - 32,61 g/kg suhe tvari) te su karakterizirani višom koncentracijom ksantofila (lutein i zeaksantin) u odnosu na karotenoide provitamina A ( $\alpha$ -kriptoksantin,  $\beta$ -kriptoksantin i  $\beta$ -karoten) (Saenz i sur., 2021). Približno 95 - 97 % karotenoida nalazi se u endospermu zrna, dok su preostali raspoređeni između klice (2 - 4 %) i perikarpa (1 %). Prema novijim saznanjima omjer tvrdog i mekog endosperma utječe i na sposobnost skladištenja specifičnih karotenoida. Nedavnim istraživanjem Saenz i sur. (2021) su otkrili da su više razine ukupnih karotenoida i  $\beta$ -razgranatih karotenoida (zeaksantina,  $\beta$ -kriptoksantina i  $\beta$ -karotena) zabilježene u zrnu hibrida s tvrdim endospermom, dok su hibridi s mekim endospermom imali više razine  $\alpha$ -razgranatih karotenoida (luteina,  $\alpha$ -kriptoksantina i  $\alpha$ -karotena). Istraživanje Zurak i sur. (2024) je potvrdilo da na sadržaj i deponiranje karotenoida u žumanjku glavni utjecaj ima upravo omjer tvrdog i mekog endosperma korištenih hibrida kukuruza. Međutim, utvrdili su i da odabir odgovarajuće temperature sušenja i veličine mljevenja zrna povećava iskoristivost karotenoida. Bolje iskorištenje karotenoida iz zrna dovodi do povećanja intenziteta boje žumanjka, važnog atributa kvalitete jaja za potrošače.

### 1.3.2. Vitamin A

Vitamini su esencijalni organski spojevi koji su potrebni u malim količinama kako bi osigurali normalne metaboličke funkcije peradi. Djeluju kao kofaktori za različite enzimske reakcije i ključni su za rast, reprodukciju, imunološki odgovor i vid. Vitamin A je vitamin topiv u mastima koji se ne može proizvesti u tijelu pa se stoga unosi putem hrane, a u prehrani kokoši nesilica

igra ključnu ulogu u normalnoj funkciji vida, embrionalnom razvoju, rastu kostiju, funkciji imunološkog sustava i integritetu epitelnog tkiva. Pojam „vitamin A“ podrazumijeva tri kemijska spoja: retinol (alkohol), retinal (aldehid) i retinoičnu kiselinu, a još se nazivaju retinoidi (Carazo i sur., 2021)



Slika 2. Kemijske strukture derivata vitamina A (prema: Carazo i sur., 2021)

Najbolji izvori vitamina A u hrani za perad su riblje ulje i riblje brašno. Međutim, biljni pigmenti karotenoidi (npr. β-karoten) mogu pokazati aktivnost vitamina A putem metaboličke konverzije. Važno je napomenuti da kod sisavaca i ptica samo mali dio karotenoida prisutnih u prirodi može biti pretvoren u vitamin A. Modificiranje hrane za kokoši nesilice jedan je od pristupa osiguravanja dovoljne količine vitamina A. Nastoje se dodati sastojci poput različitih hibrida žutog kukuruza i alfalfa brašna, kao izvori β-karotena. U prehrani nesilica, dehidrirana alfalfa se ponekad koristi za poboljšanje boje žumanjaka zbog visokog sadržaja luteina i zeaksantina (neprovitaminski karotenoidi). Međutim, praktičnost korištenja dehidriranog alfalfa brašna često je ograničena zbog niskog energetskeg i proteinskog sadržaja te visoke koncentracije vlakana. Iako β-karoten ima potencijal poslužiti kao izvor vitamina A kod životinja, njegov doprinos ograničen je faktorima kao što su varijabilan sadržaj β-karotena u sirovinama, ograničena i nepredvidiva apsorpcija i konverzija u vitamin A, niska stabilnost te utjecaj starosti životinje, genetika, zdravstveno stanje i stres (Donalson i sur., 2005). Posljedično, drugi univerzalno korišten i dokazano učinkovit pristup je dodavanje sintetičkih izvora vitamina A, prvenstveno u obliku retinil acetata. Tako se nesilicama osigurava konzistentan i lako dostupan

izvor ovog ključnog mikronutrijenta te omogućuje precizna kontrola razine vitamina A u prehrani, osiguravajući optimalnu suplementaciju bez rizika od prekomjernog unosa (EFSA, 2013).

Nedostatak vitamina A može imati ozbiljne posljedice na zdravlje peradi, kompromitirajući rast, reprodukciju, imunološku sposobnost i ukupnu produktivnost. Akutna hipovitaminoza A rijetka je kod kokoši nesilica jer se retinol u obliku retinil acetata obično dodaje putem premiksa u potpune krmne smjese. Različiti faktori pridonose pojavi hipovitaminoze A, kao što su neispravni premiksi i formulacije hrane, nepravilni uvjeti skladištenja premiksa i hrane te neodgovarajuće prakse upravljanja hranom (Shojadoost i sur., 2021). Perad uzgajana intenzivnim stočarstvom može biti posebno osjetljiva na suboptimalne razine mikronutrijenata zbog prisutnosti negativnih okolišnih faktora i stresa. Ovi faktori uključuju visoku temperaturu okoliša, nedostatak prostora za kretanje, mikrobne izazove i higijenske probleme. U takvim uvjetima, potreba za vitaminom A kod peradi može se povećati. Nedostatak vitamina A također utječe na metabolizam drugih vitamina topljivih u mastima zbog konkurencije u transportu i apsorpciji. Kao rezultat toga, značajno povećanje vitamina A u prehrani može smanjiti razvoj ili proizvodnju jaja ometanjem apsorpcije drugih vitamina. Prekomjerna količina vitamina A uzrokuje kongenitalne abnormalnosti tijekom embrionalnog razvoja, a predoziranje vitaminom A smanjuje proizvodnju jaja kod nesilica (Shah i sur., 2022).

Različiti parametri reproduktivne učinkovitosti kao što su težina jaja, broj jaja, masa jaja, prinos jaja, plodnost ili kvaliteta bjelanjka poboljšani su dodatkom vitamina A u hranu za kokoši nesilice. Abd El-Hack i sur. (2017) istraživali su tri razine suplementacije vitamina A: 0 IJ/kg, 8000 IJ/kg i 16000 IJ/kg. Rezultati su pokazali da je suplementacija vitamina A do 16,000 IJ/kg hrane imala značajan pozitivan učinak ( $p < 0.05$ ) na broj jaja, masu jaja i kvalitetu bjelanjka u usporedbi s kontrolnom grupom koja je dobivala 0 IJ vitamina A/kg hrane.

### 1.3.3. Minerali

Kvaliteta ljuske jedan je od ključnih aspekata uspješne proizvodnje jaja jer slomljena i napukla ljuska predstavljaju značajne gubitke za proizvođače. Osim toga, demineralizacija kostiju visokoproduktivnih kokoši nesilica može rezultirati povećanom osteoporozom i frakturama kostiju, posebno pred kraj nesivosti. Učinkovitost korištenja mikrominerala važna je tema u suvremenoj prehrani peradi zbog toga što su esencijalni za normalan rast i mnoge metaboličke procese u živim organizmima. Katalizatori su i dijelovi enzimskih sustava u većini stanica (Swiątkiewicz i sur., 2014), uključujući formiranje kostiju kokoši nesilica i ljuske jaja te razvoj embrija (Barber i sur., 2005).

Elementi u tragovima poput bakra, mangana, cinka, željeza i selena su ključni za proizvodnju jaja i razne fiziološke funkcije kod kokoši nesilica. Služe kao sastavni dijelovi metaloenzima u

formiranju slojeva ljuske jaja ili direktno interferiraju s kalcitnim kristalima tijekom formiranja ljuske (Olukosi i sur., 2019). Suplementacija manganom utječe na formiranje ljuske jajeta povećanjem gustoće mjesta nukleacije - gdje se kalcitni kristali inicijalno talože na unutarnjoj membrani ljuske i započinju razvoj ljuske jajeta, a naknadno povećava debljinu ljuske i njezinu čvrstoću. Mangan također može promijeniti morfologiju kalcitnih kristala, što može utjecati na ultrastrukturu i teksturu ljuske jajeta (Zhang i sur., 2017). Bakar sudjeluje u aktivnosti lizil-oksidge, enzima koji je važan za stvaranje kolagenskih veza prisutnih u membrani ljuske jajeta. Nedostatak bakra u prehrani nesilica rezultira smanjenom enzimskom aktivnošću, što smanjuje proizvodnju elastina te sprječava odgovarajuće umrežavanje proteina membrane ljuske. Nastaju jaja s abnormalnim teksturama, oblicima i veličinama ili jaja bez ljuske (Leeson i Summers, 2001). Cink je kofaktor karboanhidraze, koja opskrbljuje karbonatne ione tijekom formiranja ljuske jajeta. Stoga, nedostatak cinka rezultira smanjenom težinom ljuske jajeta. Željezo je sastavni dio hemoglobina i mioglobina te sudjeluje u oksidaciji, redukciji i transportu elektrona, što je neophodno za mnoge integralne fiziološke procese organizma (Andrews, 2002). Selen djeluje u antioksidativnim sustavima, kao komponenta seleno-proteina, i djeluje neizravno ili izravno u smanjenju oksidativnog stresa. Selen je jedan od najvažnijih elemenata u procesima reprodukcije. Prehrana s nedostatkom selena može rezultirati smanjenjem broja spermija, pokretljivosti i sposobnosti oplodnje (Moreira i sur., 2001).

Većina izvora minerala koji se koriste u prehrani kokoši nesilica potječe od anorganskih spojeva poput oksida, sulfata, karbonata i fosfata (Seyfori i sur., 2019). Antagonizmi među anorganskim mineralima u prehrani mogu dovesti do smanjene apsorpcije. Kako bi se to spriječilo prekomjerne količine anorganskih mineralnih soli dodaje se u komercijalne prehrane smjese, što može izazvati probleme sa zagađenjem okoliša (Gheisari i sur., 2011). Trend u korištenju anorganskih izvora minerala promijenio se prema organskim, na temelju pretpostavke da dodani organski vezani minerali mogu biti biološki dostupniji od anorganskih minerala. Minerali vezani na aminokiseline koriste isti put apsorpcije kao i aminokiseline na koje su vezani. To smanjuje kompeticiju za anorganska transmineralna vezna mjesta i u konačnici smanjuje izlučivanje minerala putem žuči i fecesa (Singh i sur., 2015). Organski tragovi minerala ne disociraju u kiselom želučanom pH okruženju, ostajući elektronski neutralni i zaštićeni od kemijskih reakcija s drugim molekulama u crijevnom lumenu. Kao posljedica toga, dolazi do optimizacije apsorpcije i veće bioraspoloživosti u odnosu na anorganske izvore (Świątkiewicz i sur., 2014).

Qu i sur. (2020) su primijetili da prehrana kokoši nesilica dopunjena proteinski vezanim mineralima u količini koja je za 2/3 manja od uobičajene komercijalne razine može održavati proizvodnju peradi i debljinu ljuske jajeta unutar normalnih vrijednosti. Star i sur. (2012) su

otkrili da je cink kompleksiran s aminokiselinama biološki dostupniji od  $ZnSO_4$ , što je dokazano analizom sadržaja cinka u tibiji.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA**

### **2.1. Cilj istraživanja**

Prethodno provođenju istraživanja, postavljeni su opći i specifični ciljevi rada.

Opći ciljevi uključuju upoznavanje i primjenu metoda istraživanja za utvrđivanje korisnosti hranidbenih tretmana na kvalitetu i sastavu masnih kiselina. Kako bi se pridonijelo općem cilju, u okviru ovoga rada postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

- Utvrditi razlike u sastavu masnih kiselina između dva hibrida kukuruza (Bc572 i Os403).
- Istražiti utjecaj gore navedenih hibrida kukuruza te suplementacije vitaminom A i mineralima iz različitih izvora na sastav masnih kiselina smjesa korištenih za hranidbu kokoši nesilica.
- Istražiti utjecaj različitih smjesa na sastav masnih kiselina u jajima, njihove omjere i zdravstvene indekse izračunate na temelju udjela masnih kiselina.
- Istražiti utjecaj navedenih tretmana na unutarnje i vanjske parametre kvalitete jaja.
- Iz dobivenih rezultata zaključiti na koji način modificirati smjese kako bi korišteni tretmani bili optimalni za što bolju kvalitetu jaja.

### **2.2. Hipoteza**

Dobiveni rezultati istraživanja potvrdit će ili negirati sljedeće pretpostavke:

- Sastav masnih kiselina značajno se razlikuje među hibridima kukuruza te je isti profil masnih kiselina prisutan u smjesama za hranidbu kokoši.
- Hibridi kukuruza, vitamin A i minerali iz različitih izvora imaju značajan utjecaj na sastav masnih kiselina u jajima te samim time na omjere masnih kiselina i zdravstvene indekse izračunate na temelju udjela masnih kiselina u jajima.
- Hibridi kukuruza, vitamin A i minerali iz različitih izvora imaju značajan utjecaj na kvalitetu jaja, odnosno na unutarnje i vanjske parametre kvalitete.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Jaja Lohmann Brown kokoši nesilica

Za potrebe izvođenja znanstveno-istraživačkog rada korištena su svježa jaja Lohmann Brown kokoši nesilica (Slika 3.) iz pokusnog peradarnjaka na Agronomskom fakultetu u Zagrebu gdje se provodio *in vivo* pokus s ciljem ispitivanja utjecaja različitih hranidbenih tretmana na biodostupnost karotenoida zrna dva hibrida kukuruza (Os 403 i Bc 572). Kako bi se kokoši nesilice očistile od rezervi karotenoida i ostalih tvari nastalih hranjenjem komercijalnim smjesama, bile su hranjene potpunim krmnim smjesama na bazi kukuruza bijelog zrna i bez dodatka ostalih tvari koje bi mogle utjecati na eksperimentalne rezultate, sadržaj prikazan u Tablici 1. Nakon toga započet je pokusni hranidbeni tretman u trajanju od osam tjedana uključujući razdoblje stabilizacije i uzorkovanja. Sve potpune krmne smjese su sastavljene tako da zadovoljavaju hranidbene potrebe Lohmann Brown kokoši nesilica u vrhu nesivosti. Za ciljeve ovog istraživanja uzorci jaja su bili pakirani u kartonskim kutijama te pohranjeni u hladnjaku na 4 °C prije analiza.



Slika 3. Uzorci jaja (vlastita fotografija)

Tablica 1. Sastav potpunih krmnih smjesa prije pokusnih tretmana

<b>Krmiva</b>	<b>Udjel (%)</b>
Kukuruz bijelog zrna	63,00
Pšenične posije	3,00
Sojina sačma	21,40
Ulje suncokreta	3,00
Vapnenac	8,00
MonoCaP	0,90
Sol	0,30
Metionin	0,15
Vitamini	0,12
TRT Layer, Alltech	0,13
<b>Ukupno</b>	<b>100,00</b>

### 3.1.2. Potpune krmne smjese i hibridi kukuruza

Za pripremu potpunih krmnih smjesa za kokoši nesilice korištena su dva hibrida kukuruza Os 403 i Bc 572. Kukuruzna zrna osušena su mobilnom sušarom pri 85 °C te potom samljevena na mlinu sa sitom od 6 mm. Za hranidbene tretmane pripravljeno je šest različitih premiksa za svaki hibrid. Premiksi su sastavljeni tako da sadrže tri razine dodatka vitamina A (5000, 10000 i 20000 IJ/kg smjese) te anorganski ili organski oblik mikrominerala (Zn,Cu, Mn, Fe i Se). Kao izvor organskih mikrominerala izabran je Bioplex® (Bioplex Cu 12%, Bioplex Fe 15%, Bioplex Mn 20%, Bioplex Zn 20%) i Sel-Plex® (Se - Sel-Plex (Bio) 0,30%) (Alltech, Nicholasville, SAD). Anorganski izvori navedenih mikrominerala su bili bakrov sulfat, željezov sulfat, manganov oksid, cinkov oksid i SelenPx 1%.

Tablica 2. Receptura za potpune krmne smjese tijekom pokusnog tretmana

Krmne smjese	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
<b>Ukupno</b>	<b>100,00</b>

U 1 kg smjese premiksi su osiguravali količine vitamina i mikrominerala prikazanih u sljedećoj tablici:

Tablica 3. Količina vitamina i mikrominerala u premiksima

Hranidbeni tretmani						
Oblik mikrominerala	Anorganski			Organski		
Vitamin A	5000	10000	20000	5000	10000	20000
	u kg premiksa					
Vitamin A, IJ	5000	10000	20000	5000	10000	20000
Vitamin D, IJ	2500					
Vitamin E, mg	20					
Vitamin K, mg	3					
Vitamin B1, mg	1					
Vitamin B2, mg	4					
Vitamin B6, mg	3					
Vitamin B12, mg	25					
Pantotenska kiselina, mg	10					
Nikotinamid, mg	30					
Folna kiselina, mg	0,5					
Biotin, mg	50					
Kolin, mg	40					

\*Tablica 3. nastavak

Zn, mg	80	80	80	30	30	30
Mn, mg	80	80	80	30	30	30
Cu, mg	10	10	10	5	5	5
Fe, mg	10	10	10	5	5	5
Se, mg	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2
I, mg	1					

Dakle, ukupno je sastavljeno 12 eksperimentalnih smjesa prema faktorijalnom dizajnu pokusa: 2 hibrida (Os 403 i Bc 572) × 3 razine dodatka vitamina A (5000, 10000 i 20000 IJ/kg) × 2 oblika mikrominerala (organski i anorganski). Sadržaj glavnih hranjivih tvari u pripremljenim smjesama prikazan je Tablici 4., a u Tablici 5. pojašnjene su kratice korištene u tekstu za opis pojedine smjese i tretmana:

Tablica 4. Sadržaj glavnih hranjivih tvari u krmnim smjesama

Tretman	Hibrid	Vitamin A / IJ/kg	Oblik mikrominerala	Vlaga	Sirovi pepeo	Sirovi proteini	Sirove masti	Sirova vlakna	Škrob	Šećeri
<b>T1</b>	Os 403	5000	Anorganski	93	131	177,5	56	29	378,3	31,5
<b>T2</b>		10000	Anorganski	90	134	175,9	55	31	384,5	31,4
<b>T3</b>		20000	Anorganski	90	123	172,8	56	26	383,7	34,0
<b>T4</b>		5000	Organski	90	131	177,9	57	29	388,8	35,4
<b>T5</b>		10000	Organski	87	129	173,3	57	28	379,3	30,0
<b>T6</b>		20000	Organski	86	122	171,8	57	30	387,4	34,1
<b>T7</b>	Bc 572	5000	Anorganski	95	128	169,7	57	30	374,5	29,5
<b>T8</b>		10000	Anorganski	93	128	177,9	55	28	375,6	33,1
<b>T9</b>		20000	Anorganski	91	132	166,1	53	28	375,8	36,3
<b>T10</b>		5000	Organski	90	130	168,8	60	26	376,5	35,8
<b>T11</b>		10000	Organski	91	130	173,8	55	26	373,9	35,2
<b>T12</b>		20000	Organski	91	129	173,7	55	26	384,5	32,6

Tablica 5. Kratice korištene za opisi pojedine smjese i tretmana s pripisanim hibridom, izvorom minerala i koncentracijom vitamina A

<b>Smjese za hranidbu</b>	<b>Hranibneni tretman</b>	<b>Hibrid kukuruza</b>	<b>Izvor minerala</b>	<b>Vitamin A (IJ/kg)</b>
K1	T1	Bc572	Anorganski	5000
K2	T2			10000
K3	T3			20000
K4	T4		Organski	5000
K5	T5			10000
K6	T6			20000
K7	T7	Os403	Anorganski	5000
K8	T8			10000
K9	T9			20000
K10	T10		Organski	5000
K11	T11			10000
K12	T12			20000

### 3.1.3. Kemikalije

U eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- Deionizirana voda
- Propan-2-ol: ACS grade (Carlo Erba Reagents, Rodano, Italija),  $C_3H_8O$
- Cikloheksan: ACS grade (Fisher Chemical, Hampton, USA),  $C_6H_{12}$
- Izooktan,  $C_8H_{18}$
- Metanolna otopina kalijeva hidroksida, KOH (c = 2 mol/L)
- Natrijev hidrogensulfat monohidrat,  $NaHSO_4 \times H_2O$

### 3.1.4. Aparatura

U provedbi istraživanja korištena je sljedeća aparatura:

- Analitička vaga (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- Ultra-Turrax (IKA- Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Njemačka)
- Centrifuga (ROTINA 380 R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Njemačka)
- Rotavapor (B-490, BÜCHI, Flawil, Švicarska)
- Sušionik (ST-01/02, Instrumentaria Zagreb, Hrvatska)
- Prinski kromatograf (Agilent Technologies 6890N Network GC System, Santa Clara, SAD)
- pH-metar (pH METER, Pye Model 292, Pye Unicam)
- Spektrofotometar (CM-700d, Minolta, Japan)
- Digitalni mikrometar, (QuantuMike IP65, Mitutoyo, Japan)

### 3.1.5. Pribor

- Tikvice s okruglim dnom
- Pipete
- Staklene epruvete s čepom, 10 mL

- Staklene vijale za plinsku kromatografiju
- Falkon epruvete
- Staklene čaše volumena 50 mL, 100 mL, 200 mL i 250 mL
- Automatske pipete
- Nastavci za automatske pipete

### 3.1.6. Programski paketi

- Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, SAD)
- SPSS 17.0 program (StatSoft Inc, Tulsa, Oklahoma, USA)
- Statistica 13.0 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, SAD)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Određivanje fizikalnih svojstava jaja

#### 3.2.1.1. Određivanje dimenzija jaja

Pomoću pomičnog mjerila izmjerena je dužina i širina osam jaja iz svakog eksperimentalnog tretmana. Za svako jaje postupak je ponovljen tri puta te je izračunata srednja vrijednost za svako jaje.

