

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Karla Čorbić

Nikola Linić

Barbara Vuk

**Inkapsuliranje ekstrakta karotenoida kalcijevim
alginatom povećava stabilnost ali smanjuje
iskorištenje karotenoida u kokoši nesilica**

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je u laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Kristine Kljak i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. HIPOTEZE, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	6
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. EKSTRAKCIJA I INKAPSULIRANJE KAROTENOIDA KALCIJEVIM ALGINATOM	7
3.2. STABILNOST KAPSULICA	9
3.4. OTPUŠTANJE KAROTENOIDA U UVJETIMA <i>IN VITRO</i> PROBAVLJIVOSTI	11
3.5. OTPUŠTANJE KAROTENOIDA U <i>IN VIVO</i> UVJETIMA U POKUSU S NESILICAMA	13
3.5.1. SMJEŠTAJ I DRŽANJE KOKOŠI NESILICA	14
3.5.2. HRANIDBENI TRETMANI I SAKUPLJANJE UZORAKA	15
3.5.3. ANALIZA SAKUPLJENIH ŽUMANJAKA	17
3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	18
4. REZULTATI	19
4.1. STABILNOST KAPSULICA EKSTRAKTA KAROTENOIDA KADIFICE	19
4.2. OTPUŠTANJE KAROTENOIDA IZ KAPSULICA U CITRATNOM PUFERU	21
4.3. OTPUŠTANJE KAROTENOIDA IZ KAPSULICA INKUBACIJOM TJEKOM INFOGEST METODE PROBAVLJIVOSTI	23
4.4. OTPUŠTANJE KAROTENOIDA U POKUSU S NESILICAMA	25
5. RASPRAVA	29
5. ZAKLJUČAK	34
6. ZAHVALA	35
7. POPIS LITERATURE	36
8. SAŽETAK	40
9. SUMMARY	41
ŽIVOTOPISI	42

1. UVOD

Nedavni porast javne svijesti o ljudskoj prehrani i zdravlju svakodnevno potiče znanstvenike i proizvođače na razvoj novih prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani, kao i na obogaćivanje i unapređivanje postojeće hrane koju potrošači često konzumiraju i vole. Jedna od najčešćih namirnica koju možemo naći u skoro svakom hrvatskom kućanstvu su jaja. *Per capita* potrošnja jaja u Republici Hrvatskoj 2019. iznosila je 176 komada odnosno 10,56 kg, što je za 23,1% više u usporedbi s 2013. kada je *per capita* potrošnja iznosila 143 komada odnosno 8,6 kg (Kralik i sur. 2021.). Osim toga, pretpostavlja se da će potrošači utjecati na proizvodnju kvalitetnih jaja kao zdravih i funkcionalnih proizvoda dodane nutritivne vrijednosti, kao i na njihovu dostupnost na domaćem tržištu uz brigu o dobrobiti prema peradi i zaštiti okoliša (Kralik i sur. 2021.).

Jaja su od posebnog interesa s nutricionističke točke gledišta budući da sadržavaju esencijalne lipide, proteine, vitamine, minerale i elemente u tragovima, dok istovremeno nude umjeren izvor kalorija (oko 140 kcal/100 g), veliki kulinarski potencijal i nizak ekonomski trošak (Réhault-Godbert i sur. 2019.). Često se mogu čuti rasprave o konzumaciji jaja i njihovom povezanosti s kardiovaskularnim bolestima i razinom kolesterola u krvi, no nedavna otkrića nisu konzistentna u pogledu moguće povezanosti između konzumacije jaja i smrtnosti i morbiditeta uslijed kardiovaskularnih bolesti (Carter i sur. 2023.) Jaja su odličan primjer hrane koju je moguće nutritivno obogatiti, pa tako na tržištu već možemo naći jaja obogaćena omega masnim kiselinama.