Indeks oblika definiran je kao omjer dužine i širine jaja te je izračunat prema formuli Kralik i sur., 2008 za svako jaje (1).

$$\text{Indeks oblika (\%)} = \frac{\text{širina jajeta (cm)}}{\text{dužina jajeta (cm)}} \times 100 \quad (1)$$

#### 3.2.1.2. Određivanje mase cijelih jaja, žumanjka i bjelanjka

Osam cijelih jaja iz svakog eksperimentalnog tretmana je izvagano na analitičkoj vagi (ABT 220-4M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka) te je zapisana njihova masa (g). Potom su razbijena te im je žumanjak u potpunosti odvojen od bjelanjka. Žumanjak je također izvagan i zapisana je njegova masa (g). Ljuska, osušena na sobnoj temperaturi, je izvagana i zapisana je njena masa (g). Zatim je pomoću digitalnog mikrometra s točnošću od 0,001 mm određena debljina ljuske u tri paralele za svako jaje. Izmjereni parametri korišteni su za izračun udjela žumanjaka (2), udjela bjelanjaka (3) i udjela ljuske (4) prema ispod navedenim formulama (Alkan i sur., 2013).

$$\text{Udio žumanjka (\%)} = \frac{\text{masa žumanjka (g)}}{\text{masa jajeta (g)}} \times 100 \quad (2)$$



$$\text{Udio bjelanjka (\%)} = \frac{\text{masa bjelanjka (g)}}{\text{masa jajeta (g)}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Udio ljuske (\%)} = \frac{\text{masa ljuske (g)}}{\text{masa jajeta (g)}} \times 100 \quad (4)$$

Pomoću prikupljenih podataka o masi jaja izračunata je njihova površina prema formuli (5) Paganelli i sur. (1974).

$$\text{Površina jaja (cm}^2\text{)} = 4,835 \times \text{masa jajeta (g)}^{0,662} \quad (5)$$

### 3.2.1.3. Određivanje pH vrijednosti bjelanjka i žumanjka

pH vrijednost je određena za posebno za žumanjak i bjelanjak za svaki od eksperimentalnih tretmana u tri paralele pri sobnoj temperaturi. Mjerenje pH vrijednosti provođeno je na pH-metru (pH METER, Pye Model 292, Pye Unicam). Uzorci su dodani u čaše od 50 mL te je u njih uronjena elektroda digitalnog pH-metra. Za svaki uzorak pH je očitavana i zapisana nakon 5 minuta od uranjanja elektrode.

### 3.2.1.4. Određivanje boje ljuske jajeta i žumanjka

Princip metode: Korištena metoda za kvantificiranje boje ljuske i žumanjka jajeta zasniva se na CIElab kolorimetrijskom prostoru. U kojem parametar  $L^*$  određuje svjetlinu uzorka te je iskazan vrijednostima od 0 do 100 (0 = crno; 100 = bijelo). Vrijednost parametra  $a^*$  je iskazana vrijednostima od -60 do 60, a predstavlja spektar od crvene (pozitivne vrijednosti) do zelene (negativne vrijednosti) boje, pri čemu veća vrijednost  $a^*$  parametra karakterizira crveniju boju. Vrijednost  $b^*$  parametra ukazuje na spektar nijansi između plave i žute boje, a njegova veća vrijednost označava izraženost žutog dijela spektra. Kombinacijom  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti dobivamo boju uzorka, pri čemu  $L^*$  predstavlja svjetlinu te boje (Samuillah i sur., 2015).

Postupak rada: Za određivanje boje ljuske i žumanjka osam jaja iz svakog eksperimentalnog tretmana korišten je spektrofotometar (CM-700d, Minolta, Japan) pomoću kojeg su određene  $L^*$  (svjetlina),  $a^*$  (crvenilo) i  $b^*$  (žutilo) vrijednosti.

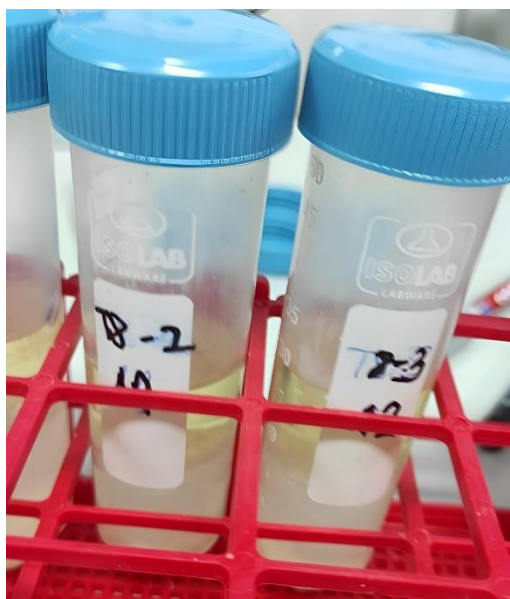
## 3.2.2. Određivanje udjela masti i sastava masnih kiselina

### 3.2.2.1. Određivanje udjela masti po Smedesu

Princip metode: Metoda se bazira na ekstrakciji masti pomoću organskih otapala, cikloheksana i propan-2-ola. Dodatkom vode postiže se prelazak masti u nepolarnu organsku fazu, odnosno cikloheksanski sloj. Nakon odvajanja faza centrifugiranjem potrebno je izdvojiti otapalo od ekstrakta masti otparavanjem te gravimetrijski odrediti njen udio.

Postupak rada: U tubu za centrifugu volumena 50 mL, izvagan je 1 g žumanjka i dodano 18 mL otopine A (propan-2-ol – cikloheksan (w/w), 16 g propan-2-ol + 20 g cikloheksan). Uzorak je 2 minute homogeniziran na Ultra – Turaxxu pri 11000-13000 okretaja u minuti te mu je

dodano 10 mL deionizirane vode nakon čega je opet homogeniziran 1 minutu. Potom je tuba za centrifugu zatvorena i postavljena u uređaj za centrifugiranje na 5 minuta na 2000 okretaja u minuti prilikom čega je došlo do odvajanja faza (Slika 4.).



Slika 4. Prikaz odvajanja faza (vlastita fotografija)

Gornja organska faza je kvalitativno odvojena pipetom u prethodno osušenu i izvaganu tikvicu s okruglim dnom. Preostaloj vodenoj fazi dodano je 10 mL otopine B (13 % otopina propan-2-ol – cikloheksan (w/w), 13 g propan-2-ol + 87 g cikloheksan) nakon čega je uzorak homogeniziran na Ultra-Turaxxu 1 minutu pri istom broju okretaja. Tuba za centrifugu je ponovno postavljena u uređaj te je izvršeno centrifugiranje pri istim uvjetima. Po završetku centrifugiranja, odvojena je gornja organska faza u tikvicu s okruglim dnom koja je sadržavala prvi ekstrakt. Iz tikvice je pomoću rotavapora pri temperaturi 51 °C i tlaku 235 mbar otpareno organsko otapalo, nakon čega je uslijedilo sušenje u sušioniku 1 h na temperaturi 105 °C. Tikvica je nakon sušenja izvagana i preračunat je udio ekstrahirane masti prema formuli (6):

$$Količina\ masti = \frac{a * 100}{b} [\%] \quad (6)$$

gdje je :

a – masa ekstrahirane masti (g)

b – masa uzorka (g)

#### 3.2.2.2. Određivanje sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom

Prije određivanja sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom potrebno je masne kiseline prevesti u njihove metilne estere. Korišten je standardizirani postupak pripreme metilnih etera metodom po Bannonu (ISO 12966-2, 2017) pomoću metanolizacije u prisutnosti

kiselog ili baznog katalizatora. Odvagano je 60 mg prethodno ekstrahirane masti u epruvetu od 10 mL s čepom te otopljeno u 4 mL izooktana. Zatim je u epruvetu dodano 200  $\mu$ L metanolne otopine KOH ( $c = 2M$ ). Epruveta je po dodatku KOH snažno protresena 30 sekundi te ostavljena na sobnoj temperaturi da se provede reakcija i reakcijska smjesa ne izbistri. Nakon što se reakcijska smjesa izbistrila, odvojen je glicerolni sloj na dnu epruvete. U epruvetu je potom dodano 1 g natrijeva hidrosulfata monohidrata kako bi se smjesa neutralizirala. Bistra otopina prebačena je u vijalicu.

Analiza metilnih estera masnih kiselina provodila se plinskom kromatografijom po metodi ISO 12966-4:2015. Uzorak pripremljen u vijalici analiziran je na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD), opremljenom plameno-ionizacijskim detektorom (FID) koji je spojen na računalo. Uzorak prolazi kroz kapilarnu kolonu plinskog kromatografa pomoću plina nosioca, koja razdvaja komponente temeljem njihovih kemijskih svojstava i interakcije s unutrašnjom površinom kolone. Uvjeti analize su optimizirani nakon preliminarnih ispitivanja i uneseni u kompjuterski sustav. Korištena je kapilarna kolona DB-23 (Agilent) duljine 60 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine filma 0,25  $\mu$ m s cijanopropil-silikonom kao stacionarnom fazom. Temperaturni program započinje na 60 °C, raste brzinom od 7 °C/min do 220 °C, koja se održava 17 minuta. Helij je korišten kao plin nosioc pri protoku od 1,5 mL/min, a temperatura detektora je bila 280 °C. Injektirana količina uzorka bila je 1  $\mu$ L. Identifikacija pojedinih masnih kiselina izvršena je usporedbom vremena zadržavanja metilnih estera pojedine masne kiseline uzorka s vremenima zadržavanja metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24, Supelco). Za obradu podataka korišten je program Star GC Workstation 6.4 (Varian, Palo Alto, CA, SAD). Rezultati su izraženi kao postotak (%) zastupljenosti pojedinih masnih kiselina.

### 3.2.2.3. Procjena nutritivne i zdravstvene kvalitete jaja

Na temelju rezultata analize masnih kiselina u lipidima jaja izračunati su indeksi koji su značajni s nutritivnog i zdravstvenog stajališta:

- aterogeni indeks (AI),
- trombogeni indeks (TI),
- hipo/hiperkolesterolemični indeks (HHI),
- izračun poželjnih masnih kiselina (DFA),
- indeks zasićenja (SI) i
- indeks peroksidabilnosti (PI).

AI, TI i SI indeksi su izračunati prema Ulbricht i Southgate (1991), dok je HHI prema Santos-Silva i sur. (2002) koristeći sljedeće formule:

$$AI = (4 \times C14:0 + C16:0 + C18:0) / (\sum MUFA + \sum n-6 PUFA + \sum n-3 PUFA) \quad (7)$$

$$TI = (C14:0 + C16:0 + C18:0) / (0,5 * \sum MUFA + 0,5 * \sum n-6 PUFA + 3 * \sum n-3 PUFA + (\sum n-3 PUFA / \sum n-6 PUFA)) \quad (8)$$

$$SI = (C14:0 + C16:0 + C18:0) / (\sum MUFA + \sum PUFA) \quad (9)$$

$$HHI = (C18:1 n-9 + C18:2 n-6 + C20:4 n-6 + C18:3 n-3 + C20:5 n-3 + C22:5 n-3 + C22:6 n3) / (C14:0 + C16:0) \quad (10)$$

PI indeks je izračunat prema Arakawa i Sagai (1986) koristeći formulu:

$$PI = (\% \text{ mononezasićene} \times 0.025) + (\% \text{ dinezasićene} \times 1) + (\% \text{ trinezasićene} \times 2) + (\% \text{ tetrannezasićene} \times 4) + (\% \text{ pentanezasićene} \times 6) + (\% \text{ heksanezasićene} \times 8) \quad (11)$$

Izračun poželjnih masnih kiselina (DFA) izračunat je prema Pilarczyk i sur. (2015):

$$DFA = (\sum MUFA + \sum PUFA) + C18:0 \quad (12)$$

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

### 3.2.3. Statistička analiza

Rezultati istraživanja obrađeni su pomoću dva statistička programa. Za obradu parametara kvalitete jaja (pH, boja žumanjka i ljuske, debljina ljuske, masa jaja i žumanjka, udio pojedine komponente jaja, indeks oblika), sastav masnih kiselina te zdravstvene indekse lipida i indekse metabolizma masnih kiselina korišten je statistički program SPSS 17.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, SAD). Statistički izračun proveden je multivarijantnom analizom varijance (MANOVA), a međusobni odnos uzoraka utvrđen je post-hoc Tukey HSD metodom uz razinu značajnosti  $p < 0,05$ . Analiza općeg linearnog modela koristila se za procjenu učinaka hibrida kukuruza (H), vitamina A (V) i minerala (M) kao fiksnih čimbenika, a provedena je i analiza interakcije hibrida i vitamina A (H x V), hibrida i minerala (H x M), minerala i vitamina A (M x V) te hibrida, minerala i vitamina A (H x M x V) na poučavane parametre.

#### **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U sljedećim poglavljima prikazani su rezultati analiza provedenih prema metodama navedenim u poglavlju 3. ovog rada. Određivan je sastav masnih kiselina hibrida kukuruza Bc572 i Os403 prikazan u Tablici 6 te utjecaj istih uz dodatak vitamina A i minerala iz različitih izvora na sastav masnih kiselina smjesa za hranidbu kokoši (Tablica 7) i jaja (Tablica 8). Provedena je procjena nutritivne i zdravstvene vrijednosti jaja na temelju sastava masnih kiselina (Tablica 9). Nadalje, u Tablicama 10 i 11 prikazan je utjecaj hibrida kukuruza, vitamina A i minerala iz različitih izvora na vanjske i unutarnje parametre kvalitete jaja.

##### **4.1. Sastav masnih kiselina hibrida kukuruza**

Kukuruz je jedna od preferiranih žitarica za hranidbu kokoši nesilica zbog visoke energetske vrijednosti, niskog udjela vlakana te prisutnosti pigmenata i esencijalnih masnih kiselina. Zbog visoke energetske vrijednosti udio kukuruza u smjesama za hranidbu kreće se od 60 do 70 % te u takvim smjesama, kukuruz zadovoljava približno 30 % potreba peradi za proteinima (Prakash, 2014). Budući da kokoši nemaju sposobnost sinteze pigmenata, iznimno je važan sastav pigmenata u smjesama za hranidbu kako bi se omogućio transport pigmenata u žumanjak. Stoga, karotenoidi žumanjka su izravan odraz karotenoida iz smjesa za hranidbu (Kljak i sur., 2012).

U Tablici 6. prikazan je sastav masnih kiselina u hibridima (Bc572 i Os403) kukuruza korištenim u krmivima kokoši nesilica.

Tablica 6. Rezultati određivanja sastava masnih kiselina u kukuruznim hibridima

Hibrid	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 cis	C18:2 cis	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:2
<b>Bc572</b>	11,32	0,20	1,86	27,13	57,25	1,11	0,41	0,24	0,12	0,36
<b>OS403</b>	11,29	0,37	2,02	28,15	55,75	1,17	0,43	0,26	0,18	0,38
<b>SEM</b>	0,01	0,08	0,08	0,51	0,75	0,03	0,01	0,01	0,03	0,01
<b>p- vrijednost</b>	<i>0,903</i>	<b>0,001</b>	<b>0,029</b>	<b>0,031</b>	<b>0,004</b>	<b>0,027</b>	<i>0,493</i>	<b>0,038</b>	<b>0,028</b>	<i>0,951</i>

Hibrid	SFA	MUFA	PUFA	n6	n3	n6/n3	MUFA /SFA	PUFA /SFA	MUFA /PUFA
<b>Bc572</b>	13,70	27,57	58,72	57,25	1,11	51,58	2,01	4,29	0,47
<b>OS403</b>	13,92	28,78	57,30	55,75	1,17	47,65	2,07	4,12	0,50
<b>SEM</b>	0,11	0,60	0,71	0,75	0,03	1,65	0,03	0,08	0,02
<b>p-vrijednost</b>	<i>0,238</i>	<b>0,021</b>	<b>0,025</b>	<b>0,004</b>	<b>0,027</b>	<b>0,028</b>	<i>0,115</i>	<i>0,096</i>	<b>0,020</b>

\*U tablici su prikazane prosječne vrijednosti rezultata. SEM – standardna pogreška mjerenja;  $p < 0,05$  – postoji statistički značajna razlika;  $p > 0,05$  – ne postoji statistički značajna razlika

Na osnovu dobivenih rezultata određivanja sastava masnih kiselina u kukuruzu uočena je statistički značajna razlika između hibrida Bc572 i Os403. Glavna razlika uočena je u udjelima mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih (PUFA) masnih kiselina, te njihovom međusobnom omjeru i omjerima sa zasićenim masnim kiselinama (SFA). Od MUFA određene su: palmitoleinska (C16:1), oleinska (C18:1 cis) i gondoinska (C20:1), a od PUFA: linolenska (C18:2 cis), alfa-linolenska (C18:3n3) i erucinska (C22:2). Hibrid Os403 pokazuje statistički značajne ( $p < 0,05$ ) više vrijednosti MUFA s udjelom od 28,78 % u odnosu na Bc572 (27,57 %). S druge strane, hibrid Bc572 sadrži veći udio PUFA (58,72 %) u odnosu na hibrid Os403 (57,30 %). Stoga je, zbog manjeg sadržaja PUFA, omjer mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina (MUFA/PUFA) veći u hibridu Os403 (0,50) te se statistički značajno razlikuje od omjera u hibridu Bc572 (0,47).

Ukupni udio zasićenih masnih kiselina među hibridima nije se statistički značajno razlikovao ( $p > 0,05$ ). Statistički značajna razlika postojala je među udjelima stearinske masne kiseline (C18:0), koja je u hibridu Os403 bila više zastupljena (2,02 %). Također, zabilježen je i značajno veći udio beheninske masne kiseline (C22:0) u hibridu Os403 (0,18 %). Udjeli palmitinske (C16:0) i arahidonske (C20:0) masne kiseline nisu se statistički značajno razlikovali ( $p > 0,05$ ) među uzorcima kao ni omjeri MUFA/SFA i PUFA/SFA

Postojala je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u udjelima omega-6 (linolenska, C18:2 cis) i omega-3 (alfa-linolenska, C18:3) masnih kiselina kao i u njihovim omjerima. Veći udio

linolenske kiseline utvrđen je u hibridu Bc572, koji je iznosio 57,25 % u odnosu na hibrid O403 (55,75 %). Udio alfa-linolenske kiseline bio je nešto veći u hibridu Os403 te je iznosio 1,17 %. Prema tome, omjer omega-6 i omega-3 masnih kiselina bio je značajno veći u hibridu Bc572 (51,58) nego u Os403 (47,65). Dobiveni udjeli esencijalnih masnih kiselina u skladu su s znanstveno literaturom u kojima je naglašeno da kukuruzno ulje inače ima nepovoljan omjer omega-6 i omega-3 masnih kiselina. Udio omega-6 masnih kiselina u kukuruzu otprilike iznosi 56 %, a omega-3 otprilike 1 % (Grbeša, 2016). Omega-3 masne kiseline mogu utjecati na imunitet kokošiju te kasnije doprinijeti kvaliteti mesa i jaja. Stoga su današnja istraživanja uglavnom usredotočena na funkcionalno djelovanje i dodatak različitih oblika dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina u krmiva (Alagwany i sur., 2019).

#### **4.2. Utjecaj hibrida kukuruza, vitamina A i izvora minerala na sastav masnih kiselina krmiva**

U pripremljenim smjesama za hranidbu kokoši nesilica detektirane su iste masne kiseline kao u samim hibridima kukuruza, s nešto drugačijim udjelima koji ukazuju na utjecaj suplementiranih tvari. Sličan sastav masnih kiselina je očekivan, budući da je glavni izvor masnih kiselina u smjesama bilo upravo ulje iz hibrida kukuruza. No, primijećeno je da se javljaju u drugačijim udjelima što ukazuje na utjecaj suplementiranih tvari u krmnim smjesama.

U Tablici 7. prikazan je utjecaj tretmana na sastav masnih kiselina u smjesama korištenim za hranidbu kokoši nesilica

Tablica 7. Utjecaj hibrida kukuruza, vitamina A i izvora minerala na sastav masnih kiselina u smjesama za hranidbu kokoši nesilica

Smjesa	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:2
K1	9,19	0,13	3,02	28,75	56,90	0,70	0,33	0,20	0,50	0,29
K2	9,15	0,13	3,00	28,38	57,34	0,77	0,34	0,20	0,51	0,18
K3	8,93	0,13	3,09	28,63	57,31	0,72	0,34	0,20	0,54	0,11
K4	9,13	0,13	3,13	28,75	56,91	0,70	0,34	0,20	0,55	0,17
K5	9,34	0,13	3,11	28,73	56,71	0,75	0,35	0,21	0,54	0,13
K6	9,37	0,13	3,01	28,42	57,24	0,72	0,32	0,19	0,45	0,15
K7	9,24	0,15	2,97	28,51	57,16	0,78	0,34	0,21	0,49	0,15
K8	8,93	0,15	3,09	28,86	57,01	0,74	0,34	0,21	0,55	0,11
K9	9,20	0,15	2,96	28,48	57,25	0,76	0,34	0,20	0,46	0,19
K10	9,21	0,15	3,00	28,54	57,07	0,79	0,34	0,21	0,50	0,18
K11	9,07	0,15	3,05	28,52	57,20	0,78	0,35	0,21	0,53	0,13
K12	9,10	0,15	3,03	28,63	57,13	0,78	0,35	0,21	0,52	0,11
SEM	0,04	0,00	0,02	0,04	0,05	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01
Hibrid kukuruza (H)	0,148	< 0,001	0,004	0,678	0,081	< 0,001	0,018	0,011	0,777	0,425
Izvor minerala (M)	0,035	0,337	0,037	0,986	0,007	< 0,001	0,702	0,745	0,511	0,425
Vitamin A (V)	0,407	0,397	0,042	0,202	0,001	< 0,001	0,262	0,164	0,010	0,364
H x M	0,032	0,337	0,227	0,281	0,007	< 0,001	0,448	0,337	0,309	0,654
H x V	0,016	0,397	0,013	0,017	0,015	< 0,001	0,502	0,139	0,119	0,653
M x V	0,089	0,397	0,075	0,895	0,150	0,397	0,337	0,066	0,100	0,909
H x M x V	0,025	0,397	0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	0,086	0,139	0,001	0,323



\* Tablica 7. nastavak

Smjesa	SFA	MUFA	PUFA	n6	n3	n6/n3	MUFA/ SFA	PUFA/ SFA	MUFA/ PUFA
<b>K1</b>	13,03	29,08	57,89	56,90	0,70	81,81	2,23	4,44	0,50
<b>K2</b>	13,00	28,70	58,30	57,34	0,77	74,12	2,21	4,48	0,49
<b>K3</b>	12,90	28,96	58,14	57,31	0,72	79,16	2,25	4,51	0,50
<b>K4</b>	13,15	29,08	57,78	56,91	0,70	81,13	2,21	4,39	0,50
<b>K5</b>	13,34	29,07	57,59	56,71	0,75	75,92	2,18	4,32	0,50
<b>K6</b>	13,15	28,74	58,11	57,24	0,72	79,35	2,19	4,42	0,49
<b>K7</b>	13,05	28,87	58,08	57,16	0,78	73,45	2,21	4,45	0,50
<b>K8</b>	12,92	29,22	57,86	57,01	0,74	77,00	2,26	4,48	0,50
<b>K9</b>	12,97	28,83	58,20	57,25	0,76	74,98	2,22	4,49	0,50
<b>K10</b>	13,06	28,90	58,04	57,07	0,79	72,24	2,21	4,44	0,50
<b>K11</b>	13,00	28,89	58,11	57,20	0,78	73,03	2,22	4,47	0,50
<b>K12</b>	12,99	28,99	58,02	57,13	0,78	73,60	2,23	4,47	0,50
<b>SEM</b>	0,03	0,04	0,06	0,05	0,01	5,75	0,01	0,01	0,00
<b>Hibrid kukuruzna (H)</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,830</b>	<b>0,063</b>	<b>0,081</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,008</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>1,000</b>
<b>Izvor minerala (M)</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>1,000</b>	<b>0,005</b>	<b>0,007</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,128</b>
<b>Vitamin A (V)</b>	<b>0,011</b>	<b>0,175</b>	<b>0,009</b>	<b>0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,516</b>	<b>0,001</b>	<b>0,531</b>
<b>H x M</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,326</b>	<b>0,004</b>	<b>0,007</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,015</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,430</b>
<b>H x V</b>	<b>0,002</b>	<b>0,021</b>	<b>0,070</b>	<b>0,015</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,009</b>	<b>0,178</b>
<b>M x V</b>	<b>0,020</b>	<b>0,914</b>	<b>0,337</b>	<b>0,150</b>	<b>0,397</b>	<b>0,010</b>	<b>0,165</b>	<b>0,014</b>	<b>0,531</b>
<b>H x M x V</b>	<b>0,188</b>	<b>0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,010</b>	<b>0,050</b>	<b>0,006</b>	<b>0,032</b>

\*U tablici su prikazane srednje vrijednosti rezultata s pripadajućim standardnim pogreškama. SEM – standardna pogreška;  $p < 0,05$  – postoji statistički značajna razlika;  $p > 0,05$  – ne postoji statistički značajna razlika; H x M – interakcija hibrida i izvora minerala; H x V – interakcija hibrida i vitamina ; M x V – interakcija izvora minerala i vitamina A; H x M x V – interakcija hibrida, izvora minerala i vitamina

Ukupan udio SFA u smjesama varira od 12,90 % (K3) do 13,34 % (K5). Značajan utjecaj na udio zasićenih masnih kiselina imali su hibrid (H), vitamin A (V) i izvor minerala (M) te njihove međusobne interakcije. Hibrid, izvor minerala i njihova interakcija imali su najznačajniji utjecaj s p-vrijednosti manjom od 0,001. Usporedbom hibrida, nešto veći udjeli zasićenih masnih kiselina zabilježeni su u hibridu Bc572 u odnosu na hibrid Os403. Također, suplementacijom mineralima iz organskog izvora u oba hibrida zabilježen je porast udjela zasićenih masnih kiselina. Porastom koncentracije vitamina A uočen je pad udjela ukupnih SFA u smjesama pa tako npr. u tretmanima K10 - K12 porastom koncentracije vitamina A u smjesi s hibridom Os403 i mineralima iz organskog izvora udio zasićenih masnih kiselina opada redom: 13,06 % (K10), 13,00 % (K11) te 12,99 % (K12).

Promatranjem zasićenih masnih kiselina uočeno je sljedeće: udio palmitinske masne kiseline (C16:0) najveći je u tretmanu K6 (Bc572 hibrid, organski izvor, 20000 IJ/kg) i iznosi 9,37 % te je vrijednost niža u odnosu na udio palmitinske kiseline u samom Bc572 hibridu. Isto vrijedi i za Os403 hibrid. Značajan utjecaj na udio palmitinske kiseline imao je izvor minerala ( $p = 0,035$ ) te interakcije H x M ( $p = 0,032$ ), H x V ( $p = 0,016$ ) i H x M x V ( $p = 0,025$ ). Suprotno tome, udio stearinske masne kiseline (C18:0) veći je u smjesama nego u samim hibridima. Tako je npr. u smjesama s hibridom Bc572 najviši udio imao tretman K4 (3,13 %), a s hibridom Os403 tretman K8 (3,09 %). Na udio stearinske kiseline značajan utjecaj imali su hibrid ( $p = 0,004$ ), izvor minerala ( $p = 0,037$ ), vitamina A ( $p = 0,042$ ) te interakcije H x V ( $p = 0,013$ ) i H x M x V ( $p = 0,001$ ). Na udio arahidonske masne kiseline (C20:0) u smjesama značajan utjecaj imao je samo hibrid kukuruza ( $p = 0,018$ ) te su udjeli u odnosu na udjele u samom hibridu bili nešto niži. Udio beheninske masne kiseline (C22:0) varirao je od 0,45 % (K6) do 0,55 % (K4; K8) te su udjeli u odnosu na udjele u samim hibridima veći. Značajan utjecaj na udio beheninske kiseline u smjesama imali su koncentracija vitamina A ( $p = 0,01$ ) i interakcija H x M x V ( $p = 0,001$ ). Povećanjem koncentracije vitamina A uglavnom je uzorkovalo smanjenje udjela beheninske masne kiseline, osim kod tretmana K1 - K3 gdje je uočeno blago povećanje redom 0,50 %, 0,51 % i 0,54 %. Na ukupni udio mononezasićenih masnih kiselina značajan utjecaj imale su interakcije H x V ( $p = 0,021$ ) i H x M x V ( $p = 0,001$ ). Udio palmitinske masne kiseline (C16:1) u tretmanima K1-K6 iznosio je 0,13 %, a u tretmanima K7 - K12 0,15 %. Značajan utjecaj na udio imao je jedino hibrid te se jasno vidi da hibrid Os403 ima nešto viši udio palmitinske kiseline od Bc572. U odnosu na same hibride udio je u oba seta tretmana bio niži. Na udio oleinske masne kiseline (C18:1cis) hibrid nije imao značajan utjecaj, kao ni izvor minerala i vitamin A. Značajan utjecaj imale su interakcije H x V ( $p = 0,017$ ) i H x M x V ( $p = 0,001$ ). Povećanjem udjela vitamina u smjesi s hibridom nije primjetan jasan trend utjecaja na udio oleinske kiseline. Primjerice, u tretmanima K4 - K6 udio oleinske kiseline opada redom: 28,75 %, 28,73% i 28,42 %, dok u tretmanima K1 - K3 dodatak vitamina A u koncentraciji od

5000 IJ/kg i 20 000 IJ/kg uzrokuje nešto veće vrijednosti (redom: 28,75 % i 28,63 %) u odnosu na dodatak u koncentraciji od 10 000 IJ/kg (28,38 %). Na udio gadoleinske masne kiseline (C20:1) značajan utjecaj imao je jedino hibrid kukuruza ( $p = 0,011$ ), te su smjese s hibridom Os403 imale nešto više udjele u odnosu na smjese s hibridom Bc572. Također je uočeno da su udjeli u smjesama ovisno o hibridu niži u odnosu na udjele u samim hibridima kukuruza.

PUFA su zastupljene u nižem udjelu u smjesama s hibridom Bc572 u odnosu na udio u čistom hibridu, dok je u smjesama s hibridom Os403 obrnuto. Na udio PUFA značajan utjecaj imali su izvor minerala ( $p = 0,005$ ) i koncentracija vitamina A ( $p = 0,009$ ), kao i interakcije H x M ( $p = 0,004$ ) i H x M x V ( $p < 0,001$ ). Kod smjesa s hibridom Bc572 uočeno je da dodatak minerala iz anorganskog izvora (K1 - K3) u smjesu rezultira višim udjelima PUFA. Dodatak vitamina A u koncentraciji od 10000 IJ/kg u istim smjesama rezultira višim ukupnim udjelom PUFA (58,30 %), dok je dodatak vitamina A u koncentracijama od 5000 i 20000 IJ/kg rezultirao smanjenjem ukupnog udjela. Smjesa istog hibrida s mineralima organskog porijekla i dodatkom vitamina A u koncentraciji od 20000 IJ/kg imala je udio PUFA od 58,11 % (K6). Smanjenjem koncentracije dodanog vitamina A smanjio se udio PUFA pa je tako u smjesi K4 udio bio 57,78 %, a u smjesi K5 57,59 %. Kod smjesa s hibridom Os403 primijećen je sličan trend. U smjesama K7 - K9 najviši udio PUFA imao je uzorak K9 (58,20 %) u kojem je dodatak vitamina A iznosio 20000 IJ/kg. Slijedi K7 s udjelom od 58,08 % s koncentracijom vitamina A od 5000 IJ/kg te K8 s udjelom 58,08 % i koncentracijom vitamina A od 10000 IJ/kg. Među smjesama K10 - K12 najveći udio imala je smjesa s dodatkom vitamina A u koncentraciji od 10000 IJ/kg (K11), dok su smjese K10 i K12 imale nešto manji udio PUFA.

Značajan utjecaj na udio linolenske kiseline (C18:2 cis) imali su izvor minerala ( $p = 0,007$ ) i koncentracija vitamina A ( $p = 0,001$ ) te sve interakcije osim M x V s p-vrijednosti većom od 0,05. Promatranjem rezultata udjela u smjesama s Bc572 hibridom, nešto više udjele linolenske kiseline imale su smjese s mineralima iz anorganskog izvora. U smjesi K1 udio linolenske kiseline iznosio je 56,90 %. Dodatkom više koncentracije vitamina A došlo je do povećanja udjela linolenske kiseline i to: u smjesi K2 na 57,34 % i K3 na 57,31 %. Kod smjesa K4 - K6, povećanjem koncentracije vitamina A s 5000 na 10000 IJ/kg dolazi do blagog smanjenja udjela linolenske kiseline s 56,91 % na 56,71 %, dok povećanjem na 20000 IJ/kg dolazi do manjeg porasta udjela na 57,24 %. U smjesama s hibridom Os403 i anorganskim izvorom minerala, dodatak vitamina A u koncentracijama 5000 IJ/kg i 20000 IJ/kg rezultirao je višim udjelom linolenske kiseline (K7 - 57,16 %; K9 - 57,25 %) u odnosu na dodatak u koncentraciji od 10000 IJ/kg (K8 - 57,01 %). U smjesama s organskim izvorom minerala, povećanje koncentracije s 5000 na 10000 IJ/kg rezultiralo je većim povećanjem udjela linolenske kiseline (57,20 %) u odnosu na dodatak četiri puta više koncentracije vitamina A (57,13 %).

Usporedbom udjela alfa-linolenske masne kiseline (C18:3) unutar smjesa s različitim hibridima uočeno je da je veći udio zastupljen u smjesama s Os403 hibridom. Također, u odnosu na čisti hibrid, u smjesama je alfa-linolenska kiselina zastupljena u nižim udjelima. Na udio alfa-linolenske kiseline značajan utjecaj imali su hibrid, izvor minerala i vitamin A te interakcije H x M, H x V i H x M x V. U smjesama s hibridom Bc572 i različitim izvorom minerala, dodatak vitamina A u koncentraciji od 10 000 IJ/kg rezultirao je višim udjelom alfa linolenske kiseline. Tako je u smjesi K2 udio bio 0,77 %, a u smjesi K5 0,75%. Među smjesama s hibridom Os403 najviše udjele alfa-linolenske kiseline imale su smjese s dodatkom vitamina A u koncentraciji od 5000 IJ/kg, i to smjesa K7 s 0,78 % i K10 s 0,79 % alfa-linolenske kiseline.

Na udio erucinske masne kiseline (C22:2) nije bilo značajnog utjecaja ni od pojedinog tretmana niti njihovih interakcija. Jedino je primjetno smanjenje udjela erucinske kiseline u odnosu na udio u čistom hibridu. Najviši udio erucinske kiseline imala je smjesa K1 s 0,29 %, a najniži smjese K3, K8 i K12 s 0,11 %.

Omjer omega-6 i omega-3 masnih kiselina veći je u odnosu na čisti hibrid. Značajan utjecaj na omjer imali su svi tretmani i njihove interakcije. Primjetno je da su omjeri veći u odnosu na omjere u čistim hibridima. Nešto veće vrijednosti omjera imale su smjese s hibridom Bc572. Najveći omjer omega-6 i omega-3 masnih kiselina imala je smjesa K1 (81,81), a najmanji smjesa K11 (73,03).

Na omjer MUFA/SFA značajan utjecaj imali su hibrid ( $p = 0,008$ ) i izvor minerala ( $p < 0,001$ ) te interakcije H x M ( $p = 0,015$ ) i H x V ( $p = 0,002$ ). Nešto veće omjere imale su smjese s hibridom Os403 te je najviši omjer općenito imala smjesa K8 (2,26). Najmanji omjer imala je smjesa K5 (2,18). Omjeri PUFA/SFA pod utjecajem su svih tretmana i njihovih interakcija. Smjese s hibridom Os403 imale su nešto veće vrijednosti iako je najviši omjer zabilježen u smjesi K3 (4,51). Najniži omjer PUFA/SFA imala je smjesa K5 (4,32). Omjeri MUFA/PUFA ne razlikuju se među analiziranim smjesama te su u odnosu na omjere u samim hibridima gotovo nepromijenjeni. Jedini značajan utjecaj imala je interakcija H x V x M ( $p = 0,032$ ).

Trenutno nema dovoljno raspoloživih literaturnih izvora koji navode izravan utjecaj suplementacije vitaminom A i mineralima iz različitih izvora na sastav masnih kiselina u smjesama za hranidbu kokoši nesilica. Iz opisanih rezultata jasno je da utjecaj postoji te je u nekim slučajevima pozitivan, a u nekim negativan. Primjerice, negativan je utjecaj na omjer omega-6 i omega-3 masnih kiselina koji se dodatkom vitamina A i minerala povećao u odnosu na sami hibrid kukuruza. Pozitivan utjecaj suplementacije vidljiv je kod udjela ukupnih zasićenih masnih kiselina koji se relativno smanjio u odnosu na sami hibrid zbog čega su omjeri MUFA/SFA i PUFA/SFA postali optimalniji.

#### **4.3. Utjecaj hibrida, vitamina A i izvora minerala na sastav masnih kiselina jaja**

Korištenjem različitih krmnih smjesa za kokoši nesilice prilično je lako manipulirati udjelom masti i masnih kiselina (Kralik i Lovreković, 2018), vitaminima topljivim u mastima (Yuan i sur., 2014) te mineralima u jajetu (Qiu i sur., 2020), dok je gotovo nemoguće utjecati na promjene u sadržaju ukupnih proteina i aminokiselina. Ljudsku prehranu u razvijenim zemljama karakterizira prekomjeran unos zasićenih masnih kiselina, n-6 polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), kolesterola i natrija, dok manjka unos vlakana, n-3 PUFA i antioksidansa. Ovakav način prehrane rezultira visokom učestalosti pojave kroničnih bolesti i bolesti krvožilnog sustava. Kako bi se takav trend umanjio razvijaju se nove tehnologije te istražuju mogućnosti obogaćivanja proizvoda s poželjnim funkcionalnim sastojcima.

Smjese koje se najčešće upotrebljavaju za hranidbu peradi imaju visok sadržaj zasićenih u odnosu na nezasićene masne kiseline. U konvencionalnim smjesama kao glavni izvor lipida najčešće se dodaje suncokretovo i repičino ulje, međutim na sadržaj masti također utječe dodatak sojine sačme, kukuruza i pšenice kao glavnih izvora proteina i energije. Na taj način povećava se udio n-6 PUFA, a snižava udio n-3 PUFA (Amjad Khan i sur., 2017). Alagawany i sur. (2019) ističu da ulje zbog velike kalorijske vrijednosti predstavlja dobar izvor energije u hranidbi peradi. Korištenje ulja donosi brojne prednosti: poboljšava apsorpciju lipoproteina i vitamina topljivih u mastima, povećava okus i optimizira iskorištavanje unijete energije. U pogledu poboljšanja udjela masti i sastava masnih kiselina u kokošjim jajima najčešći je trend dodatak različitih izvora omega-3 masnih kiselina u hranidbu kokoši nesilica. Na ovaj način nastoji se poboljšati omjer n-6/n-3 PUFA, a osim toga n-3 PUFA imaju povoljan utjecaj na smanjenje plazmatskih triacilglicerola, krvnog tlaka, zgrušavanje krvi, trombozu i imunitet (Benatti i sur., 2004). Također, Shakoore i sur. (2020) su otkrili da konzumacija omega-3 obogaćenih jaja smanjuje ukupni kolesterol za 16,57 mg/dcl ( $p < 0,001$ ) i trigliceride za 17,48 mg/dcl, dok istovremeno povećava koncentraciju HDL kolesterola za 0,48  $\mu$ g/dl ( $p < 0,001$ ) u usporedbi s prehranom bez jaja. Prilikom manipulacije u sastavu masnih kiselina jaja treba voditi računa o udjelima ulja ili masti koji se dodaju kako ne bi negativno utjecali na proizvodnju i kakvoću jaja (Stupin i sur., 2020).

Osim direktnog dodatka različitih udjela ulja i masti na sastav masnih kiselina također utječe i dodatak različitih mikrominerala. Gugala i sur. (2019) su izvijestili da je potpuna zamjena anorganskih soli kalcija, željeza, cinka i bakra sa 75 % njihovih glicinskih kelata kao izvora organskih minerala u prehrani fazana poboljšala sastav masnih kiselina u žumanjcima jaja povećanjem udjela n-6 i n-3 PUFA, čime je stvoren povoljniji omjer n-6/n-3.

Dodatak vitamina A poboljšava nutritivnu vrijednost jaja te prema nekim istraživanjima utječe na regulaciju metabolizma glukoze i masnih kiselina što može doprinijeti smanjenju rizika od

kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa (Blaner, 2019). Tako su Yuan i sur. (2014) zaključili da povećanjem količine dodanog vitamina A u hranu za kokoši nesilice linearno raste i količina vitamina A u žumanjku uzoraka jaja ispitivanih 12. i 24. tjedna eksperimenta. Međutim, povećanje dodanog vitamina A linearno je smanjivalo koncentracije  $\alpha$ -,  $\gamma$ - i ukupnog tokoferola u žumanjku jaja ( $p < 0,01$ ), dok se koncentracija  $\delta$ -tokoferola povećavala. Kao što je već spomenuto visoke koncentracije vitamina A uzrokuju smanjenje apsorpcije drugih vitamina topivih u mastima, posebice vitamina E koji je odgovoran za zaštitu lipida od oksidacije.

Ukupni sastav masnih kiselina u konvencionalnim jajima nije idealan. Zasićene masne kiseline (SFA) čine između 30 % i 35 % ukupnih lipida u žumanjku, mononezasićene masne kiseline (MUFA) predstavljaju 40 % do 45 %, dok polinezasićene masne kiseline (PUFA) čine najmanji udio, između 20 % i 25 % (Nimalaratne i Wu, 2015). U ovom istraživanju određeno je 15 masnih kiselina u uzorcima jaja kokoši nesilica hranjenih s 12 različitih eksperimentalnih tretmana čiji su udjeli prikazani u Tablici 8.

Tablica 8. Utjecaj hibrida kukuruza, vitamina A i izvora minerala na sastav masnih kiselina jaja

Tretmani	C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:1	C18:2	C18:3	C18:3	C20:1	C20:2	C20:3	C20:4	C24:1
T1	0,32	25,60	2,09	0,15	9,12	0,10	39,26	19,85	0,14	0,17	0,23	0,23	0,21	2,23	0,29
T2	0,34	25,94	2,37	0,15	9,02	0,11	38,40	19,93	0,16	0,20	0,23	0,24	0,19	2,39	0,35
T3	0,33	26,18	2,45	0,13	9,01	0,11	39,94	18,43	0,14	0,17	0,22	0,22	0,19	2,19	0,29
T4	0,30	25,48	2,15	0,16	9,10	0,11	39,48	19,68	0,14	0,18	0,25	0,25	0,21	2,21	0,31
T5	0,31	26,09	2,26	0,14	9,31	0,11	38,70	19,37	0,14	0,18	0,22	0,23	0,21	2,40	0,34
T6	0,32	25,79	2,22	0,14	9,34	0,11	38,98	19,36	0,15	0,18	0,22	0,23	0,21	2,41	0,34
T7	0,30	24,60	1,97	0,17	8,57	0,10	38,23	22,42	0,16	0,23	0,22	0,25	0,20	2,23	0,35
T8	0,30	25,28	1,96	0,16	9,21	0,11	37,35	21,57	0,16	0,20	0,22	0,26	0,22	2,62	0,40
T9	0,31	25,09	2,17	0,16	8,61	0,11	39,00	21,00	0,16	0,20	0,23	0,25	0,21	2,18	0,33
T10	0,29	25,72	2,31	0,15	9,00	0,12	38,86	19,98	0,16	0,19	0,21	0,22	0,20	2,27	0,33
T11	0,32	25,14	2,23	0,16	8,79	0,11	37,96	21,45	0,17	0,21	0,22	0,25	0,21	2,41	0,37
T12	0,30	25,20	2,12	0,16	9,17	0,11	38,72	20,51	0,16	0,19	0,22	0,24	0,22	2,32	0,34
SEM	0,00	0,13	0,04	0,00	0,07	0,00	0,20	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,01
Hibrid kukuruza (H)	<b>0,028</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	0,080	0,474	<b>0,023</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	0,123	0,088	0,199	0,584	<b>0,005</b>
Izvor minerala (M)	0,174	0,404	0,268	0,778	0,194	<b>0,004</b>	0,785	0,207	1,000	0,410	0,903	0,558	0,199	0,644	0,629
Vitamin A (V)	0,335	0,270	0,094	0,078	0,751	0,123	<b>0,028</b>	0,210	0,086	0,246	0,752	0,227	0,592	<b>0,024</b>	<b>0,010</b>
H x M	0,100	0,094	<b>0,002</b>	0,099	0,976	0,237	0,468	0,154	0,274	0,410	0,188	0,055	0,275	0,538	0,109
H x V	0,947	0,329	0,056	0,178	0,891	0,309	0,928	0,864	0,872	0,513	<b>0,026</b>	<b>0,019</b>	<b>0,026</b>	0,539	0,613
M x V	0,711	0,159	<b>0,007</b>	0,246	0,364	0,135	0,309	0,250	0,839	0,395	0,411	0,491	0,332	0,220	0,261
H x M x V	0,374	0,100	0,635	0,093	0,236	0,101	0,970	0,324	0,065	0,047	0,155	0,146	0,468	0,688	0,990