Boja je jedan od važnih čimbenika koji izravno utječe na interes potrošača, odabir hrane i prehrambene navike (Gençdağ i sur. 2022.). Znajući utjecaj boje na izbor potrošača, proizvođači koriste sintetske pigmente u proizvodnji kako bi svoje proizvode učinili primamljivijim i oku ugodnim. Dobar primjer ove prakse je u peradarskoj proizvodnji, odnosno proizvodnji konzumnih jaja kokoši nesilica. Boja žumanjka je važno svojstvo kvalitete jaja koje izravno utječe na cijenu jaja, a preferirana boja žumanjka općenito je u rasponu od zlatno žute do narančaste. Boja žumanjka ovisi o izvoru i razini karotenoida u hrani kokoši nesilica (Wen i sur. 2022.).

Ovisno o geografskom položaju, kulturi i tradiciji potrošači preferiraju određenu boju žumanjka. Primjerice, potrošači u Njemačkoj, Nizozemskoj, Španjolskoj i Belgiji preferiraju žumanjke s vrijednostima 13-14 prema YCF skali (engl. Yolk Color Fan), dok su žumanjci s

vrijednostima 11-12 favorizirani u Francuskoj, južnoj Engleskoj i Finskoj. S druge strane, američki potrošači preferiraju boju žumanjka od 7 do 10 prema YCF skali, dok potrošači u Irskoj, sjevernoj Engleskoj i Švedskoj preferiraju žumanjke s vrijednostima 8-9 (Spasevski i sur. 2017.) YCF skala prikazana je na slici 1. Osim boje žumanjka u peradarskoj proizvodnji, boja je također bitna kod odabira mesa odnosno masti peradi. U konačnici, žuća odnosno narančastija boja žumanjka i masti peradi tijekom kupovine potrošačima pruža dojam domaćih proizvoda koji su dobiveni od životinja držanih na ispustima, odnosno uzgojenih alternativnim načinima.



Slika 1. Yolk Color Fan skala

Izvor: <https://eggtester.com/dsm-yolk-color-fan/>- pristup 9.08.2024.

Važno je naglasiti zašto dolazi do obojenja žumanjka odnosno izvor i svojstva karotenoidnih spojeva koji se koriste u tu svrhu. Kokoši nesilice ne mogu sintetizirati karotenoide te stoga njihova prisutnost u žumanjku ovisi o sadržaju karotenoida u hrani. Karotenoidi su prirodni pigmenti koji se nalaze u biljkama, njihovom lišću i cvjetovima, gdje osim pigmentacije skupljaju svjetlosnu energiju i prenose ju na klorofile (Maoka i sur. 2019.). U prirodi postoji više od 700 karotenoida, koji se općenito dijele u dvije skupine: karotene i ksantofile ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi (Dansou i sur. 2023.).

Karoteni su nepolarni, visoko konjugirani ugljikovodični lanci (C₄₀), mogu biti ciklički, kao što su α - i β -karoten ili linearni poput likopena. Ksantofili su oksigenirani derivati karotena, koji su polarniji od njih. Ksantofili se razlikuju prema funkcionalnim skupinama unutar njihove kemijske strukture, pa tako razlikujemo zeaksantin, β -kriptoksantin i lutein (Dansou i sur. 2023.).

Boja karotenoida proizlazi iz njihove kemijske strukture, varira između žute i narančaste te ovisi o broju konjugiranih dvostrukih veza i prisutnosti različitih funkcionalnih skupina u strukturi (Park i sur. 2017.).