\*Tablica 8. nastavak

Tretmani	SFA	MUFA	PUFA	n6	n3	n6/n3	MUFA/SFA	PUFA/SFA	MUFA/PUFA
<b>T1</b>	35,19	41,96	22,84	22,67	0,17	131,36	1,19	0,65	1,84
<b>T2</b>	35,45	41,45	23,10	22,90	0,20	117,78	1,17	0,65	1,80
<b>T3</b>	35,66	43,01	21,33	21,17	0,17	128,40	1,21	0,60	2,03
<b>T4</b>	35,03	42,30	22,67	22,49	0,18	125,88	1,21	0,65	1,87
<b>T5</b>	35,84	41,63	22,52	22,34	0,18	124,96	1,16	0,63	1,85
<b>T6</b>	35,60	41,87	22,53	22,36	0,18	125,34	1,18	0,63	1,87
<b>T7</b>	33,64	40,87	25,49	25,26	0,23	112,08	1,21	0,76	1,61
<b>T8</b>	34,95	40,03	25,02	24,83	0,20	126,51	1,15	0,72	1,60
<b>T9</b>	34,17	41,84	23,99	23,79	0,20	120,64	1,22	0,70	1,75
<b>T10</b>	35,15	41,83	23,02	22,83	0,19	120,84	1,19	0,65	1,82
<b>T11</b>	34,40	40,89	24,71	24,50	0,21	116,67	1,19	0,72	1,66
<b>T12</b>	34,84	41,52	23,64	23,45	0,19	121,25	1,19	0,68	1,76
<b>SEM</b>	0,19	0,22	0,35	0,34	0,00	1,57	0,01	0,01	0,04
<b>Hibrid kukuruza (H)</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,011</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,019</b>	<b>0,484</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<b>Izvor minerala (M)</b>	<i>0,157</i>	<i>0,655</i>	<i>0,263</i>	<i>0,261</i>	<i>0,410</i>	<i>0,705</i>	<i>0,616</i>	<i>0,177</i>	<i>0,440</i>
<b>Vitamin A (V)</b>	<i>0,267</i>	<b>0,034</b>	<i>0,143</i>	<i>0,143</i>	<i>0,246</i>	<i>0,705</i>	<b>0,036</b>	<i>0,276</i>	<i>0,085</i>
<b>H x M</b>	<i>0,249</i>	<i>0,275</i>	<i>0,138</i>	<i>0,136</i>	<i>0,410</i>	<i>0,950</i>	<i>1,000</i>	<i>0,133</i>	<i>0,181</i>
<b>H x V</b>	<i>0,717</i>	<i>0,902</i>	<i>0,834</i>	<i>0,824</i>	<i>0,513</i>	<i>0,123</i>	<i>0,792</i>	<i>0,666</i>	<i>0,845</i>
<b>M x V</b>	<i>0,342</i>	<i>0,170</i>	<i>0,206</i>	<i>0,206</i>	<i>0,395</i>	<i>0,845</i>	<i>0,239</i>	<i>0,231</i>	<i>0,194</i>
<b>H x M x V</b>	<i>0,049</i>	<i>0,991</i>	<i>0,400</i>	<i>0,411</i>	<i>0,047</i>	<b>0,037</b>	<i>0,216</i>	<i>0,189</i>	<i>0,639</i>

\*U tablici su prikazane srednje vrijednosti rezultata s pripadajućim standardnim pogreškama. SEM – standardna pogreška;  $p < 0,05$  – postoji statistički značajna razlika;  $p > 0,05$  – ne postoji statistički značajna razlika; H x M – interakcija hibrida i izvora minerala; H x V – interakcija hibrida i vitamina ; M x V – interakcija izvora minerala i vitamina A; H x M x V – interakcija hibrida, izvora minerala i vitamina A



Udio zasićenih masnih kiselina (SFA) kretao se 33,64 (T7) – 35,84 % (T5), a prikazan je kao zbroj miristinske (C14:0), palmitinske (C16:0), heptadekanske (C17:0) i stearinske (C18:0) masne kiseline. Hibrid kukuruza ( $p < 0,001$ ) pokazao je statistički značajnu razliku u njihovom udjelu. Pri tom su uzorci jaja hibrida Bc572 imali veći udio SFA od uzoraka jaja kokoši nesilica hranjenih hibridom Os403. Ovakav rezultat u skladu je s rezultatima iz Tablice 7., gdje statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) također činio hibrid kukuruza pa su tako hranidbeni tretmani s hibridom Bc572 imali veći udio SFA. Zasićene masne kiseline u jajima potječu iz različitih krmiva i *de novo* biosinteze. Kako je već navedeno eksperimentalne smjese u ovom istraživanju sadrže relativno mali udio SFA (12,90 – 13,34 %), dok je sadržaj SFA u jajima skoro i trostruko viši. Prema rezultatima Poureslami i sur. (2012) nesilice hranjene sa smjesama niskog sadržaja SFA, MUFA i C18:2 cis n6 proizvele su jaja s najvišim udjelom SFA i najnižim omjerom MUFA/SFA. Zanimljivo je da je hranidba s visokim udjelom MUFA i C18:2 cis n6 dovela do najnižeg udjela SFA u jajima. *De novo* biosinteza, odnosno elongacija lanca masnih kiselina ima značajnu ulogu u sastavu SFA. Ovakvi rezultati podržavaju zaključak Poureslami i sur. (2010) gdje je ukupna *in vivo* aktivnost elongaze eksponencijalno opadala u odnosu na višak unosa SFA.

Udio MUFA prikazan je kao zbroj svih mononezasićenih masnih kiselina u ispitivanim uzorcima jaja, a to su palmitoleinska (C16:1), elaidinska (C18:1 trans), oleinska (C18:1 cis), gadoleinska (C20:1) i nervonska (C24:1) kiselina. Udio se kretao u rasponu 40,03 (T8) – 43,01(T3) %, pri čemu statistički značajnu razliku u njihovom udjelu pokazao je hibrid kukuruza ( $p = 0,011$ ) te različita količina dodatka vitamina A ( $p = 0,034$ ). Tako su jaja kokoši nesilica hranjenih hibridom Bc572 imala veći udio ( $p < 0,05$ ) MUFA u odnosu na hibrid Os403. Dok su jaja s dodatkom 5000 i 20000 IJ/kg vitamina A imala nešto veći udio u odnosu na dodatak od 10000 IJ/kg. Udio MUFA u eksperimentalnim smjesama bio je niži (28,70 – 29,22 %) u odnosu na udio u uzorcima jaja. Prema različitim istraživanjima udio MUFA rastao je s višim udjelom MUFA u krmnim smjesama (Gul i sur., 2021; Ansari i sur., 2006; Grobas i sur., 2001). Međutim, također je utvrđeno da dodatkom PUFA dolazi do smanjenja udjela ukupnih MUFA. Tako je prema Ayerza i Coates (2000) dodatak 7% PUFA smanjio udio C16:1 za 2 %, a C18:1 za 10%. Isto tako Yalcin i Unal (2010) navode da je kombinacija od 10% lanenih sjemenki i 1,5 % ribljeg ulja u hranidbi kokoši nesilica dovela do smanjenja sadržaja MUFA u lipidima žumanjka.

Omjer MUFA/SFA kretao se između 1,15 (T8) – 1,22 (T9). Statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) pokazao je dodatak vitamina A, pa su tako uzorci jaja kokoši nesilica hranjenih s dodatkom 20000 IJ/kg vitamina A imala nešto veći omjer MUFA/SFA. Poureslami i sur. (2012) navode da kako bi se poboljšao omjer MUFA/SFA u jajima, preporučuje se dodavanje izvora MUFA u prehranu na račun PUFA (posebno: C18:2 cis n6), umjesto da se jednostavno smanjuje unos SFA, što izgleda potiče *de novo* biosintezu. Također treba uzeti u obzir da

kokoši imaju sposobnost saturacije masti kako bi održale odgovarajući omjer zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u jajima, čime se osigurava rast pilića.

Udio PUFA se kretao 21,33 (T3) – 25,49 (T7) %, gdje je hibrid kukuruza ( $p < 0,001$ ) pokazao statistički značajnu razliku. Tako su uzorci jaja kokoši nesilica hranjenih s hibridom kukuruza Os403 imala veći udio PUFA što je i očekivano obzirom da su hranidbeni tretmani s tim hibridom imali nešto veći udio PUFA. Različite vrste ulja imaju različite omjere zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. Biljna ulja obično sadrže veći udio PUFA masnih kiselina u usporedbi s animalnim uljima, koja su bogatija SFA. S druge strane, lipidi iz morskih organizama imaju veći udio n-3 PUFA i povoljniji omjer n-6/n-3 PUFA. Ovaj trend potvrđen je i u eksperimentalnim tretmanima ovog istraživanja, gdje je udio PUFA iznosio oko 58 %. Kao što je već spomenuto, dodavanjem ulja bogatih PUFA može se izravno utjecati na njihov sadržaj u jajima. Na primjer, Aguillón-Páez i sur. (2020) su otkrili da zamjena suncokretovih sjemenki s lanenim sjemenom (13,5 %) u hrani za nesilice povećava koncentraciju n-3 PUFA (s 0,99 % na 6,92 %) i smanjuje omjer n-6/n-3 PUFA, bez negativnog utjecaja na proizvodne performanse nesilica.

Udio n-6 polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) prikazan je kao zbroj linolne (C18:2 cis),  $\gamma$ -linolenske (C18:3n6), eikozadienske (C20:2), eikozatrienska (C20:3n6) i arahidonske (C20:4n6) masne kiseline. Udio u uzorcima jaja iznosio je 21,17 (T3) – 25,26 (T7) %, a među njima najzastupljenija je bila linolna. Na udio n-6 PUFA statistički značajan utjecaj je imao hibrid kukuruza ( $p < 0,001$ ) pa su jaja kokoši nesilica hranjenih s hibridom Os403 imala veći udio u odnosu na Bc572. Isto tako, statistički značajan utjecaj hibrida kukuruza ( $p < 0,001$ ) zabilježen je kod udjela n-3 PUFA koji je prikazan kao udio  $\alpha$ -linolenske (C18:3) kiseline kao jedine n-3 masne kiseline. Najveći udio je tako iznosio 0,23 (T7) %, a najmanji 0,17 (T1,3) %. Jaja kokoši nesilica hranjenih s hibridom Os403 su imala veći udio n-3 PUFA u odnosu na Bc572.

Omjer n-6/n-3 masnih kiselina iznosio je 112,08 (T7) – 131,36 (T1), pri tom statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) pokazao je hibrid kukuruza te interakcija različitog hibrida, dodatak vitamina A i različit izvor minerala. Ovakav rezultat u skladu je s očekivanjima, s obzirom na to da su sve hranidbene smjese sadržavale veće udjele n-6 PUFA u odnosu na n-3. Prema Simopoulos (2016), visoka koncentracija n-6 PUFA u usporedbi s n-3 PUFA smanjuje učinkovitost pretvorbe  $\alpha$ -linolenske kiseline u dokozaheksaensku (DHA) i eikozapentaensku kiselinu (EPA) zbog konkurencije za enzim  $\Delta$ -6 desaturazu. Shahid i sur. (2020) ističu da korištenje lanenog ulja u hranidbi nesilica dovodi do veće ekspresije gena odgovornih za procese desaturacije i elongacije, što ukazuje na bolju pretvorbu  $\alpha$ -linolenske kiseline u EPA i DHA u usporedbi s upotrebom lanenog sjemena ili standardnih krmnih smjesa na bazi kukuruza. Kako bi se

poboljšao omjer n-6/n-3 PUFA u jajima, buduća istraživanja mogla bi se usredotočiti na dodavanje izvora n-3 PUFA u krmne smjese za nesilice, posebno EPA i DHA, koje nisu prisutne u ovim hranidbenim tretmanima. Primjerice, Yalcin i Unal (2010.) su u prehrani nesilica koristili 4,5 % ribljeg ulja, kao i kombinaciju lanenog sjemena i ribljeg ulja (10 % + 1,5 %). Nakon 30 dana hranidbe ovim tretmanima, otkrili su da lipidi žumanjaka sadrže 4,10 % ALA, 0,55 % EPA i 3,91 % DHA, odnosno ukupno 9,72 % n-3 PUFA, s omjerom n-6/n-3 PUFA od 2,28. Stupin i sur. (2020.) su kombinacijom lanenog (3,5 %) i ribljeg ulja (1,5 %) u smjesama za nesilice obogatili jaja s ukupno 585,20 mg/100 g n-3 PUFA.

Omjer PUFA/SFA iznosio je 0,60 (T3) – 0,76 (T7), dok je se omjer MUFA/PUFA kretao između 1,60 (T7) – 2,03 (T3). Statističku razliku u oba slučaja pokazao je hibrid kukuruza ( $p < 0,001$ ). Tako su uzorci jaja hranidbenih tretmana s hibridom Os403 imala veći omjer PUFA/SFA u odnosu na hibrid Bc572, dok su uzorci jaja hranidbenih tretmana s hibridom Bc572 imala su veći omjer MUFA/PUFA u odnosu na hibrid Os403.

Ghasemi i sur. (2022) su u svom istraživanju promatrali utjecaj dodatka anorganskih i organskih izvora minerala u krmiva. Jaja iz hranidbenog tretmana u koji nije dodan niti jedan izvor minerala imala su najnepovoljniji sastav masnih kiselina u žumanjku, s visokim razinama SFA i niskim razinama PUFA, što sugerira da bi niža količina minerala mogla negativno utjecati na profil masnih kiselina u žumanjku. Zamjena anorganskih izvora minerala s kelatima organskih kiselina u količini od 66 % i 100 % komercijalno preporučenih razina doprinijela je promjeni sastava masnih kiselina u žumanjcima. Osobito je došlo do smanjenja SFA i povećanja PUFA te poboljšanja omjera n-6/n-3 masnih kiselina, što je u skladu s istraživanjem Gugala i sur. (2019). Također, Buckiuniene i sur. (2016) su zamijetili da dodatak 70 mg željezovog sulfata u kombinaciji sa 72 mg željezovog glicinata pokazuje najveći udio PUFA u odnosu na smjese u koje nije dodan niti jedan izvor minerala i u koje je dodan samo organski ili anorganski izvor. Dok je dodatak 144 mg željezovog glicinata u krmiva ima najbolji učinak na omjer n-6/n-3 masnih kiselina.

Udio miristinske masne kiseline (C14:0) iznosio je 0,29 – 0,34 %. Hibrid kukuruza pokazao je statistički značajnu razliku ( $p = 0,03$ ) u udjelu miristinske masne kiseline pa je tako tretman s hibridom Bc572 imao veći udio C14:0 u odnosu na tretmane s Os403. Također, hibrid kukuruza je pokazao statistički značajnu razliku ( $p < 0,001$ ) u udjelu palmitinske masne kiseline (C16:0) te se kretao 24,15 – 26,17 % pri čemu je u hranidbenim tretmanima s Bc572 zabilježen veći udio od onog u tretmanima s Os403 hibridom.

Udio margarinske masne kiseline (C17:0) kretao se 0,13 - 0,17 %. Hibrid Os403 pokazao je veći udio C17:0 u odnosu na hibrid Bc572 ( $p < 0,05$ ).

Udio stearinske masne kiseline (C18:0) iznosio je 8,57 – 9,34 %. Vrsta hibrida, dodatak vitamina A i izvor minerala nisu pokazali statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) u njenom udjelu.

Na udio palmitoleinske masne kiseline (C16:1) statistički značajno je utjecao hibrid kukuruza ( $p < 0,001$ ), interakcija hibrida kukuruza i različitog izvora minerala ( $p < 0,001$ ) te interakcija izvora minerala i dodatka vitamina A ( $p = 0,01$ ), a udio se kretao između 1,96 i 2,45 %. Najveći udio zabilježen je kod tretmana s Bc572 hibridom, anorganskim izvorom minerala i dodatkom 20000 IJ/kg vitamina A.

Udio elaidinske masne kiseline (C18:1 trans) kretao se između 0,10 i 0,12 % pri tom je statistički značajnu razliku imao izvor dodanih minerala ( $p < 0,001$ ). Veći udio elaidinske masne kiseline zabilježen je kod tretmana s organskim izvorom minerala u odnosu na anorganski. U istraživanju Buckiuniene i sur. (2016) navode da je dodatak 150 mg željezovog sulfata doveo do povećanja elaidinske masne kiseline i ostalih trans izomera masnih kiselina, međutim isto je zabilježeno i kod dodatka 72 i 144 mg željezovog glicinata. Iz toga se može zaključiti da zamjena anorganskog izvora organskim u manjoj količini ima jednak učinak.

Udio oleinske masne kiseline (C18:1 cis) u uzorcima jaja iznosio je 37,35 – 39,94 %. Statistički značajnu razliku pokazao je hibrid kukuruza ( $p = 0,023$ ), pri tom su jaja iz tretmana s hibridom Bc572 imala nešto veći udio od onih s Os403 hibridom. Osim toga, statistički značajnu razliku pokazao je dodatak vitamina A ( $p = 0,028$ ). Najveći udio C18:1 cis zabilježen je kod hranidbenog tretmana s Bc572 hibridom kukuruza, anorganskim izvorom minerala i dodatkom 20000 IJ/kg vitamina A.

Udio linolne masne kiseline (C18:2 cis n6) iznosio je 18,43 – 22,42 %. Na njen udio statistički značajnu razliku pokazao je hibrid kukuruza ( $p < 0,001$ ). Hibrid Os403 pokazao je veći udio linolne masne kiseline u odnosu na hibrid Bc572.

Udio  $\gamma$ -linolenske masne kiseline (C18:3n6) iznosio je oko 0,15 %, a . Hibrid Os403 pokazao je veći udio C18:3n6 u odnosu na hibrid Bc572 ( $p < 0,05$ ).

Na udio  $\alpha$ -linolenske masne kiseline (C18:3n3 ALA) statistički značajno je utjecao hibrid kukuruza ( $p < 0,001$ ), a udio se kretao 0,17 – 0,23 %. Pri tom su jaja iz tretmana s hibridom Os403 imala nešto veći udio od onih s Bc572 hibridom.

Udio gadoleinske masne kiseline (C20:1) iznosio je oko 0,22 %, udio eikozadienske masne kiseline (C20:2) oko 0,24 %, a eikozatrienske masne kiseline (C20:3n6) oko 0,21 %. Kod sve tri kiseline statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) pokazala je interakcija hibrida kukuruza i dodatka vitamina A. Uzorci jaja hranidbenog tretmana s hibridom Bc572 i dodatkom 5000 IJ/kg vitamina A te uzorci s hibridom Os403 i dodatkom 20000 IJ/kg imali su nešto veće udjele ovih triju masnih kiselina.

Udio arahidonske masne kiseline (C20:4n6) iznosio je 2,18 – 2,62 %. Pri tom statistički značajanu razliku pokazao je dodatak vitamina A ( $p = 0,024$ ). Nešto veći udjeli C20:4n6 u uzorcima jaja primijećeni su kod dodatka 10000 IJ/kg vitamina A u hranidbene tretmane.

Na udio nervonske masne kiseline (C24:1) statistički značajan utjecaj pokazali su hibrid kukuruza ( $p = 0,005$ ) i vitamin A ( $p = 0,010$ ), a udio se kretao između 0,29 i 0,40 %. Hibrid Os403 pokazao je veći udio C24:1 u odnosu na hibrid Bc572. Također dodatak 10000 i 20000 UI/kg vitamina A utjecao je na povišenje udjela C24:1, u odnosu na dodatak 5000 UI/kg u hranidbene tretmane.

Prema radu Vrhovec (2023) zabilježena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u dodatku različitog hibrida kukuruza u hranidbene smjese za kokoši nesilice. Tako je viši udio SFA, C16:0 i omjer MUFA/PUFA zabilježen kod hibrida Bc572, dok je viši udio PUFA, omjer PUFA/SFA, C17:0, C18:2 cis n6 i C18:3 n-3 ALA zabilježen kod Os403. Ovakav rezultat u skladu je i s rezultatima ovog istraživanja. Međutim, u ovom radu hibrid kukuruza Bc572 utjecao je i na viši udio MUFA, C18:1 cis i C14:0 masnih kiselina, dok je Os403 utjecao na viši udio C18:2 cis n6 i C24:1.

Vitamina A nije primarni antioksidans za razliku od vitamina E, međutim retinoična kiselina kao njegov aktivni metaboliti može utjecati na ekspresiju gena povezanih s metabolizmom lipida. Uključujući regulaciju enzima koji sudjeluju u sintezi i razgradnji masnih kiselina (Yang i sur., 2021). U ovom istraživanju glavni utjecaj vitamina A uočen je kod mononezasićenih kiselina te C20:4 n-6 masne kiseline. Tako je primijećen trend povećanja udjela tih masnih kiselina s povećanjem količine dodanog vitamina A. Glavne prehrambene cis mononezasićene masne kiseline (palmitoleinska i oleinska) te glavna prehrambena  $\omega$ -6 polinezasićena masna kiselina (linolna kiselina) smanjuju koncentracije LDL kolesterola kada zamijene glavne prehrambene zasićene masne kiseline. Ovo se očigledno povezuje s nižim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Caldera, 2015). Akdemir i sur. (2012) su otkrili da dodatak praha od rajčice u krmne smjese kokoši nesilica povećava koncentraciju karotenoida i vitamina A, što je u konačnici rezultiralo smanjenjem lipidne peroksidacije u žumanjku. Prema dostupnoj literaturi, kao što je već navedeno utjecaj vitamina A prvenstveno je vidljiv u vanjskim i unutarnjim parametrima kvalitete jaja, dok utjecaj na masne kiseline nije dovoljno istražen. Međutim, na temelju dobivenih rezultata dodatak vitamina A pokazuje pozitivne indikacije u pogledu sastava masnih kiselina u jajima.

#### **4.4. Procjena nutritivne i zdravstvene kvalitete jaja prema sastavu masnih kiselina**

Iako jaja sadrže esencijalne aminokiseline, nezasićene masne kiseline, minerale i vitamine, preporučuje se ograničiti konzumaciju jaja zbog visokog sadržaja kolesterola (Attia i sur., 2014). Smatra se da povećani unos jaja može povećati rizik od kardiovaskularnih bolesti

podizanjem razine kolesterola u krvi (Zhao i sur., 2022; Mofrad i sur., 2022). Međutim, prema nekim istraživanjima nije pronađena pozitivna korelacija između konzumacije jaja i oboljenja izazvanih konzumacijom hrane s visokim sadržajem kolesterola (Godos i sur., 2021; Mohammadifard i sur., 2022). Sanlier i Üstün (2021) su u svom istraživanju naveli da je nužno detaljno razumjeti metabolizam kolesterola iz jaja u gastrointestinalnom traktu, uključujući ulogu crijevne mikrobiote kako bi se razjasnila povezanost između konzumacije jaja i kardiovaskularnih bolesti. Pokazalo se da količina i vrsta masnih kiselina koje se unose utječu na strukturu staničnih membrana, tkiva, sastav lipida u žumanjku te razine lipoproteina u plazmi. Masne kiseline mogu izravno utjecati na razvoj ili prevenciju ateroskleroze i koronarne tromboze zbog svog utjecaja na kolesterol u krvi i koncentracije LDL kolesterola (Laudadio i sur., 2015). U tom kontekstu u ovom radu određena je kvaliteta lipida za ljudsko zdravlje na temelju strukturnih formula (SFA, MUFA, PUFA), a upotrijebljeni su i aterogeni (AI), trombogeni (TI) indeksi, indeks omjera hipokolesterolemičnih i hiperkolesterolemičnih masnih kiselina (HHI), indeks zasićenja (SI), indeks peroksidabilnosti (PI), kao i izračun poželjnih masnih kiselina (DFA) (Zita i sur., 2022; Bień i sur., 2022). Rezultati su prikazani u Tablici 9.

Tablica 9. Nutritivni i zdravstveni indeksi jaja

Tretmani	AI	TI	HHI	DFA	PI	SI
T1	0,56	0,21	2,37	73,93	30,16	0,54
T2	0,56	0,23	2,32	73,57	30,88	0,55
T3	0,57	0,22	2,29	73,36	28,50	0,55
T4	0,55	0,22	2,39	74,06	29,93	0,54
T5	0,57	0,23	2,30	73,46	30,35	0,56
T6	0,57	0,23	2,33	73,75	30,41	0,55
T7	0,52	0,23	2,53	74,93	32,86	0,50
T8	0,55	0,22	2,41	74,26	33,56	0,53
T9	0,53	0,22	2,46	74,44	31,20	0,52
T10	0,55	0,23	2,36	73,85	30,47	0,54
T11	0,54	0,23	2,44	74,39	32,65	0,52
T12	0,55	0,22	2,42	74,34	31,29	0,53
SEM	0,00	0,00	0,02	0,13	0,41	0,00
Hibrid kukuruza (H)	<b>&lt; 0,001</b>	0,622	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Izvor minerala (M)	0,167	0,436	0,233	0,439	0,477	0,231
Vitamin A (V)	0,163	0,445	0,154	0,255	0,050	0,211
H x M	0,247	0,557	0,076	0,089	0,149	0,231
H x V	0,651	<b>0,040</b>	0,418	0,357	0,749	0,790
M x V	0,584	0,908	0,174	0,180	0,149	0,275
H x M x V	0,061	0,209	0,078	0,121	0,721	0,064

\*U tablici su prikazane srednje vrijednosti rezultata s pripadajućim standardnim pogreškama. SEM – standardna pogreška;  $p < 0,05$  – postoji statistički značajna razlika;  $p > 0,05$  – ne postoji statistički značajna razlika; AI – aterogeni indeks; TI – trombogeni indeks; HHI - indeks omjera hipokolesterolemičnih i hiperkolesterolemičnih masnih kiselina; DFA - izračun poželjnih masnih kiselina; PI - indeks peroksidabilnosti; SI – indeks zasićenja; H x M – interakcija hibrida i izvora minerala; H x V – interakcija hibrida i vitamina ; M x V – interakcija izvora minerala i vitamina A; H x M x V – interakcija hibrida, izvora minerala i vitamina A

Aterogeni indeks (AI) ukazuje na odnos između zbroja glavnih zasićenih masnih kiselina i glavnih nezasićenih kiselina, osim toga uključuje i miristinsku masnu kiselinu (C14:0) za koju se smatra da ima najštetnije kardiovaskularno djelovanje. Zasićene masne kiseline se smatraju proaterogenim (potiču nakupljanje lipida na stanicama imunološkog i krvožilnog sustava). S druge strane, nezasićene masne kiseline se smatraju antiaterogenim, sprječavaju stvaranje plakova i smanjuju razine esterificiranih masnih kiselina, kolesterola i fosfolipida, čime se sprječava pojava mikro- i makrokoronarnih bolesti (Omri i sur., 2019). U ovom radu statistički značajnu razliku u vrijednostima AI (0,52 (T7) – 0,57 (T3,5,6)) pokazao je hibrid

kukuruzu ( $p < 0,001$ ) pa su tako jaja kokoši hranjenih s hibridom Bc572 imala nešto veće vrijednosti u odnosu na hibrid Os403. Stoga se može zaključiti da hibrid Os403 djeluje na povoljniji sastav masnih kiselina te da može smanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti.

Attia i sur. (2022.) proučavali su utjecaj različitih omjera n-6/n-3 PUFA: 16,7:1, 9,3:1 i 5,5:1 u krmivima za kokoši nesilice na njihovu produktivnost, kvalitetu jaja, profil masnih kiselina te aterogene (AI), trombogene (TI) indekse, indekse omjera hipokolesterolemičnih i hiperkolesterolemičnih masnih kiselina (HHI) te poželjne masne kiseline. Nesilice hranjene hranom s najvišim omjerom n-6/n-3 PUFA pokazale su veći prirast, dok su kod omjera 9,3:1 nesilice proizvodile više jaja veće mase i imale bolju iskoristivost hrane. S druge strane, nesilice koje su konzumirale hranu s najnižim omjerom n-6/n-3 PUFA nosile su jaja s poboljšanim vrijednostima AI, TI i HHI indeksa te DFA. Do sličnih zaključaka došli su i Vlaicu i sur. (2021) koji su proučavali utjecaj različitog sastava masnih kiselina smjesa i antioksidansa na proizvodnju i kvalitetu jaja. Nesilice su hranjene standardnim krmivom (kontrolna skupina, C), krmivom koje sadrži 9 % sačme uljane repice s 3 % sačme grožđa (T1) ili sadrži 9 % sačme lana i 3 % sačme vučjeg trna (T2). Pri tom, nije došlo do značajne promijene AI vrijednosti, dok su TI vrijednosti značajno smanjene ( $p < 0,0007$ ) s 0,72 (C) na 0,60 (T1) i 0,66 (T2).

Trombogeni indeks (TI) je definiran kao omjer protrombogenih (zasićenih) i antitrombogenih (nezasićenih) masnih kiselina, pokazuje sklonost stvaranju ugrušaka u krvnim žilama (Omri i sur., 2019). Dakle, što je veći indeks to je i veći rizik za stvaranje tromba koji utječu na ljudsko zdravlje. Vrijednost TI za ispitivane uzorke iznosila je oko 0,22 gdje je statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) pokazala interakcija hibrida kukuruza i količina dodanog vitamina A. Primijećeno je da je najmanji indeks za hibrid Bc572 zabilježen kod dodatka 5000 IJ/kg vitamina A, dok je za hibrid Os403 zabilježen kod dodatka 20000 IJ/kg. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da se ovisno o različitom udjelu zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u hranidbenim tretmanima, odnosno hibridima kukuruza količina dodatka vitamina A treba prilagoditi kako bi u konačnici TI vrijednost bila što manja.

Untea i sur. (2020) su proučavali učinak dodatka 0,5 % listova borovnice i 1 % listova oraha na antioksidativne karakteristike jaja. Pri tom određeni su i aterogeni i trombogeni indeksi. Aterogeni nisu bili promijenjeni dodacima lišća borovnice ili oraha u hranu za nesilice, dok je trombogeni indeks značajno smanjen u skupini s dodatkom lišća oraha u usporedbi s kontrolnom skupinom, što pokazuje povoljan učinak na ljudsko zdravlje.

Jaja s nižim omjerom zasićenih i nezasićenih masnih kiselina (SFA/PUFA) pokazala su niske vrijednosti aterogenih, trombogenih i hiperkolesterolemičnih indeksa te su preporučena za zdravu prehranu (Laudadio i sur., 2015). Masne kiseline C14:0 i C16:0 poznate su kao



aterogene, dok se za C18:0 smatra da je neutralna u pogledu aterogenosti, ali se umjesto toga smatra trombogena (Laudadio i Tufarelli, 2011.; Popa i sur., 2012).

Indeks omjera hipokolesterolemičnih i hiperkolesterolemičnih masnih kiselina (HHI) ukazuje na procjenu utjecaja masnih kiselina na metabolizam kolesterola, pri čemu veći HHI ukazuje na veći udio masnih kiselina koje pomažu u smanjenju razine kolesterola. Prema istraživanju Mensink i sur. (2003) u usporedbi s ugljikohidratima i nezasićenim masnim kiselinama, zasićene masne kiseline povećavaju ukupni i LDL kolesterol, dok je njihov učinak na povećanje kolesterola u HDL lipoproteinima mali. Vrijednost HHI iznosila je 2,29 (T3) – 2,53 (T7) gdje je statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) pokazao hibrid kukuruza. Tako su jaja kokoši hranjenih hibridom Os403 imala više vrijednosti u odnosu na hibrid Bc572.

Panaite i sur. (2020) su utvrdili da dodatak kombinacije lanenog i repičinog sjemena u hranu za kokoši nesilice značajno smanjuje AI vrijednosti jaja u odnosu na standardna krmiva. Također, primijećeno je da su se smanjili omjeri  $\sum SFA / \sum PUFA$  i  $\sum n-6/n-3 PUFA$ . Istodobno su se TI vrijednosti smanjile s 1 na 0,78, dok su HH vrijednosti porasle s 2,45 na 2,60 u žumanjcima jaja.

Omri i sur. (2019) su istražili dodatak 4,5 % mljevenog lanenog sjemena ili kombinacije lanenog sjemena s 1 % sušene rajčice i 1 % slatke crvene paprike u krmiva za kokoši nesilice. Zaključili su da IA i HHI vrijednosti nisu bile pod utjecajem ( $p > 0,05$ ) dodavanja lanenog sjemena u prehranu, dok je IT smanjen ( $p < 0,05$ ) s 1,16 kod kontrolne skupine na 0,86. Dodavanje mješavine rajčice i slatke crvene paprike u prehranu s lanenim sjemenom nije značajno utjecalo na mjerene parametre u usporedbi s tretmanom s lanenim sjemenom.

Izračun poželjnih masnih kiselina (DFA) predstavlja zbroj antiaterogenih masnih kiselina (nezasićenih masnih kiselina i stearinske kiseline - C18:0) koje snižavaju razinu kolesterola i triacilglicerola u plazmi. Stoga se veće vrijednosti DFA indeksa smatraju poželjnima. Najveće DFA vrijednosti jaja zabilježene su kod hranidbenih tretmana u kojima je dodan hibrid Os403 u odnosu na hibrid Bc572. Vrijednosti DFA su se kretale 73,36 (T3) – 74,93 (T7).

Indeks peroksidabilnosti (PI) daje uvid u stabilnost masti i ulja prema oksidativnom kvarenju, što je važno za ocjenu njihove trajnosti i kvalitete. Viši PI znači da su masne kiseline u određenom ulju, masti ili hrani sklonije oksidaciji, što može dovesti do kvarenja, stvaranja nepoželjnih okusa, mirisa i potencijalno štetnih spojeva. Vrijednost PI iznosila je 28,50 (T3) – 33,56 (T8), statistički značajnu razliku pokazao je hibrid kukuruza ( $p < 0,001$ ). Tako su jaja kokoši hranjenih hibridom Bc572 imala niže vrijednosti u odnosu na hibrid Os403. Jaja bogata nezasićenim masnim kiselinama su popularnija među potrošačima zbog nižeg kolesterola, boljeg omjera LDL/HDL i nižeg aterogenog indeksa. Ipak, jaja s većim udjelom polinezasićenih

masnih kiselina (PUFA) sklonija su oksidaciji, pa bi dodavanje antioksidansa moglo smanjiti lipidnu oksidaciju i poboljšati kvalitetu ovih jaja na tržištu (Laudadio i sur., 2015).

Visok indeks zasićenja (SI) indicira na visok sadržaj zasićenih masnih kiselina koje mogu povećati ukupni i LDL kolesterol, potaknuti zgrušavanje krvi, izazvati inzulinsku rezistenciju i promovirati upale (Calder, 2015). Vrijednosti SI iznosila je u rasapnu 0,50 (T7) – 0,56 (T5), pri čemu je statistički značajnu razliku pokazao hibrid kukuruza. Tako je dodatak hibrida Os403 utjecao na sniženje SI vrijednosti u usporedbi s Bc572.

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da je statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) kod izračunatih indeksa najviše činio hibrid kukuruza. Ovaj rezultat u skladu je s proučenom literaturom (Vlaicu i sur., 2021; Panaite i sur., 2020; Untea i sur., 2020; Omri i sur., 2019) i analiziranim sastavom masnih kiselina smjese gdje je vidljivo da sadržaj masnih kiselina smjesa najviše utječe na sastav masnih kiselina u jajima, a kukuruz je u ovom istraživanju činio 60 % potpune krmne smjese.

#### 4.5. Pokazatelji kvalitete jaja

Kvaliteta jaja, kao jednog od ključnih prehrambenih proizvoda, podliježe strogim standardima i regulativama kako bi se osigurala sigurnost i zadovoljstvo potrošača. S obzirom da su vanjski parametri kvalitete kao što su boja ljuske, indeks oblika jaja i masa jaja jedni od prvih parametara s kojima se susreću potrošači za proizvođače je bitno optimizirati te parametre. Osim toga kvaliteta ljuske jajeta ključna je za učinkovitu zaštitu jaja od patogena poput *Salmonella* sp. Jedan od glavnih problema u proizvodnji jaja je pogoršanje kvalitete ljuske zbog starosti kokoši, loših uvjeta okoliša i nedovoljne količine minerala i vitamina u prehrani (Nys i sur., 2007). Također, sagledan je utjecaj na unutarnje parametre koji određuju nutritivnu vrijednost te svježinu jaja, kao i boju žumanjka koja je pod izravnim utjecajem dodatka pigmentata u krmne smjese za kokoši nesilice.

U žitaricama koje se koriste u krmivima za kokoši nesilice, kao što je kukuruz, koncentracija minerala ovisi o prisutnosti minerala u tlu i njihovom prijenosu u biljku (NRC, 1994). Zbog promjenjivih koncentracija minerala u hranidbi, koje mogu biti granične ili nedovoljne, suplementacija minerala u hrani postaje ključna. Isprva je korištena za prevenciju deficita, mineralna suplementacija postala je nužna za optimizaciju rasta ili proizvodnje jaja po jedinici unosa hranjivih tvari (Applegate i Angel, 2014). Svojstva minerala, poput kemijskog oblika (slobodni ili u spoju) i veza između atoma (kovalentne ili ionske), mogu utjecati na njihovu topljivost. Interakcije između minerala (Fe-Zn, Fe-Ca, Ca-Zn, Zn-Cu, Ca-Mg), natjecanje za mjesta transporta (poput proteina DMT-1 koji prenosi dvovalentne metale) te prisutnost inhibitora (fitati, tanini i oksalati) ili faktora koji potiču apsorpciju u prehrani (organske kiseline i aminokiseline), faktori su koji utječu na bioraspoloživost minerala (Cozzolino, 1997). Fizikalno-kemijski uvjeti, pH i viskoznost crijeva također mogu kompromitirati apsorpciju minerala (Regina i Beterchini, 2010). Stoga je ovo istraživanje, koje uključuje suplementaciju Zn, Cu, Mn, Fe i Se u organskom i anorganskom obliku, provedeno kako bi se utvrdio način na koji izvor minerala djeluje na parametre kvalitete i nutritivni sastav ispitivanih jaja te postoje li doista prednosti suplementacije organskim mineralima u odnosu na anorganske.

Vitamin A jedan je esencijalnih mikronutrijenata kroz cijeli životni ciklus kokoši nesilica. Nacionalno istraživačko vijeće (NRC) 1987. godine preporučilo je dozu od 3.000 IJ/kg vitamina A za perad, te je naznačilo da je maksimalno podnošljiva doza za nesilice 40.000 IJ/kg (NRC, 1994). Danas se u komercijalnu hranu za kokoši nesilice obično se dodaje 10.000–15.000 IJ/kg vitamina A, veće razine osim što mogu negativno utjecati na kvalitetu jaja i embrionalni razvoj mogu toksično djelovati na jetru, imunološke funkcije te povećati rizik od prijeloma kostiju kokoši nesilica ometajući apsorpciju drugih vitamina (Yuan i sur., 2014). Također, najveća vrijednost mase jaja ( $p < 0,05$ ) zabilježena je kod kokoši hranjenih dijetom koja je sadržavala 10,000 IJ vitamina A po kilogramu hrane, no ostala svojstva jaja nisu bila značajno

pogođena tretmanom vitaminom A (Ahmad i sur., 2013). Ovo istraživanje proučava dodatak različite razine vitamina A (5000-20000 IJ/kg) u cilju optimiziranja same proizvodnje koja bi zadovoljila kriterije proizvođača s ekonomskog aspekta te kriterije potrošača s aspekta kvalitete bez negativnog učinka na zdravlje i dobrobit kokoši nesilica.

#### 4.5.1. Vanjski pokazatelji kvalitete jaja

U Tablici 10. prikazani su pokazatelji vanjske kvalitete uzoraka svježih jaja za 12 eksperimentalnih hranidbenih tretmana. Analizom su utvrđeni masa cijelih jaja (g), debljina ljuske (mm), boja ljuske ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti), indeks oblika (%) i površina ljuske jaja ( $cm^2$ ).

Tablica 10. Utjecaj hibrida, vitamina A i izvora minerala na vanjske pokazatelje kvalitete jaja

Tretmani	Debljina ljuske/mm	Boja ljuske			Masa (cijelo jaje)/ g	Indeks oblika (%)	Površina jaja ( $cm^2$ )
		$L^*$	$a^*$	$b^*$			
T1	0,59	55,66	20,99	32,30	58,51	80,29	71,46
T2	0,60	54,93	20,96	31,57	60,13	81,86	71,72
T3	0,63	55,21	20,11	30,69	60,45	79,38	71,36
T4	0,61	54,60	20,19	29,87	61,46	79,83	71,53
T5	0,50	58,21	19,11	30,60	59,83	80,30	72,33
T6	0,52	55,94	20,74	30,70	60,53	80,29	72,60
T7	0,49	56,56	19,90	30,28	56,70	79,23	72,11
T8	0,48	55,77	20,55	30,06	60,38	81,36	72,16
T9	0,51	59,68	17,70	30,04	57,97	79,12	73,05
T10	0,58	56,00	19,41	30,14	61,23	82,40	72,46
T11	0,60	56,63	19,35	30,07	57,25	79,42	72,34
T12	0,61	55,31	19,99	29,87	57,17	80,68	72,53
SEM	0,02	0,42	0,27	0,21	0,49	0,31	0,15
Hibrid kukuruza (H)	<b>0,013</b>	<b>0,127</b>	<b>0,009</b>	<b>0,004</b>	<b>0,076</b>	<b>0,865</b>	<b>0,076</b>
Izvor minerala (M)	<i>0,077</i>	<i>0,821</i>	<i>0,484</i>	<i>0,046</i>	<i>0,451</i>	<i>0,579</i>	<i>0,447</i>
Vitamin A (V)	<i>0,231</i>	<i>0,542</i>	<i>0,451</i>	<i>0,570</i>	<i>0,880</i>	<i>0,611</i>	<i>0,880</i>
H x M	<b>&lt; 0,001</b>	<i>0,051</i>	<i>0,189</i>	<i>0,095</i>	<i>0,595</i>	<i>0,343</i>	<i>0,607</i>
H x V	<i>0,109</i>	<i>0,237</i>	<i>0,146</i>	<i>0,900</i>	<i>0,650</i>	<i>0,729</i>	<i>0,652</i>
M x V	<i>0,083</i>	<b>0,044</b>	<b>0,001</b>	<i>0,194</i>	<b>0,045</b>	<i>0,110</i>	<b>0,044</b>
H x M x V	<b>0,018</b>	<i>0,144</i>	<i>0,649</i>	<i>0,189</i>	<i>0,548</i>	<i>0,324</i>	<i>0,543</i>

\*U tablici su prikazane srednje vrijednosti rezultata s pripadajućim standardnim pogreškama. SEM – standardna pogreška;  $p < 0,05$  – postoji statistički značajna razlika;  $p > 0,05$  – ne postoji statistički značajna razlika; H x M – interakcija hibrida i izvora minerala; H x V – interakcija hibrida i vitamina ; M x V – interakcija izvora minerala i vitamina A; H x M x V – interakcija hibrida, izvora minerala i vitamina A

Prema Uredbi Komisije (EU) br. 2023/2465, koja dopunjuje Uredbu (EU) br. 1308/2013 o pravilima tržišnih standarda za jaja kokoši vrste *Gallus gallus*, jaja se svrstavaju u klase A i B. Značajke kvalitete klase A su čista i neoštećena ljuska i pokožica normalnog oblika te odsustvo stranih tvari i mirisa. Nadalje, žumanjak mora biti vidljiv pri prosvjetljenju jaja kao sjena nejasnih obrisa i neznatno pokretan pri okretanju jaja, a bjelanjak bistar i proziran. Zračna komora mora biti nepokretna i ne smije biti viša od 6 mm, a kod zametka ne smije biti primjetnog razvoja. Jaja koja se svrstavaju u klasu B ne ispunjavaju značajke kvalitete klase A te jaja koja se ne označe u roku od 10 dana od nesenja. Jaja klase A se ne peru i ne čiste te ne smiju biti podvrgnuta postupku konzerviranja ili hlađenja u prostorima ili pogonima gdje se temperatura umjetno održava na manje od 5 °C. Prema navedenim kriterijima uzorci svježih jaja koji su korišteni za ovo istraživanje svrstavaju se u klasu A.

Najvažniji kriteriji za potrošače prilikom odabira jaja su težina jaja i boja ljuske. Optimalna težina je 53-73 g što prema Uredbi Komisije (EU) 2023/2465 svrstava jaja klase A u razrede srednje (M) i velike težine (L). Težina ispitivanih jaja kretala se između 56,70 g (T7) i 61,46 g (T4) što znači da spadaju u razred srednje (M) veličine. Čimbenici koji utječu na težinu jaja su genetika, starost, hranidba i zdravstveni uvjeti kokoši nesilica. Prema tome na težinu jaja pozitivno utječe veća masa kokoši nesilica u periodu najveće nesivosti, prisutnost linolne kiseline i aminokiselina koje sadrže sumpor u krmnim smjesama te kontrolirani uvjeti hranjenja i programi osvjetljenja (Schwägele, 2011). Vrsta hibrida, različiti izvor minerala i različite razine dodatka dodatka vitamina A nisu imali statistički značajan utjecaj ( $p > 0,05$ ) na težinu ispitanih jaja. Jedino je interakcija različitog izvora minerala i različite razine dodatka vitamina A pokazala statističku značajnu razliku ( $p = 0,045$ ) te su tako jaja kokoši hranjenih s anorganskim izvorom minerala i dodatkom 5000 IJ/kg vitamina A imala najmanju masu dok su uzorci jaja kokoši hranjenih s organskim izvorom minerala i dodatkom 5000 IJ/kg vitamina A imala najveću masu. Prema nekim istraživanjima organski izvori minerala biološki su dostupniji u odnosu na anorganske, u skladu s tim Crosara i sur. (2021) utvrdili su da jaja kokoši nesilica, koje su hranjene krmnim smjesama s potpuno ili djelomično zamijenjenim anorganski mineralima s organskim, imala veću masu u odnosu na jaja kokoši koje su hranjene anorganskim mineralima. Međutim, prema istraživanju Kim i sur. (2022) ne postoji značajna razlika u proizvodnji, masi jaja i boji ljuske jaja kod kokoši nesilica hranjenih različitim koncentracijama organskih i anorganskih izvora minerala. Istraživanjem Yuan i sur. (2014) utvrđeno je da dodatak vitamina A u smjese u količini od najviše 35000 IJ/kg nije utjecao na produktivnost kokoši nesilica, isto tako nije utjecao na masu ispitivanih jaja, dok je dodatak od 45000 i 135000 IJ/kg značajno smanjio masu jaja u odnosu na dodatak samo 5000 IJ/kg. Chen i sur. (2016) su utvrdili da je suplementacija vitaminom A povećala stopu nesivosti i prosječnu masu jaja kokoši hranjenih s 21.600 IJ/kg u usporedbi s onima koje su dobivale 5.400 IJ/kg

vitamina A u prehrani. Jedan od razloga značajnog utjecaja interakcije vitamina A i oblika minerala na masu jaja može biti činjenica da suplementacija vitamina A utječe na povećanje konzumacije hrane i poboljšanje reproduktivnosti kod kokoši nesilica (Abd El-Hack, 2017).