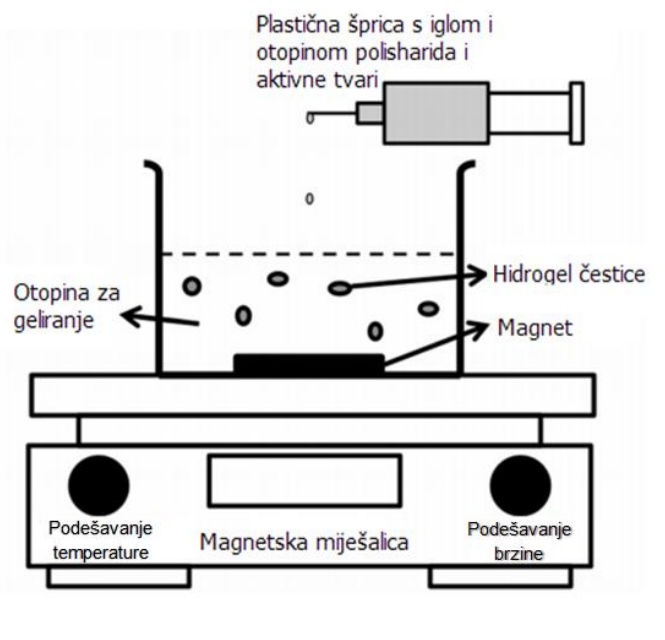
Osim vidljive pigmentacijske uloge, karotenoidi imaju značajnu funkciju kao prekursori vitamina A (provitaminska aktivnost). U toj ulozi posebno su važni α - i β -karoten, pri čemu je β -karoten najpoznatiji primjer provitaminske aktivnosti (Marounek i sur. 2018.). Karotenoidi pokazuju brojne druge prednosti za ljudsko zdravlje; α -karoten smanjuje rizik od pojave glaukoma, raka želuca, jetre i pluća te kardiovaskularnih i respiratornih bolesti; β -karoten smanjuje BMI indeks, sadržaj potkožnog masnog tkiva, djeluje kao moćan antioksidans (Juric i sur. 2020.). Zaštitno djelovanje kod bolesti oka prvenstveno ostvaruju lutein i zeaksantin, koji su jedini karotenoidi prisutni u mrežnici i leći oka (Kavtarashvili i sur 2019.).

Zbog navedenih razloga važno je uključiti karotenoide u hranu kokoši nesilica, pri čemu proizvođači trebaju paziti na izvor karotenoida, odnosno jesu li oni prirodni ili sintetski. Zbog niske cijene, često se koriste sintetski karotenoidi, poput kantaksantina, no količina ovih karotenoida u hrani za nesilice je ograničena zbog potencijalno negativnog učinka na ljudsko zdravlje (Skřivanová i sur. 2017.). Prirodni izvori karotenoida poput kadifice (*Tagetes erecta* L.), određenih vrsta algi (*Chlorella*), nevena (*Calendula officinalis*), crvene paprike (*Capsicum annuum*) predstavljaju obećavajuće alternative sintetskim karotenoidima. Ekstrakt kadifice komercijalno je dostupan širom svijeta te se koristi kao aditiv u hrani za nesilice radi obojenja žumanjka jaja, kože i masnog tkiva. Osim u hranidbi peradi, ekstrakt kadifice koristi se i kao prehrambena boja u proizvodnji senfa, jestivih ulja, salatnih preljeva, sladoleda, jogurta i drugih mliječnih proizvoda (Tokas i sur. 2018.)

Unatoč brojnim prednostima korištenja prirodnih karotenoida, njihova primjena u prehrambenoj industriji ograničena je zbog slabe topivosti u vodi, niske biodostupnosti, kemijske nestabilnosti i visoke osjetljivosti na oksidaciju u različitim okolišnim uvjetima poput topline, svjetlosti, kisika, kiselina i metalnih iona (González-Peña i sur. 2023.). Kako bi se prevladala ova ograničenja, koriste se tehnike inkapsulacije za poboljšanje stabilnosti, topljivosti i biodostupnosti karotenoida. Inkapsulacija se u prehrambenoj industriji koristi više od 60 godina kao proces zaštite osjetljivih tvari poput sastojaka hrane, enzima, stanica ili drugih funkcionalnih spojeva malim kapsulama s ciljem zaštite od štetnih vanjskih uvjeta, produljenja njihovog roka trajanja ili

maskiranja atributa pojedinih sastojaka kao što je npr. nepoželjan okus (González-Peña i sur. 2023.)