Najmanja površina ispitivanih jaja uočena je kod skupine T3 s površinom od 71,36 cm<sup>2</sup> gdje je u krmne smjese dodan hibrid kukuruza Bc572, anorganski oblik minerala te 20000 IJ vitamina A/kg, dok je najveća uočena kod skupine T9 s površinom od 73,05 cm<sup>2</sup> gdje je u krmne smjese dodan hibrid kukuruza Os403, organski oblik minerala te 20000 IJ vitamina A/kg. Pri tom statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) imala je isto tako interakcija različitog izvora minerala i različite razine dodatka vitamina A ( $p = 0,044$ ).

Potrošači preferiraju jaja jednolike bijele ili smeđe boje. Na primjer, potrošači u Kini, Francuskoj, Velikoj Britaniji, Portugalu i Hrvatskoj, dok oni u SAD-u, Australiji, Švedskoj i Španjolskoj uglavnom biraju bijela jaja (Odabaši i sur., 2007). Pigmenti ljuske jajeta uglavnom sadrže protoporfirin-IX, biliverdin i cinkove kelate biliverdina, pri čemu se protoporfirin-IX uglavnom pojavljuje u smeđim jajima, a biliverdin u plavo-zelenim jajima (Lu i sur., 2021). Na vrstu i intenzitet pigmenta prvenstveno utječu genetske karakteristike različitih pasmina kokoši nesilica. Pasma Lohmann Brown poznata je po visokoj produkciji jaja smeđih nijansi. L\* vrijednost boje ljuske ispitivanih jaja je u rasponu 54,60 (T4) - 59,68 (T9), dok je vrijednost a\* 17,70 (T9) - 20,99 (T1), a vrijednost b\* 29,87 (T4) - 32,30 (T1). dobiveni rezultati u skladu su s Caverio i sur. (2012) koji su definirali da su optimalne vrijednosti koje određuju boju smeđih jaja: L\* = 60, a\* = 20, i b\* = 30 (Caverio i sur., 2012). Faktori koji dokazano utječu na smeđu boju jaja su starost kokoši nesilica, dodatak minerala i nutrijenata u krmiva, stres i uvjeti okoliša te bolesti i konzumacija određenih lijekova kod kokoši nesilica (Lu i sur., 2021). Kao što se vidi iz Tablice 9. vrsta hibrida, različiti izvor minerala i različite razine dodatka vitamina A nisu imali statistički značajan utjecaj ( $p > 0,05$ ) na boju ljuske jaja. Isto tako, vidi se da je na L\* vrijednost statistički značajno utjecala ( $p = 0,044$ ) interakcija različitog izvora minerala i različite razine dodatka vitamina A. Na a\* i b\* vrijednost statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) pokazao je hibrid kukuruza pa su tako uzroci s hibridom Bc572 pokazali nešto veće a\* i b\* vrijednosti u odnosu na jaja s hibridom Os403. Osim toga, interakcija različitog izvora minerala i različite razine dodatka vitamina A ( $p = 0,001$ ) utjecala je na a\* vrijednost. Prema istraživanju Park i sur. (2004) dodatak organskog željeza u hranidbene smjese nesilica poboljšao je intenzitet smeđe boje ljuske jaja, a dobivene rezultate doveli su u vezu s tim da povećane razine željeza dovode do proporcionalnog povećanja pigmenta protoporfirina-IX koji sadrži željezo. U skladu s tim je i istraživanje Seo i sur. (2010) u kojem je dokazano da dodatak željeza vezanog na sojin proteinat povećava intenzitet boje ljuske.

Prema indeksu oblika jaja se mogu klasificirati u tri skupine: duguljasta čiji je indeks manji od 72 %, standardna čiji je indeks između 72 i 76 % te okrugla s indeksom većim od 76 (Philippe i sur., 2020). Kod ispitivanih uzoraka jaja indeks oblika iznosio je 79,12 (T9) - 82,40 (T10) %, odnosno spadaju u skupinu okruglog oblika. Iako se indeks oblika može činiti kao manje važan pokazatelj kvalitete konzumnih jaja, utječe na postotak razbijenih jaja. Oštar oblik jaja povećava rizik od padanja jaja iz gnijezda, što može dovesti do oštećenja ljuske (Philippe i sur., 2020). Isto tako, okrugla jaja i neuobičajeno duga jaja ne stanu u kartonsku ambalažu, zbog čega je veća vjerojatnost da će se oštetiti ili razbiti tijekom rukovanja, pakiranja, transporta i skladištenje u odnosu na jaja normalnog oblika (Čobanović i sur., 2022). Na indeks oblika kao što se vidi u Tablici 9. statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) nije pokazao niti jedan dodatak u hranidbenim tretmanima kao ni njihova interakcija. Ovakav rezultat u skladu je s istraživanjem Yenice i sur. (2015) u kojem suplementacija krmne smjese za kokoši nesilica s različitim koncentracijama organskih i anorganskih minerala nije pokazala značajan utjecaj ( $p > 0,05$ ) na indeks oblika jaja, debljinu ljuske, postotak razbijenih jaja i visinu bjelanjka.

Za proizvođače jedan od bitnih parametara kvalitete jaja su debljina i masa ljuske koje u konačnici imaju najveći utjecaj na njenu čvrstoću. Yan i sur. (2014) su utvrdili da je čvrstoća ljuske povezana s ujednačenosti debljine ljuske, pa su tako jaja tanje, ali ujednačenije ljuske otpornija na lom. Debljina ljuske ispitivanih jaja varirala je od 0,48 mm (T8) do 0,63 mm (T3). Statistički značajan utjecaj pri tom je imao hibrid kukuruza ( $p = 0,013$ ), interakcija hibrida kukuruza i oblika minerala ( $p < 0,001$ ) te interakcija hibrida kukuruza, oblika minerala i različita razina dodatka vitamina A ( $p = 0,018$ ). U istraživanju Ghasemi i sur. (2022) korištene su eksperimentalne smjese u kojima su anorganski minerali u potpunosti ili djelomično zamijenjeni organskim. Rezultati istraživanja pokazuju da su proizvodnja jaja, masa jaja i debljina ljuske jaja bolje ( $p < 0,001$ ) kod jaja kokoši nesilica koje su hranjene smjesama koje su uključivale neki od izvora minerala. Isto tako, veća težina ljuske jaja primijećena je kod nesilica hranjenih smjesama koje su uključivale zamjenu anorganskih minerala, organskim u udjelu od 66 i 100 %. Gheisar i sur. (2011) su utvrdili da uključivanje organskog cinka, mangana i bakra u krmiva na bazi kukuruza i soje poboljšava kvalitetu ljuske jajeta. Slična poboljšanja u jačini ljuske jajeta, kao i u smanjenju stope razbijenih jaja i jaja bez ljuske, primijećena su u istraživanju Kim i sur. (2022), što su doveli u vezu s visokim sadržajem magnezija u ljusci jajeta. Prema Yuan i sur. (2014) suplementacija krmnih smjesa s vitaminom A u rasponu 5000 - 35000 IJ/kg u početku eksperimenta nije imala utjecaj na debljinu ljuske, međutim nakon 24. tjedna visoke razine vitamina A krenule su negativno utjecati na debljinu ljuske. Zaključeno je kako visoke doze vitamina A reduciraju apsorpciju minerala iz hranidbenih smjesa kokoši nesilica te tako štetno djeluju na formiranje ljuske jaja.

#### 4.5.2. Unutarnji pokazatelji kvalitete jaja

U Tablici 11. prikazani su rezultati utjecaja različitih tretmana (vitamina A u različitim koncentracijama, minerala u različitim formama te hibrida kukuruza) na unutarnje parametre kvalitete jaja: parametre boje žumanjka ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ), pH vrijednost bjelanjka i žumanjka te udjele žumanjka, bjelanjka i ljuske.

Tablica 11. Utjecaj hibrida kukuruza, vitamina A i izvora minerala na unutarnje pokazatelje kvalitete jaja

Tretmani	Boja žumanjka			pH (bjelanjak)	pH (žumanjak)	Udio žumanjka (%)	Udio bjelanjka (%)	Udio ljuske (%)
	$L^*$	$a^*$	$b^*$					
T1	45,81	2,17	28,25	8,80	6,13	25,16	61,63	13,21
T2	46,14	1,81	30,07	8,83	6,19	26,97	60,42	12,61
T3	46,67	1,48	29,50	8,88	6,10	25,70	60,37	13,93
T4	44,54	2,14	30,00	8,86	6,14	25,97	61,15	12,88
T5	45,98	2,03	30,79	8,85	6,12	26,14	60,79	13,07
T6	45,98	1,99	29,43	8,86	6,09	25,74	60,49	13,77
T7	44,39	1,41	29,37	8,81	6,01	26,45	59,54	14,01
T8	45,50	1,17	29,93	8,65	6,01	24,08	62,47	13,45
T9	47,14	1,87	32,73	8,59	6,13	26,66	60,13	13,20
T10	46,04	1,51	33,85	8,76	6,10	26,54	60,08	13,38
T11	44,86	2,22	32,22	8,94	6,09	25,78	60,70	13,52
T12	45,35	1,47	31,36	8,88	6,02	27,18	59,42	13,40
SEM	0,24	0,10	0,47	0,03	0,02	0,24	0,25	0,12
Hibrid kukuruza (H)	0,292	0,001	< 0,001	0,136	< 0,001	0,672	0,382	0,246
Izvor minerala (M)	0,122	0,020	0,014	0,058	0,909	0,386	0,452	0,317
Vitamin A (V)	0,030	0,474	0,694	0,960	0,733	0,599	0,329	0,372
H x M	0,422	0,871	0,242	0,114	0,127	0,487	0,659	0,714
H x V	0,450	0,027	0,174	0,661	0,070	0,045	0,221	0,081
M x V	0,201	0,039	0,006	0,396	0,023	0,983	0,811	0,393
H x M x V	0,052	0,001	0,257	0,185	0,009	0,429	0,586	0,780

\*U tablici su prikazane srednje vrijednosti rezultata s pripadajućim standardnim pogreškama. SEM – standardna pogreška;  $p < 0,05$  – postoji statistički značajna razlika;  $p > 0,05$  – ne postoji statistički značajna razlika; H x M – interakcija hibrida i izvora minerala; H x V – interakcija hibrida i vitamina ; M x V – interakcija izvora minerala i vitamina A; H x M x V – interakcija hibrida, izvora minerala i vitamina A



Na boju žumanjaka može utjecati hranidba kokoši posebice odabirom određenih hibrida kukuruza koji zbog visokog udjela karotenoida utječu na žuto-narančastu obojenost žumanjka (Fraeye i sur., 2020). Upravo kukuruz, koji je najčešća sastavnica krmiva za kokoši, posjeduje značajan udio karotenoida čiji je profil idealan za razvoj dobre obojenosti žumanjaka (Kljak i sur, 2021). Prema Muhammad i sur. (2021), dodatak selena iz anorganskog izvora utječe na povećanje vrijednosti parametra  $L^*$  žumanjka, dok dodatak selena iz organskog izvora uzrokuje povećanje parametara  $a^*$  i  $b^*$ , tj. jaja su crvenija i žuća. Konkretni utjecaj dodatka vitamina A u prehranu kokoši na obojenost žumanjka još uvijek nije dovoljno istražen. Istraživanje koje su proveli Yuan i sur. (2014), utvrđeno je linearno smanjenje boje žumanjka povećanjem koncentracije suplementiranog vitamina A. Boja žumanjka uvelike je pod utjecajem žutih u mastima topljivih pigmenata te je njihova apsorpcija smanjena visokim unosom vitamina A (Mendonca i sur., 2002; Surai i sur., 1998). U istraživanju Gan i sur. (2020) utvrđeno je da dvostruka koncentracija vitamina topljivih u vodi, u odnosu na kontrolnu grupu, ima značajan utjecaj na boju žumanjka, dok dvostruka doza vitamina topljivih u mastima, u odnosu na kontrolnu grupu, nije imala značajan učinak.

Rezultati CIELab mjerenja parametara boje žumanjaka ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) prikazani u Tablici 10. potvrđuju da hibrid kukuruza utječe na boju žumanjaka te da dodatak vitamina A i minerala također ima značajno djelovanje. Vrijednosti parametra  $L^*$  žumanjka variraju između 44,39 (T7) i 47,14 (T9). Uočeno je da na razinu svjetline žumanjka značajno utječe količina dodanog vitamina A ( $p = 0,030$ ), tj. povećanje koncentracije dodanog vitamina rezultira višim vrijednostima parametra  $L^*$ , dok ostali tretmani nemaju značajan utjecaj ( $p > 0,05$ ). Na parametar  $a^*$ , odnosno obojenost žumanjka u crvenom dijelu spektra, značajan utjecaj imali su hibrid kukuruza ( $p = 0,001$ ) i izvor minerala ( $p = 0,020$ ) te međusobne interakcije tretmana (H x M, M x V i H x M x V). Raspon vrijednosti parametra  $a^*$  kretao se između 1,17 (T8) i 2,17 (T1). Nešto više vrijednosti parametra  $a^*$  imala su jaja kokošiju hranjenih hibridom Bc572 uz dodatak minerala iz organskog izvora, što je u skladu s istraživanjem Muhammad i sur. (2021). Povećanje koncentracije vitamina A u krmivu nije značajno utjecalo na vrijednosti parametra  $a^*$ . Na vrijednosti parametra  $b^*$  značajan utjecaj imali su samo hibrid kukuruza i izvor minerala. Najmanju vrijednost parametra  $b^*$  imala su jaja kokošiju hranjenih hranidbenim tretmanom T1 (28,25), a najveću hranidbenim tretmanom T10 (33,85). Veće vrijednosti parametra  $b^*$  imala su jaja kokoši čija je hranidba sadržavala hibrid Os403 uz dodatak minerala iz organskog izvora. Povećanje koncentracije vitamina A u krmivu također nije imalo značajan utjecaj na vrijednosti parametra  $b^*$ .

Prosječna pH vrijednost bjelanjaka u svježim jajima varira između 7,6 i 7,9. Starenjem jaja, pH vrijednost se povećava na oko 9,0 do 9,4 zbog gubitka ugljikovog dioksida u bjelanjku (Johny i sur., 2022). Žumanjci pokazuju veću stabilnost pH vrijednosti te s vremenom ne dolazi do

većih promjena, a prosječne pH vrijednosti u svježim jajima se kreću između 6,0 i 6,6 jedinica (López-Martínez i sur., 2021). Iz rezultata prikazanih u Tablici 10. uočljivo je da na pH vrijednost bjelanjka navedeni tretmani nisu imali značajan utjecaj ( $p > 0,05$ ) iako su vrijednosti nešto veće od prosječnih pH vrijednosti bjelanjaka u svježim jajima. Ovakvo povećanje pH vrijednosti može se pripisati dužem vremenu skladištenja jaja. U žumanjku, pH vrijednosti su bile unutar granica prosječnih pH vrijednosti. Na vrijednosti su značajan utjecaj imali hibrid kukuruza ( $p < 0,001$ ) te interakcije minerala i vitamina ( $p = 0,023$ ) te hibrida, minerala i vitamina ( $p = 0,009$ ). Nešto više vrijednosti imala su jaja kokošiju hranjenih hibridom Bc572 uz dodatak minerala iz anorganskog izvora.

Prema istraživanju provedenom od strane Fernandes i sur. (2008), suplementacija mineralima iz organskog izvora, posebice selenom, ima pozitivan utjecaj na postotak žumanjka u jajetu, dok se povećanjem koncentracije suplementiranih minerala u krmivu nije uočila značajna razlika u postotku ljuske. Suprotno tome, Stefanello i sur. (2014) nisu utvrdili značajan utjecaj suplementacije mineralima iz različitih izvora na postotak ljuske. Iz podataka o udjelima pojedine komponente jaja u Tablici 10., vidljivo je da je jedini značajan utjecaj imala interakcija hibrida i vitamina A ( $p = 0,045$ ) na udio žumanjka u jajetu. Udio žumanjka u jajima je varirao od 24,08 (T8) % do 27,18 % (T12). Promatranjem prosječnih vrijednosti, nešto veći udio žumanjka bio je prisutan u jajima kokošiju hranjenih hibridom Os403, a povećanjem koncentracije vitamina A došlo je do neznatnog rasta udjela što je u skladu i s gore navedenim literaturnim navodima. Također, s povećanjem udjela žumanjka u jajetu smanjen je udio bjelanjka. Na ostale komponente jaja nije bilo značajnog utjecaja, što je posebice neočekivano kod udjela ljuske na koji suplementacija mineralima, bez obzira na izvor, nije imala nikakav značajan utjecaj. Udjeli ljuske varirali su u rasponu od 12,61 % (T2) do 14,01 % (T7).

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata i provedene rasprave možemo doći do sljedećih zaključaka:

1. Usporedbom sastava masnih kiselina hibrida kukuruza Bc572 i Os403 uočena je statistički značajna razlika, posebice u udjelima ukupnih mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina. Hibrid Bc572 imao je nešto veći udio PUFA (58,72%), dok je hibrid Os403 imao veći udio MUFA (28,78%).
2. Ukupni udio zasićenih masnih kiselina među hibridima nije se značajno razlikovao. U hibridu Os403 stearinska i beheninska masna kiselina bila su zastupljene u većem udjelu.
3. Dodatak vitamina A i minerala iz različitih izvora imao je značajan utjecaj na sastav masnih kiselina u smjesama za hranidbu kokoši. Uočen je pozitivan utjecaj na smanjenje udjela SFA u odnosu na same hibride zbog čega su omjeri MUFA/SFA i PUFA/SFA optimalniji. No, bitno je naglasiti da je negativan utjecaj bio na omjer omega-6 i omega-3 masnih kiselina koji se u odnosu na sastav hibrida kukuruza značajno povećao.
4. Hibrid kukuruza pokazao je značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) na sastav masnih kiselina jaja. Pri čemu je kod hibrida Os403 došlo do povećanja udjela PUFA te time i boljeg omjera PUFA/SFA te n-6/n-3 masnih kiselina. Dok je hibrid Bc572 imao utjecaj na udio SFA i MUFA.
5. Dodatak vitamina A je utjecao na sastav MUFA te C20:4 n-6 masne kiseline u ispitivanim uzorcima jaja. Tako je primijećen trend povećanja udjela navedenih masnih kiselina s povećanjem količine dodanog vitamina A.
6. Utjecaj izvora minerala ( $p < 0,05$ ) uočen je kod interakcije s vitaminom A i hibridom kukuruza kod omjera n-6/n-3 i udjela palmitoleinske masne kiseline. Samostalno, izvor minerala utjecao je na udio elaidinske masne kiseline. Veći udio elaidinske masne kiseline zabilježen je kod tretmana s organskim izvorom minerala u odnosu na anorganski.
7. Kvaliteta masti procijenjena je na temelju aterogenih (AI), trombogenih (TI) indeksa, indeksa omjera hipokolesterolemičnih i hiperkolesterolemičnih masnih kiselina (HHI), indeksa zasićenja (SI), indeksa peroksidabilnosti (PI), kao i izračun poželjnih masnih kiselina (DFA). Jaja iz hranidbenih tretmana s dodatkom hibrida Os403 pokazala su bolje vrijednosti AI, HHI i DFA, međutim lošiju PI vrijednost zbog većeg udjela nezasićenih masnih kiselina. Prema tome s nutritivnog i zdravstvenog aspekta hibrid Os403 se kao dodatak u hranidbu kokoši nesilica pokazao boljim u odnosu na Bc572.

Tako je primijećeno da je najmanja TI vrijednost za hibrid Bc572 zabilježena kod dodatka 5000 IJ/kg vitamina A, dok je za hibrid Os403 zabilježena kod dodatka 20000 IJ/kg.

8. Interakcija različitog izvora minerala i različite razine dodatka vitamina A pokazala statističku značajnu razliku ( $p = 0,045$ ) te su tako jaja kokoši hranjenih s anorganskim izvorom minerala i dodatkom 5000 IJ/kg vitamina A imala najmanju masu dok su uzorci jaja kokoši hranjenih s organskim izvorom minerala i dodatkom 5000 IJ/kg vitamina A imala najveću masu.
9. Na indeks oblika jaja statistički značajan utjecaj nije pokazao niti jedan dodatak u hranidbenim tretmanima kao ni njihova interakcija.
10. Debljina ljuske ispitivanih jaja varirala je od 0,48 mm (T8) do 0,63 mm (T3). Statistički značajan utjecaj pri tom je imao hibrid kukuruza ( $p = 0,013$ ), interakcija hibrida kukuruza i oblika minerala ( $p < 0,001$ ) te interakcija hibrida kukuruza, oblika minerala i različita razina dodatka vitamina A ( $p = 0,018$ ). Najdeblja ljuska zabilježena je kod hranidbenog tretmana s hibridom Os403, anorganskim izvorom minerala i dodatkom 10000 IJ/kg vitamina A.
11. Površina ispitivanih jaja iznosila je 71,36 (T3) – 73,05 (T9), pri tom je i kod kombinacije organskog i anorganskog izvora minerala veća površina zabilježena kod dodatka 20000 IJ/kg vitamina A.
12. Na boju ljuske jaja utjecao je hibrid kukuruza te interakcija izvora minerala i vitamina A. Veće  $L^*$  vrijednosti zabilježene su kod kombinacije organskog izvora minerala i dodatka 10000 IJ/kg vitamina A. Na  $a^*$  i  $b^*$  vrijednost statistički značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) pokazao je hibrid kukuruza pa su tako uzroci s hibridom Bc572 pokazali veće  $a^*$  i  $b^*$  vrijednosti u odnosu na jaja s hibridom Os403. Osim toga, interakcija različitog izvora minerala i različite razine dodatka vitamina A ( $p = 0,001$ ) utjecala je na  $a^*$  vrijednost. Tako je zabilježen trend smanjenja  $a^*$  vrijednosti s dodatkom veće količine vitamina A.
13. Povećanje koncentracije dodanog vitamina A u smjesu rezultirao višim vrijednostima parametra  $L^*$  žumanjka. Veće vrijednosti parametra  $a^*$  zabilježene su kod hibrida kukuruza Bc572, dok su kod hibrida Os403 zabilježene veće vrijednosti parametra  $b^*$ . Osim toga, veće vrijednosti parametara  $a^*$  i  $b^*$  žumanjaka imala su jaja kokošiju hranjenih smjesama s dodatkom minerala iz organskog izvora, dok vitamin A nije imao utjecaj na navedene vrijednosti.

14. Tretmani nisu imali značajan utjecaj na pH vrijednosti bjelanjaka. Suprotno tome, na pH vrijednost žumanjaka značajan utjecaj imali su hibrid te interakcije vitamina A i izvora minerala pa je su tako jaja kokošiju hranjenih hibridom Bc572 uz dodatak minerala iz anorganskog izvora imala nešto više pH vrijednosti.
15. Veći udio žumanjaka bio je prisutan u jajima kokošiju hranjenih hibridom Os403 te je povećanjem koncentracije dodanog vitamina A uočen neznatan rast udjela. Porastom udjela žumanjka, smanjivao se udio bjelanjka u jajetu. Na udio ljuske suplementacija mineralima, bez obzira na izvor, nije imala značajan utjecaj.

## **6. ZAHVALE**

Izražavamo iskrenu zahvalnost izv. prof. dr. sc. Nives Marušić Radovčić na podršci i entuzijazmu s kojima je prihvatila naš zahtjev za mentorstvom. Hvala Vam na strpljenju, razumijevanju i vrijednim savjetima koji su nas vodili kroz cijeli proces. Na kraju, posebnu zahvalnost upućujemo jedna drugoj za stalnu podršku, razumijevanje i uzajamno poticanje na napredak.

## 7. LITERATURA

Abd El-Hack ME, Mahrose K, Askar AA, Alagawany M, Arif M, Saeed M i sur. (2017) Single and Combined Impacts of Vitamin A and Selenium in Diet on Productive Performance, Egg Quality, and Some Blood Parameters of Laying Hens During Hot Season. *Biol Trace Elem Res* **177(1)**, 169–179. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0862-5>

Aguillón-Páez YJ, Romero LA, Diaz GJ (2020) Effect of full-fat sunflower or flaxseed seeds dietary inclusion on performance, egg yolk fatty acid profile and egg quality in laying hens. *Anim Nutr* **6(2)**, 179-184. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.12.005>

Ahmad S, Haq AU, Yousaf M, Kamran Z, Rehman AU, Suhail MU, Samad HA (2013) Effect of canola oil and vitamin A on egg characteristics and egg cholesterol in laying hens during hot summer months. *Pak Vet J* **33(3)**, 346–349.

Alagwany M, Elnesr SS, Farag MR, El-Hack MEA, Khafaga AF, Taha AE i sur. (2019) Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids in Poultry Nutrition: Effect on Production Performance and Health. *Animals (Basel)* **9(8)**, 573. <https://doi.org/10.3390/ani9080573>

Akdemir F, Orhan C, Sahin N, Sahin K, Hayirli A (2012) Tomato powder in laying hen diets: effects on concentrations of yolk carotenoids and lipid peroxidation. *Brit Poultry Sci* **53(5)**, 675-680. <https://doi.org/10.1080/00071668.2012.729142>

Alkan S, Karsli T, Galic A, Karabag K (2013) Determination of phenotypic correlations between internal and external quality traits of guinea fowl eggs. *Kafkas Univ Vet Fak*, **19(5)**, 861-867. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2013.8988>

Andrews NC (2002) Metal transporters and disease. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 181–186. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00307-1](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00307-1)

Ansari R, Azarbajehani A, Ansari S, Asgari S, Gheisari A (2006) Production of egg enriched with omega-3 fatty acids in laying hens. *ARYA J* **1(4)**, 242-246.

Anton M (2013) Egg yolk: Structures, functionalities and processes. *J Sci Food Agric* **93(12)**, 2871–2880. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6247>

Amjad Khan W, Chun-Mei H, Khan N, Iqbal A, Lyu SW, Shah F (2017) Bioengineered plants can be a useful source of omega-3 fatty acids. *BioMed Res Int* **2017(1)**, 7348919. <https://doi.org/10.1155/2017/7348919>

Applegate TJ, Angel R (2014) Nutrient requirements of poultry publication: History and need for an update. *J Appl Poultry Res* **23(3)**, 567-575. <https://doi.org/10.3382/japr.2014-00980>

Arakawa K, Sagai M (1986) Species differences in lipid peroxide levels in lung tissue and investigation of their determining factors. *Lipids* **21**, 769–775. <https://doi.org/10.1007/BF02535410>

Attia YA, Al-Harhi MA, Al-Sagan AA, Alqurashi AD, Korish MA, Abdulsalam NM, Olal MJ, Bovera F (2022) Dietary Supplementation with Different  $\omega$ -6 to  $\omega$ -3 Fatty Acid Ratios Affects the Sustainability of Performance, Egg Quality, Fatty Acid Profile, Immunity and Egg Health Indices of Laying Hens. *Agriculture* **12(10)**, 1712. <https://doi.org/10.3390/agriculture12101712>

Attia YA, Al-Harhi MA, Shiboob MM (2014) Evaluation of quality and nutrient contents of table eggs from different sources in the retail market. *Itla J Anim Sci* **13**, 3294. <https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3294>

Ayerza R, Coates W (2000) Dietary development of chia: influence of yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. *Poult Sci* **79(5)**, 724–739. <https://doi.org/10.1093/ps/79.5.724>

Baéza E, Chartrin P, Lessire M, Météau K, Chesneau G, Guillevic M i sur. (2015) Is it possible to increase the n-3 fatty acid content of eggs without affecting their technological and/or sensorial quality and the laying performance of hens?. *Brit Poultry Sci* **56(6)**, 748-754. <https://doi.org/10.1080/00071668.2015.1113500>

Barber SJ, Parker HM, McDaniel CD (2005) Broiler breeder semen quality as affected by trace minerals in vitro. *Poult Sci* **84(1)**, 100-105. <https://doi.org/10.1093/ps/84.1.100>

Baucells MD, Crespo N, Barroeta AC, Lopez-Ferrer S, Grashorn MA (2000) Incorporation of different polyunsaturated fatty acids into eggs. *Poult Sci* **79(1)**, 51–59. <https://doi.org/10.1093/ps/79.1.51>

Bień D, Michalczyk M, Szkopek D, Kinsner M, Konieczka P (2022) Changes in lipids metabolism indices as a result of different form of selenium supplementation in chickens. *Sci Rep* **12(1)**, 13817. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18101-2>

Blaner WS (2019) Vitamin A signaling and homeostasis in obesity, diabetes, and metabolic disorders. *Pharmacol therapeut* **197**, 153-178. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.01.006>

Benatti P, Peluso G, Nicolai R, Calvani M (2004) Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J Am Coll Nutr* **23(4)**, 281-302. <https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719371>

Bregendahl K, Roberts SA, Kerr B, Hoehler D (2008) Ideal ratios of isoleucine, methionine, methionine plus cystine, threonine, tryptophan, and valine relative to lysine for white leghorn-



type laying hens of twenty-eight to thirty-four weeks of age. *Poult Sci* **87(4)**, 744-758. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00412>

Bouvarel I, Nys Y, Lescoat P (2011) Hen nutrition for sustained egg quality. U: Nys Y, Bain M, Immerseel F(ured.) Improving the safety and quality of eggs and egg products, 1. izd., Woodhead Publishing, Duxford/Cambridge/Kidlington, str. 272-288. <https://doi.org/10.1533/9780857093912.3.261>

Buckiuniene V, Grashorn MA, Gruzauskas R, Kliseviciute V, Raceviciute-Stupeliene A, Svirmickas G i sur. (2016) Effect of organic and inorganic iron in the diet on yolk iron content, fatty acids profile, malondialdehyde concentration, and sensory quality of chicken eggs. *Eur Poultry Sci/Archiv für Geflügelkunde* **80**,139. <https://doi.org/10.1399/eps.2016.139>

Calder PC (2015) Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *Jpen-Parenteral Enter* **39**, 18-32. <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>

Carazo A, Macáková K, Matoušová K, Krčmová LK, Protti M, Mladěnka P (2021) Vitamin A update: forms, sources, kinetics, detection, function, deficiency, therapeutic use and toxicity. *Nutrients* **13(5)**, 1703. <https://doi.org/10.3390/nu13051703>

Cavero D, Schmutz M, Icken W, Preisinger R (2012) Attractive eggshell color as a breeding goal. *Lofmann Information* **47(2)**, 15-21.

Chen F, Jiang Z, Jiang S, Li L, Lin X, Gou Z, Fan Q (2016) Dietary vitamin A supplementation improved reproductive performance by regulating ovarian expression of hormone receptors, caspase-3 and Fas in broiler breeders. *Poult Sci* **95**, 30–40. <https://doi.org/10.3382/ps/pev305>

Coorey R, Novinda A, Williams H, Jayasena V (2015) Omega-3 fatty acid profile of eggs from laying hens fed diets supplemented with chia, fish oil, and flaxseed. *J Food Sci* **80(1)**, 180-187. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12735>

Cozzolino SMF (1997) Biodisponibilidade de minerais. *Revista de nutrição* **10**, 87-98. <https://doi.org/10.1590/S1415-52731997000200001>

Crosara FSG, Santos SKA, Silva LSS, Carvalho GL, Litz FH, Fernandes EA (2021) Organic copper, iron, manganese and zinc: digestibility, production parameters and egg quality of layers. *Arq Bras Med Vet Zoo* **73**, 733-741. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-12195>

Čobanović N, Todorović N, Kovandžić M, Vičić I, Suvajdžić B, Grković N i sur. (2022) Assesment of marketed table egg quality originating from different production system. *Sci J "Meat Technology"* **63(1)**, 66-76. <https://doi.org/10.18485/meattech.2022.63.1.7>

Donalson LM, Kim WK, Woodward C, Herrera P, Kubena LF, Nisbet DJ i sur. (2005) Utilizing different ratios of alfalfa and layer ration for molt induction and performance in commercial laying hens. *Poult Sci* **84**, 362–369. <https://doi.org/10.1093/ps/84.3.362>

EFSA (European Food Safety Authority) (2013) Scientific Opinion on the Safety and Efficacy of Vitamin A (Retinyl Acetate, Retinyl Palmitate and Retinyl Propionate) as a Feed Additive for All Animal Species and Categories. *EFSA J* **11**, 3037. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3037>

Fernandes JIM, Murakami AE, Sakamoto MI, Souza LMG, Malaguido A, Martins EN (2008) Effects of organic mineral dietary supplementation on production performance and egg quality of white layers. *Braz J Poultry Sci* **10(1)**, 59-65 <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2008000100009>

Ferreira JA, Geraldo A, Kaique Valentim J, Silva EA, Miranda DA, Lemke SSR i sur. (2022) Emulsifier inclusion in diets with energy reduction for laying hens. *Cuban J Agri Sci* **56**, 1–9.

Fraeye I, Bruneel C, Lemahieu C, Buyse J, Muylaert K, Foubert I (2020). Dietary enrichment of eggs with omega-3 fatty acids: A review. *Food Res Int* **48(2)**, 696-705. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.014>

Gan L, Zhao Y, Mahmood T, Guo Y (2020) Effects of dietary vitamins supplementation level on the production performance and intestinal microbiota of aged hens. *Poult Sci* **99**, 3594-3605 <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.04.007>

Gao Y C, Charter EA (2000) Nutritionally important fatty acids in hen egg yolks from different sources. *Poult Sci* **79**, 921– 924. <https://doi.org/10.1093/ps/79.6.921>

Gautron J, Réhault-Godbert S, Nys Y, Mann K, Righetti PG (2011) Use of high-throughput technology to identify new egg components. U: Van Immerseel F, Nys Y, Bain M (ured.) Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, str. 133–150. <https://doi.org/10.1533/9780857093912.2.133>

Ghasemi HA, Hajkhodadadi I, Hafizi M, Fakharzadeh S, Abbasi M, Kalanaky S i sur. (2022). Effect of advanced chelate compounds-based mineral supplement in laying hen diet on the performance, egg quality, yolk mineral content, fatty acid composition, and oxidative status. *Food Chem* **366**, 130636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130636>

Gheisari AA, Sanei A, Samie A, Gheisari MM, Toghyani M (2011) Effect of diets supplemented with different levels of manganese, zinc, and copper from their organic or inorganic sources on egg production and quality characteristics in laying hens. *Biol Trace Elem Res* **142**, 557–571. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8779-x>

- Godos J, Micek A, Brzostek T, Toledo E, Iacoviello L, Astrup A i sur. (2021) Egg consumption and cardiovascular risk: A dose–response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Nutr* **60**, 1833–1862. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02345-7>
- Grabovskyi M, Kucheruk P, Pavlichenko K, Roubík H (2023) Influence of macronutrients and micronutrients on maize hybrids for biogas production. *Environ Sci Pollut Res* **30**, 70022–70038. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27235-3>
- Grbeša D (2016) Hranidbena svojstva kukuruza. Bc Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja. str. 44-45
- Grčević M, Kralik Z, Kralik G, Galović O (2019) Effects of dietary marigold extract on lutein content, yolk color and fatty acid profile of omega-3 eggs. *J Sci Food Agr* **99(5)**, 2292-2299. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9425>
- Grobas S, Mendez J, Lazaro R, de Blas C and Mateos GG (2001) Influence of sources and percentage of fat added to diet on performance and fatty acid composition of egg yolks of two strains of laying hens. *Poult Sci* **80**, 1171–1179. <https://doi.org/10.1093/ps/80.8.1171>
- Gugała D, Flis M, Grela ER (2019) The effect of zinc, iron, calcium, and copper from organic sources in pheasant diet on the performance, hatching, minerals, and fatty acid composition of eggs. *Poult Sci* **98(10)**, 4640–4647. <https://doi.org/10.3382/ps/pez162>
- Gul M, Yoruk MA, Aksu T, Kaya A, Kaynar O (2012) The effect of different levels of canola oil on performance, egg shell quality and fatty acid composition of laying hens. *Int J Poultry Sci* **11(12)**, 769–776. <https://doi:10.3923/ijps.2012.769.776>
- Herrera J, Saldaña B, Guzmán P, Ibáñez MA, Mandalawi H, Cámara L i sur. (2018) Particle size affects short-term preference behavior of brown-egg laying hens fed diets based on corn or barley. *Poult Sci* **97**, 1324–1333. <https://doi.org/10.3382/ps/pex441>
- Jalal MA, Scheideler SE (2001) Effect of supplementation of two different sources of phytase on egg production parameters in laying hens and nutrient digestibility. *Poult Sci* **80**, 1463–1471. <https://doi.org/10.1093/ps/80.10.1463>
- Jianmin Y, Roshdy AR, Guo Y, Wnad Y, Guo S (2014) Effect of Dietary Vitamin A on Reproductive Performance and Immune Response of Broiler Breeders. *PLoS one* **9(8)**, 105677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105677>
- Jiang YH, McGeachin RB, Bailey CA (1994)  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -carotene, and retinol enrichment of chicken eggs. *Poult Sci* **73**, 1137–1143. <https://doi.org/10.3382/ps.0731137> g

- Johny LC, Kudre TG, Suresh PV (2022) Production of egg white hydrolysate by digestion with pineapple bromelain: optimization, evaluation, and antioxidant activity study. *J Food Sci Tech* **59(5)**, 1769-1780. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05188-0>
- Jurinjak Tušek A, Jurina T, Čulo I, Valinger D, Gajdoš Kljussurić J, Benković M (2022) Application of NIRs coupled with PLS and ANN modelling to predict average droplet size in oil-in-water emulsions prepared with different microfluidic devices. *Spectrochim. Acta A Mol Biomol Spectrosc* **270**, 120860. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.120860>
- Kaul J, Jain K, Olakh D (2019) An overview on role of yellow maize in food, feed and nutrition. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* **8**, 3037–3048. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.802.356>
- Kim JE i Campbell WW (2018) Dietary Cholesterol Contained in Whole Eggs Is Not Well Absorbed and Does Not Acutely Affect Plasma Total Cholesterol Concentration in Men and Women: Results from 2 Randomized Controlled Crossover Studies. *Nutrients* **10**, 1272. <https://doi.org/10.3390/nu10091272>
- Kim CH, Jeong SH, Lim SJ, Cheon SN, Kim K. Chun J isur (2022) Effect of organic or inorganic mineral premix in the diet on laying performance of aged laying hens and eggshell quality. *Animals* **12**, 2378. <https://doi.org/10.3390/ani12182378>
- Kljak K, Duvnjak M, Grbeša D (2018) Contribution of zein content and starch characteristics to vitreousness of commercial maize hybrids. *J Cereal Sci* **80**, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.01.010>
- Kljak K, Duvnjak M, Bedeković D, Kiš G, Janječić Z, Grbeša D (2021) Commercial Corn Hybrids as a Single Source of Dietary Carotenoids: Effect on Egg Yolk Carotenoid Profile and Pigmentation. *Sustainability* **13**, 12287. <https://doi.org/10.3390/su132112287>
- Kljak K, Cerović-Stanko K, Kos I, Janječić Z, Kiš G, Duvnjak M i sur. (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. <https://doi.org/10.3390/foods10040721>
- Kljak K, Drdić M, Karolyi D, Grbeša D (2012) Pigmentation efficiency of Croatian corn hybrids in egg production. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **7**, 23-27.
- Kljak K, Zurak D, Svečnjak Z, Grbeša D (2024) Relationship of physical properties and macronutrient composition with carotenoid profile in maize hybrids. *Agriculture* **14(3)**, 384. <https://doi.org/10.3390/agriculture14030384>

Kralik G, Has-Schon E, Kralik D, Šperanda M (2008) PERADARSTVO Biološki i zootehnički principi, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, str. 61-82.

Kralik Z, Lovreković M (2018.): Utjecaj hranidbe na kvalitetu i obogaćivanje jaja funkcionalnim sastojcima. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu* **20(1)**, 58-65. <https://doi.org/10.31727/m.20.1.2>

Laudadio V, Ceci E, Edmondo M B, Lastella N, Tufarelli V (2015) Dietary highpolyphenols extra-virgin olive oil is effective in reducing cholesterol content in eggs. *Lipids Health Dis* **14**, 5. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0001-x>

Laudadio V, Tufarelli V (2011) Influence of substituting dietary soybean meal for dehulled-micronized lupin (*Lupinus albus* cv. Multitalia) on early phase laying hens production and egg quality. *Livest Sci* **140**, 184-188. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.03.029>

Leeson S, Summers JD (2001) Nutrition of the Chicken, 4 izd., University Books, Belgija

Liu H, Yu Q, Fang C, Chen S, Tang X, Ajuwon KM i sur. (2020) Effect of selenium source and level on performance, egg quality, egg selenium content, and serum biochemical parameters in laying hens. *Foods* **9**, 68. <https://doi.org/10.3390/foods9010068>

López-Martínez MI, Moreno-Fernández S, Miguel M (2021) Development of functional ice cream with egg white hydrolysates. *Int J Gastr Food Sci* **25**, 100334. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100334>

Lu MY, Xu L, Qi GH, Zhang HJ, Qiu K, Wang J i sur. (2021). Mechanisms associated with the depigmentation of brown eggshells: a review. *Poult Sci* **100(8)**, 101273. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101273>

Makkar HPS i Beever D (2013) Optimization of feed use efficiency in ruminant production systems. U: Proceedings of the FAO Symposium, 27.studeni 2012, Bangkok, Tajland. FAO animal production and health proceedings, **16**, Rim, str. 67–74

Mann K (2008) Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics* **8 (11)**, 2322–2332. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800032>

Mendonça Jr CX, Almeida CRM, Mori AV, Watanabe C (2002) Effect of dietary vitamin A on egg yolk retinol and tocopherol levels. *J Appl Poult Res* **11**, 373–378. <https://doi.org/10.1093/japr/11.4.373>

Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB (2003) Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and

apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* **77**, 1146-1155. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1146>

Mofrad DM, Naghshi S, Lotfi K, Beyene J, Hypponen E, Pirouzi A, Sadeghi O (2022) Egg and dietary cholesterol intake and risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Front Nutr* **9**, 878979. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.878979>

Mohammadifard N, Taheri M, Haghghatdoost F, Grau N, Najafian J, Sadeghi M i sur. (2022) Egg consumption and risk of cardiovascular events among Iranians: Results from Isfahan Cohort Study (ICS). *Eur J Clin Nutr* **76**, 1409–1414. <https://doi.org/10.1038/s41430-022-01118-1>

Moreira J, Santos CD, Abreu CMP, Bertechini AG, Oliveira DF, Cardoso MG (2001) Effect of sources and levels of selenium on physiological traits in broilers. *Cienc Agrotec* **25**, 664–666. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000300015>

Muhammad AI, Mohamed DAA, Chwen LT, Akit H, Samsudin AA (2021) Effect of Sodium Selenite, Selenium Yeast, and Bacterial Enriched Protein on Chicken Egg Yolk Color, Antioxidant Profiles, and Oxidative Stability. *Foods* **10**, 871 <https://doi.org/10.3390/foods10040871>

Nabi F, Arain MA, Rajput N, Alagawany M, Soomro M, Umer M i sur. (2020) Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry: a review. *J Anim Physiol Anim Nutr* **104**, 1809– 1818. <https://doi.org/10.1111/jpn.13375>

National Research Council (NRC) (1994) Nutrient requirements of poultry. 9.izd., National Academies Press, Washington

Nimalaratne C, Wu J (2015) Hen egg as an antioxidant food commodity: A review. *Nutrients* **7(10)**, 8274-8293. <https://doi.org/10.3390/nu7105394>

Nys Y, Guyot N (2011) Egg formation and chemistry. U: Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products, 1 izd., Woodhead Publishing Limited, Ujedinjeno Kraljevstvo, str. 83–132.