Postoji više tehnika inkapsulacije uključujući sušenje raspršivanjem, sušenje smrzavanjem, hlađenje raspršivanjem i ionsko geliranje. Sušenje raspršivanjem je široko korištena tehnika inkapsulacije koja uključuje stvaranje finih čestica propuštanjem suspenzije kroz raspršivač u kojem struji komprimirani zrak visoke temperature. Protok vrućeg zraka dehidrira čestice, pretvarajući ih u prah u kojem se nalazi željena inkapsulirana tvar (González-Peña i sur. 2023.). Sušenje smrzavanjem je tehnika inkapsuliranja koja uključuje dehidraciju smrznutog materijala (-80 do -40 °C) pod vakuumskom sublimacijom pri niskom tlaku, a široko se koristi za toplinski labilne bioaktivne spojeve (González-Peña i sur. 2023.). Ionsko geliranje je proces inkapsulacije koji počinje od vodene polimerne otopine u kojoj ioni niske molekulske mase stupaju u interakciju sa suprotno nabijenim polielektrolitima tvoreći netopljivi gel. Aktivni materijal se otapa, dispergira ili emulgira u polimernoj otopini, a kapljice koje dolaze u dodir s ionskom otopinom potiču stvaranje sfernih struktura gela koje sadrže aktivni materijal raspršen kroz polimernu matricu (da Silva i sur. 2022.). Inkapsulacija tehnikom ionskog geliranja prikazana je na slici 2.



Slika 2. Prikaz tehnike inkapsulacije ionskim geliranjem (Patel i sur. 2016.)

Inkapsulacija karotenoida ima veliki potencijal u primjeni u hranidbi peradi, a različita istraživanja bavila su se njihovom integracijom u hranu kokoši nesilica kao izvora pigmenata za boju žumanjka. U jednom od tih istraživanja ispitan je učinak dodatka kapsulica praha nusproizvoda rajčice u udjelu od 5% u potpune krmne smjese za kokoši nesilice (Xue i sur. 2013.). Ekstrakt karotenoida iz nusproizvoda rajčice inkapsuliran je s pomoću želatine i arapske gume, što predstavlja značajan napredak u industriji zdrave hrane. Dodatak od 10 mg/kg karotenoida nusproizvoda rajčice u hranu nesilica poboljšava pigmentaciju žumanjka i povećava sadržaj likopena. Također, u drugom istraživanju (Wen i sur. 2021.), dokazano je kako inkapsulacija povećava topivost i apsorpciju luteina od 15 do 50% u usporedbi s neinkapsuliranim luteinom kao i stabilnost pri izloženosti toplini, svjetlosti i kisiku. Autori su pokazali da dodatak kapsulica luteina u hranu poboljšavaju pigmentaciju žumanjka i apsorpciju luteina kod kokoši nesilica u usporedbi s neinkapsuliranim luteinom.

2. HIPOTEZE, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Temeljem osjetljivosti karotenoida na okolišne uvjete poput sunčevog svjetla i temperature, hipoteze ovog istraživanja su:

1. Inkapsuliranje će zaštititi karotenoide od degradacije uzrokovane okolišnim uvjetima i na taj način povećati njihovu stabilnost.
2. Inkapsuliranje neće negativno utjecati na otpuštanje i iskorištenje karotenoida kod kokoši nesilica.

Na temelju postavljene hipoteze, opći cilj rada je bio usporediti stabilnost kapsulica ekstrakta karotenoida cvijeta kadifice (*Tagetes erecta* L.) pri različitim uvjetima skladištenja (temperatura i prisustvo svjetlosti) te usporediti sadržaj otpuštanja karotenoida u različitim medijima (*in vitro* i *in vivo*).