Nys Y, Gautron J, McKee MD, Garcia-Ruiz JM, Hincke MT (2007) Biochemical and functional characterization of eggshell matrix proteins in hens. *World's Poult Sci J* **57**, 401–413. <https://doi.org/10.1079/WPS20010029>

O'Byrne SM, Blamer WS (2013) Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J Lipid Res* **54**, 1731–1743. <https://doi.org/10.1194/jlr.R037648>



- Odabaşı AZ, Miles RD, Balaban MO, Portier KM (2007) Changes in brown eggshell color as the hen ages. *Poult Sci* **86**(2), 356-363. <https://doi.org/10.1093/ps/86.2.356>
- Oliveira DD, Baião NC, Cançado SV, Grimaldi R, Souza MR, Lara LJC i sur. (2010) Effects of lipid sources in the diet of laying hens on the fatty acid profiles of egg yolks. *Poult Sci* **89**, 2484–2490. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00522>
- Olukosi OA, van Kuijk SJA, Han Y (2019) Sulfate and hydroxychloride trace minerals in poultry diets - Comparative effects on egg production and quality in laying hens, and growth performance and oxidative stress response in broilers. *Poult Sci* **98**, str. 4961–4971. <https://doi.org/10.3382/ps/pez261>
- Omri B, Chalghoumi R, Izzo L, Ritieni A, Lucarini M, Durazzo A, Abdouli H, Santini A (2019) Effect of dietary incorporation of linseed alone or together with tomato-red pepper mix on laying hens' egg yolk fatty acids profile and health lipid indexes. *Nutrients* **11**(4), 813. <https://doi.org/10.3390/nu11040813>
- Paganelli CV, Olszowka A, Ar A (1974) The avian egg; surface area, volume and density. *The Condor*, **76**(3), 319-325. <https://doi.org/10.2307/1366345>
- Panaite TD, Turcu RP, Soica C, Visinescu P (2020) Nutritional parameters of eggs from laying hens fed with flaxseed meal or mixture with rapeseed meal or rice bran. *J Appl Anim Res* **48**(1), 566–574. <https://doi.org/10.1080/09712119.2020.1848846>
- Papadopoulos GA, Chalvatzi S, Kopecky J, Arsenos G, Fortomaris PD (2019) Effects of dietary fat source on lutein, zeaxanthin and total carotenoids content of the egg yolk in laying hens during the early laying period. *Brit Poultry Sci* **60**, 431–438. <https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1614526>
- Park JH, Upadhaya SD, Kim IH (2015) Effect of dietary marine microalgae (*Schizochytrium*) powder on egg production, blood lipid profiles, egg quality, and fatty acid composition of egg yolk in layers. *Asian Austral J Anim* **28**(3), 391. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0463>
- Park SW, Namkung H, Ahn HJ, Paik IK (2004) Production of iron enriched eggs of laying hens. *Asian Austral J Anim* **17**(12), 1725–1728. <https://doi.org/10.5713/ajas.2004.1725>
- Prakash B, Shanmugam M, Panda AK, Rao SV, Raju MV, Reddy MR (2014) Effect of feeding varying nutrient density diets on productive performance and semen quality parameters in Dahlem Red Birds. *Indian J Anim Nutr* **31**(4), 378-383. <http://dx.doi.org/10.5958/2231-6744.2019.00047.1>

- Philippe FX, Mahmoudi Y, Cinq-Mars D, Lefrançois M, Moula N, Palacios J i sur. (2020). Comparison of egg production, quality and composition in three production systems for laying hens. *Livest Sci* **232**, 103917. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.103917>
- Pilarczyk B, Tomza-Marciniak A, Pilarczyk R, Kuba J, Hendzel D, Udała J, Tarasewicz Z (2019) Eggs as a source of selenium in the human diet. *J Food Compos Anal* **78**, 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.01.014>
- Pita MCG, Piber Neto E, Carvalho PR, Mendonça CX. (2006) Effect of dietary supplementation of flaxseed, canola oil and vitamin E upon polyunsaturated fatty acids in chicken eggs. *Arq Bras Med Vet Zoo* **58**, 925–931. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000500031>
- Popa CD, Arts E, Fransen J, van Riel PL (2012) Atherogenic index and highdensity lipoprotein cholesterol as cardiovascular risk determinants in rheumatoid arthritis: the impact of therapy with biologicals. *Mediat Inflamm* **2012(1)**, 785946. <https://doi.org/10.1155/2012/785946>
- Poureslami R, Raes K, Huyghebaert G, Batal AB, De Smet S (2012). Egg yolk fatty acid profile in relation to dietary fatty acid concentrations. *J Sci Food Agr* **92(2)**, 366-372. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4587>
- Poureslami R, Turchini GM, Raes K, Huyghebaert G, De Smet S (2010) Effect of diet, gender, and age on fatty acid metabolism in broilers: saturated and monounsaturated fatty acids. *Br J Nutr* **104**, 204–213. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000541>
- Qiu JL, Zhou Q, Zhu JM, Lu XT, Liu B, Yu DY i sur. (2020) Organic trace minerals improve eggshell quality by improving the eggshell ultrastructure of laying hens during the late laying period. *Poult Sci* **99**, 1483–1490. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.006>
- Qu KC, Li HQ, Tang KK, Wang ZY, Fan RF (2020) Selenium mitigates cadmium-induced adverse effects on trace elements and amino acids profiles in chicken pectoral muscles. *Biol Trace Elem Res* **193**, 234-240. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.041>
- Radanović A, Kralik G, Drenjančević I, Galović O, Košević M, Kralik Z (2023) n-3 PUFA Enriched Eggs as a Source of Valuable Bioactive Substances. *Foods* **12(23)**, 4202. <https://doi.org/10.3390/foods12234202>
- Radovčić A (2023) Obogaćivanje jaja s n-3 polinezasićenim masnim kiselinama i utjecaj konzumacije jaja na ljudsko zdravlje (disertacija)., Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- Recoules E, Lessire M, Labas V, Duclos MJ, Combes-Soia L, Lardic L i sur. (2019) Digestion dynamics in broilers fed rapeseed meal. *Sci Rep* **9(1)**, 3052. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38725-1>



Regina R, Beterchini AG (2010) Minerais. U: Regina R (ured.) Nutrição animal, principais ingredientes e manejo, 1. izd., Fundação Cargill, São Paulo, str. 173-205.

Rehault-Godbert S, Guyot N i Nys Y (2019) The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. *Nutrients* **11**, 684. <https://doi.org/10.3390/nu11030684>

Saenz E, Borrás L, Gerde JA (2021) Carotenoid profiles in maize genotypes with contrasting kernel hardness. *J Cereal Sci* **99**, 103206. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103206>

Sanlier N, Üstün D (2021) Egg consumption and health effects: A narrative review. *Concise Rev Hypoth Food Sci* **86**, 4250–4261. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15892>

Samiullah S, Roberts JR, Chousalkar K (2015) Eggshell color in brown-egg laying hens—a review. *Poult Sci* **94(10)**, 2566-2575. <https://doi.org/10.3382/ps/pev202>

Schwägele FC (2011) Egg quality assurance schemes and egg traceability. Van Immerseel F, Nys Y, Bain M (ured.) Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition str. 62-80. <https://doi.org/10.1533/9780857093912.1.62>

Schreiner M, Hulan HW, Razzazi-Fazeli E, Bohm J, Iben C (2004) Feeding laying hens seal blubber oil: Effects on egg yolk incorporation, stereospecific distribution of omega-3 fatty acids, and sensory aspects. *Poult Sci* **83**, 462–473. <https://doi.org/10.1093/ps/83.3.462>

Sanjeev P, Chaudhary DP, Sreevastava PS, Saha A, Rajenderan A, Sekhar JC i sur. (2014) Comparison of fatty acid profile of specialty maize to normal maize. *J Am Oil Chem Soc* **91**, 1001–1005. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2429-y>

Santos-Silva J, Bessa RJB, Santos-Silva F (2002) Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs: II. Fatty acid composition of meat. *Livest Prod Sci* **77**, 187–194. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00059-3)

Seo YM, Shin KS, Rhee A, Chi YS, Han J, Paik IK (2010) Effects of dietary Fe-soy proteinate and MgO on egg production and quality of eggshell in laying hens. *Asian Austral J Anim* **23(8)**, 1043–1048. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.10076>

Seyfori H, Ghasemi HA, Hajkhodadadi I, Hafizi M (2019) Effects of water supplementation of an organic acid-trace mineral complex on production and slaughter parameters, intestinal histomorphology, and macronutrient digestibility in growing ostriches. *Poult Sci* **98**, 4860–4867. <https://doi.org/10.3382/ps/pez221>

- Shah ASR, Çetingül IS (2022) Nutritional advances in production performance and product quality of poultry husbandry under heat stress. *Online J Anim Feed Res* **12**, 53–65. <https://dx.doi.org/10.51227/ojafr.2022.8>
- Shahid MS, Raza T, Wu Y, Hussain Mangi M, Nie W, Yuan J (2020) Comparative effects of flaxseed sources on the egg ALA deposition and hepatic gene expression in Hy-Line Brown hens. *Foods* **9(11)**, 1663. <https://doi.org/10.3390/foods9111663>
- Shakoor H, Khan MI, Sahar A, Khan MKI, Faiz F, Basheer Ahmad H (2020) Development of omega-3 rich eggs through dietary flaxseed and bioevaluation in metabolic syndrome. *Food Sci Nutr* **8(6)**, 2619-2626. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1522>
- Shojadoost B, Yitbarek A, Alizadeh M, Kulkarni RR, Astill J, Boodhoo N i sur. (2021) Centennial Review: Effects of vitamins A, D, E, and C on the chicken immune system. *Poult Sci* **100**, 100930. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.027>
- Singh AK, Ghosh TK, Haldar S (2015) Effects of methionine chelate- or yeast proteinate-based supplement of copper, iron, manganese and zinc on broiler growth performance, their distribution in the tibia and excretion into the environment. *Biol Trace Elem Res* **164**, 253–260. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0222-2>
- Simopoulos AP (2016) An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients* **8(3)**, 128. <https://doi.org/10.3390/nu8030128>
- Sirri F, Meluzzi A (2011) Modifying egg lipids for human health. U: Nys Y, Bain M, Immerseel F(ured.) Improving the safety and quality of eggs and egg products, 1. izd., Woodhead Publishing, Duxford/Cambridge/Kidlington, str. 272-288. <https://doi.org/10.1533/9780857093929.3.272>
- Sokoła-Wysoczańska E, Wysoczański T, Wagner J, Czyz K, Bodkowski R, Lochynski S i sur (2018) Polyunsaturated fatty acids and their potential therapeutic role in cardiovascular system disorders—a review. *Nutrients* **10**, 1561. <https://doi.org/10.3390/nu10101561>
- Spring P, Switzerland B (2013) The challenge of cost effective poultry and animal nutrition: Optimizing existing and applying novel concepts. *Lohmann Inf* **48**, 38–46.
- Surai PF, Ionov IA, Kuklenko TV, Kostjuk IA, Macpherson A i sur. (1998) Effect of supplementing the hen's diet with vitamin A on the accumulation of vitamins A and E, ascorbic acid and carotenoids in the egg yolk and in the embryonic liver. *Bras Poultry Sci* **39(2)**, 257–263. <https://doi.org/10.1080/00071669889222>

- Star L, van der Klis JD, Rapp C, Ward TL (2012) Bioavailability of organic and inorganic zinc sources in male broilers. *Poult Sci* **91**, 3115–3120. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02314>
- Stefanello C, Santos TC, Murakami AE, Martins EN, Carneiro TC (2014) Productive performance, eggshell quality, and eggshell ultrastructure of laying hens fed diets supplemented with organic trace minerals. *Poult Sci* **93**, 104-113. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03190>
- Stupin A, Mihalj M, Kolobarić N, Šušnjara P, Kolar L, Mihaljević Z i sur. (2020) Anti-Inflammatory Potential of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Enriched Hen Eggs Consumption in Improving Microvascular Endothelial Function of Healthy Individuals-Clinical Trial. *Int J Mol Sci* **21(11)**, 4149. <https://doi.org/10.3390/ijms21114149>
- Świątkiewicz S, Arczewska-Włosek A, Jozefiak D (2014) The efficacy of organic minerals in poultry nutrition: review and implications of recent studies. *World's Poult Sci J* **70(3)**, 475-486. <https://doi.org/10.1017/S0043933914000531>
- Tang SGH, Sieo CC, Kalavathy R, Saad W Z, Yong ST, Wong HK, Ho YW (2015) Chemical compositions of egg yolks and egg quality of laying hens fed prebiotic, probiotic, and synbiotic diets. *J Food Sci* **80(8)**, 1686-1695. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12947>
- Toomer OT, Hulse-Kemp AM, Dean LL, Boykin DL, Malheiros R, Anderson KE (2019) Feeding high-oleic peanuts to layer hens enhances egg yolk color and oleic fatty acid content in shell eggs. *Poult Sci* **98**, 1732–1748. <https://doi.org/10.3382/ps/pey531>
- Ulbricht TLV, Southgate DAT (1991) Coronary heart disease: seven dietary factors. *The lancet*, **338(8773)**, 985-992. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M)
- Untea AE, Varzaru I, Panaite TD, Gavris T, Lupu A, Ropota M (2020) The Effects of Dietary Inclusion of Bilberry and Walnut Leaves in Laying Hens' Diets on the Antioxidant Properties of Eggs. *Animals* **10(2)**, 191. <https://doi.org/10.3390/ani10020191>
- Uredba Komisije (EU) 2023/2465 o dopuni Uredbe (EU) br. 1308/2013 Europskog Parlamenta i Vijeća u pogledu tržišnih standarda za jaja i stavljanju izvan snage Uredbe Komisije (EZ) br.589/2008. [http://data.europa.eu/eli/reg\\_del/2023/2465/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_del/2023/2465/oj) pristupljeno: 20.07.2024.
- Vlaicu PA, Panaite TD, Turcu RP (2022) Enriching laying hens eggs by feeding diets with different fatty acid composition and antioxidants. *Sci Rep* **11**, 20707. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00343-1>
- Vrhovec L (2023) Fizikalno-kemijska i funkcionalna svojstva jaja kokoši nesilica hranjena različitim krmivima na bazi kukuruza, repičinog ulja i emulgatora (doktorska disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Yalcin H, Unal MK (2010) The Enrichment of Hen Eggs with  $\omega$ - 3 Fatty Acids. *J Med Food* **13**, 610-614. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0024>

Yan YY, Sun CJ, Lian L, Zheng JX, Xu GY, Yang N (2014) Effect of uniformity of eggshell thickness on eggshell quality in chickens. *Poult Sci* **51(3)**, 338–342. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0130032>

Yang FC, Xu F, Wang TN, Chen GX (2021). Roles of vitamin A in the regulation of fatty acid synthesis. *World J Clinical Cases* **9(18)**, 4506. <http://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v9.i18.4506>

Yenice E, Mızrak C, Gültekin M, Atik Z, Tunca M (2015). Effects of organic and inorganic forms of manganese, zinc, copper, and chromium on bioavailability of these minerals and calcium in late-phase laying hens. *Biol Trace Elem Res* **167**, 300-307. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0313-8>

Yuan J, Roshdy AR, Guo Y, Wang Y, Guo S (2014). Effect of dietary vitamin A on reproductive performance and immune response of broiler breeders. *PloS one* **9(8)**, 105677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105677>

Zhang YN, Zhang HJ, Wu SG, Wang J, Qi GH (2017) Dietary manganese supplementation modulated mechanical and ultrastructural changes during eggshell formation in laying hens. *Poult Sci* **96**, 2699–2707. <https://doi.org/10.3382/ps/pex042>

Zhao B, Gan L, Graubard BI, Männistö S, Albanes D, Huang J (2022) Associations of dietary cholesterol, serum cholesterol, and egg consumption with overall and cause-specific mortality: systematic review and updated meta-analysis. *Circulation* **145(20)**, 1506-1520. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057642>

Zita L, Okrouhlá M, Krunt O, Kraus A, Stádník L, Čítek J, Stupka R (2022) Changes in fatty acids profile, health indices, and physical characteristics of organic eggs from laying hens at the beginning of the first and second laying cycles. *Animals* **12(1)**, 125. <https://doi.org/10.3390/ani12010125>

Zurak D, Svečnjak Z, Kiš G, Janječić Z, Bedeković D, Duvnjak M i sur. (2024) Carotenoid deposition in yolks of laying hens fed with corn diets differing in grain hardness and supplemented with rapeseed oil and emulsifier. *Poult Sci* **103(8)**, 103922. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.103922>

## Sažetak

Jadranka Kralj i Karla Obad

Jaja se smatraju cjelovitom namirnicom za ishranu ljudi i od posebnog su interesa s nutritivnog stajališta. Način hranidbe kokoši nesilica, nutritivni sastav i energetska vrijednost krmiva utječu ne samo na fizička svojstva jajeta, već na omjer žumanjka i bjelanjka te samim time na nutritivni sastav jajeta. Dodatkom različitih hibrida kukuruza (Bc572 i Os403) te vitamina A i minerala iz različitog izvora moguće je utjecati na sastav masnih kiselina jaja. Razliku u sastavu masnih kiselina hibrida kukuruza čine različiti udjeli pojedinih masnih kiselina, posebice u udjelima MUFA i PUFA. Hibrid Bc572 imao je veći udio PUFA (58,72 %) koji se statistički značajno razlikovao s udjelom PUFA u hibridu Os403 ( $p = 0,025$ ). Nadalje, u hibridu Os403 određen je veći udio MUFA (28,78 %) te je također postojala statistički značajna razlika u usporedbi s drugi hibridom ( $p = 0,021$ ). Ukupni udio SFA nije se značajno razlikovao među hibridima. Dodatak vitamina A i minerala iz različitih izvora imao je značajan utjecaj na sastav masnih kiselina u smjesama za hranidbu kokoši ( $p < 0,05$ ). Pozitivan utjecaj uočen je na smanjenje udjela SFA u odnosu na same hibride zbog čega su omjeri MUFA/SFA i PUFA/SFA postali optimalniji. Glede sastava masnih kiselina jaja, značajan utjecaj ( $p < 0,05$ ) imao je hibrid kukuruza. Hibrid Os403 doveo je do povećanja udjela PUFA te time i boljih omjera PUFA/SFA i n-6/n-3 masnih kiselina, dok je hibrid Bc572 imao utjecaj na SFA i MUFA. Primijećen je i utjecaj vitamina A ( $p < 0,05$ ) na povećanje udjela C20:4n6 masne kiseline. Utjecaj izvora minerala ( $p < 0,05$ ) uočen je kod interakcije s vitaminom A i hibridom kukuruza kod omjera n-6/n-3 masnih kiselina i udjela palmitoleinske kiseline. Nutritivna i zdravstvena kvaliteta jaja procijenjena je na temelju aterogenih (AI), trombogenih (TI) indeksa, indeksa omjera hipokolesterolemičnih i hiperkolesterolemičnih masnih kiselina (HHI), indeksa zasićenja (SI), indeksa peroksidabilnosti (PI), kao i izračun poželjnih masnih kiselina (DFA). Jaja iz hranidbenih tretmana s dodatkom hibrida Os403 pokazala su bolje vrijednosti AI, HHI i DFA te je s nutritivnog i zdravstvenog aspekta hibrid Os403 kao dodatak u krmiva za kokoši nesilice bolji u odnosu na hibrid Bc572. Interakcija različitih izvora minerala i razina dodatka vitamina A pokazala je statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u masi i površini jaja. Jaja kokoši hranjenih organskim izvorom minerala s dodatkom 5000 IJ/kg vitamina A imala su najveću masu, dok je veća površina jaja zabilježena kod kombinacije organskog i anorganskog izvora minerala s dodatkom 20000 IJ/kg vitamina A. Najdeblja ljuska jaja zabilježena je kod hibrida Os403, anorganskog izvora minerala i dodatka 10000 IJ/kg vitamina A. Na boju ljuske jaja značajno su utjecali ( $p < 0,05$ ) hibrid kukuruza i interakcija izvora minerala s vitaminom A. Veće L\* vrijednosti su zabilježene s organskim izvorom minerala i dodatkom 10000 IJ/kg vitamina A. Jaja hibrida Bc572 imala su veće a\* i b\* vrijednosti u odnosu na jaja hibrida Os403, s trendom smanjenja a\* vrijednosti uz veće dodatke vitamina A. Veći udio žumanjka zabilježen je kod

hibrida Os403, a povećanjem vitamina A primijećen je neznatan rast udjela žumanjka. Više pH vrijednosti žumanjka zabilježeno je kod hibrida Bc572 uz anorganski izvor minerala, a povećanjem vitamina A rezultiralo je višim L\* vrijednostima žumanjka. Veće vrijednosti a\* parametra nađene su kod hibrida Bc572, dok su veće b\* vrijednosti zabilježene kod Os403. Jaja kokoši hranjenih organskim mineralima imala su veće a\* i b\* vrijednosti žumanjka. Statistički značajan utjecaj nije zabilježen kod pH bjelanjka, udjela bjelanjka, udjela ljuske i indeksa oblika jaja.

Ključne riječi: hibridi kukuruza, vitamin A, minerali, jaja, hranidba kokoši nesilica, sastav masnih kiselina, nutritivni i zdravstveni indeksi, pokazatelji kvalitete jaja

## Abstract

Jadranka Kralj i Karla Obad

Eggs are considered as a complete food for human nutrition and are of particular interest from a nutritional point of view. The way laying hens are fed, the nutritional composition and the energy value of the feed affect not only the physical properties of the egg, but also the yolk/white ratio and thus the nutritional composition of the egg. By adding different maize hybrids (Bc572 and Os403) and vitamin A and minerals from different sources, it is possible to influence the fatty acid composition of the eggs. The difference in the fatty acid composition of the maize hybrids is due to the different proportions of individual fatty acids, especially in the proportions of MUFA and PUFA. Hybrid Bc572 had a higher PUFA ratio (58.72 %), which was statistically significantly different from the PUFA ratio in hybrid Os403 ( $p = 0.025$ ). In addition, a higher proportion of MUFA (28.78%) was determined in the Os403 ( $p = 0.021$ ). The total proportion of SFA did not differ significantly between the hybrids. The addition of vitamin A and minerals from different sources had a significant effect on the fatty acid composition of the hen feed mixtures ( $p < 0.05$ ). A positive impact was observed in reducing the proportion of SFA compared to the hybrids themselves, resulting in more optimal MUFA/SFA and PUFA/SFA ratios. Regarding the fatty acid composition of the eggs, the maize hybrid had a significant influence ( $p < 0.05$ ). The Os403 hybrid produced an increased PUFA content and thus better PUFA/SFA and n-6/n-3 fatty acid ratios, while the Bc572 hybrid influenced SFA and MUFA. The influence of vitamin A ( $p < 0.05$ ) on the increased C20:4n6 fatty acid ratio was also observed. The influence of mineral source ( $p < 0.05$ ) was observed in the interaction with vitamin A and maize hybrid on the n-6/n-3 fatty acid ratio and palmitoleic acid ratio. The nutritional and health quality of the eggs was assessed from the atherogenic index (AI), thrombogenic index (TI), hypocholesterolemic and hypercholesterolemic fatty acid ratio (HHI), saturation index (SI), peroxidisability index (PI), as well as the calculation of desirable fatty acids (DFA). Eggs from feed treatments with the addition of hybrid Os403 showed better AI, HHI and DFA values, and from a nutritional and health point of view, hybrid Os403 as a feed additive for laying hens is better than hybrid Bc572. The interaction of different mineral sources and levels of vitamin A supplementation showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) in egg weight and surface area. Eggs from hens fed with an organic mineral source and 5000 IU/kg of vitamin A had the highest weight, while a larger surface area was recorded with a combination of organic and inorganic mineral sources and a 20000 IU/kg vitamin A supplement. The thickest eggshell was observed in the treatment with hybrid Os403, an inorganic mineral source, and 10000 IU/kg of vitamin A. The eggshell color was significantly affected ( $p < 0.05$ ) by the corn hybrid and the interaction between mineral sources and vitamin A. Higher  $L^*$  values were recorded with an organic mineral source and 10000 IU/kg of vitamin

A. Eggs from hybrid Bc572 had higher  $a^*$  and  $b^*$  values compared to eggs from hybrid Os403, with a trend of decreasing  $a^*$  values with higher vitamin A supplements. A higher yolk ratio was observed in eggs from hens fed with hybrid Os403, and a slight increase in yolk ratio was noted with increased vitamin A concentration. Higher yolk pH values were recorded in eggs from hens fed with hybrid Bc572 and an inorganic mineral source, while increased vitamin A resulted in higher  $L^*$  values of the yolk. Higher  $a^*$  parameter values were found in hybrid Bc572, while higher  $b^*$  values were recorded in Os403. Eggs from hens fed with organic minerals had higher  $a^*$  and  $b^*$  yolk values. No statistically significant effects were observed for egg white pH, egg white ratio, eggshell ratio, and egg shape index.

Key words: corn hybrids, vitamin A, minerals, eggs, diets of laying hens, fatty acid composition, nutritional and health indices, egg quality indicators