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- pripremiti kapsulice ekstrakta karotenoida cvijeta kadifice (*Tagetes erecta* L.),
- odrediti stabilnost kapsulica pri različitim temperaturama i prisutnosti svjetla/tame na temelju ukupnog sadržaja karotenoida,
- odrediti otpuštanje karotenoida iz kapsulica u citratnom puferu,
- odrediti otpuštanje karotenoida iz kapsulica *in vitro* metodom probavljivosti,
- odrediti deponiranje karotenoida iz kapsulica u žumanjke *in vivo* pokusom s nesilicama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. EKSTRAKCIJA I INKAPSULIRANJE KAROTENOIDA KALCIJEVIM ALGINATOM

Prah cvijeta kadifice (*Tagetes erecta* L.) je dobiven od tvrtke TRAKO-AGROLUDBREG d.o.o. (V. Bukovec, Hrvatska). Ekstrakcija karotenoida provedena je acetonom u Soxhlet ekstraktoru (SoxTherm 416, Gerhardt, Njemačka) (slika 3). Suhi ekstrakt je zatim otopljen u suncokretovom ulju, pri čemu je ekstrakt 20 g praha cvijeta kadifice (jedna serija ekstrakcije) otopljen u 70 mL ulja. Konačan sadržaj ukupnih karotenoida u ulju određen spektrofotometrijski iznosio je 1,40 mg/mL.



Slika 3. Osušeni ekstrakt karotenoida cvijeta kadifice ekstrahiran Soxhlet ekstraktorom

Mikročestice ispunjene karotenoidima pripravljene su metodom ionskog geliranja na sobnoj temperaturi, pri čemu je 70 mL uljnog ekstrakta (uljna komponenta) dodano u 150 ml 2%-tne otopine natrijevog alginata (vodena komponenta). Zbog nemiješanja uljne i vodene komponente, emulzija je pripravljena pomoću laboratorijskog homogenizatora (Solverson L5M-A, SAD) pri

maksimalnoj brzini od 10000 rpm tijekom 10 minuta kako bi se izbjeglo zagrijavanje emulzije (Juric i sur. 2021.). Dobivena emulzija je zatim kap po kap dodavana pomoću lijevka za dokapavanje u 200 mL 2%-tne otopine kalcijevog klorida uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici (IKA topolino, SAD) tijekom 30 minuta (slika 4). Na taj način izvršeno je ionsko geliranje i formiranje kalcijev alginat mikročestica – kapsulica ispunjenih ekstraktima karotenoida (Juric i sur., 2021). Nakon inkapsulacije, kapsulice su filtrirane, isprane destiliranom vodom i osušene na zraku u zamračenom prostoru tijekom 24 sata (slika 5).



Slika 4. Dokapavanje emulzije uljnog ekstrakta karotenoida i 2%-tne otopine natrijevog alginata u 2 %-tnu otopinu kalcijevog klorida



Slika 5. Sušenje formiranih kapsulica karotenoida ekstrakta kadifice

Karotenoidni profil u nastalim kapsulicama (slika 6) analiziran je HPLC metodom, pri čemu je utvrđen sljedeći sadržaj karotenoida: 553,2 $\mu\text{g/g}$ luteina, 105,1 $\mu\text{g/g}$ zeaksantina, 3,4 $\mu\text{g/g}$ α -kriptoksantina, 2,8 $\mu\text{g/g}$ β -kriptoksantina i 2,9 $\mu\text{g/g}$ β -karotena.



Slika 6. Osušene kapsulice karotenoida ekstrakta kadifice

3.2. STABILNOST KAPSULICA

Stabilnost pripremljenih kapsulica karotenoida ekstrakta kadifice ispitana je postupkom opisanom u radu Xue i sur. (2013.). Uvjeti u kojima su kapsulice skladištene tijekom postupka su $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, sobna temperatura na svjetlu, sobna temperatura u tami, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ na svjetlu i $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ u tami. Za svaki uvjet skladištenja, otprilike 30 g kapsulica spremljeno je u plastične čašice u triplikatu te je uzorkovanje provedeno 0., 4., 10., 15., 21., 24. i 30. dan skladištenja.

Prilikom uzorkovanja, iz svake čašice je izvagano 0,4 g kapsulica, a kako bi se odredio sadržaj karotenoida, kapsulice su razorene inkubacijom s 50 mL citratnog pufera ($0,2\text{ mol/L NaHCO}_3$ i $0,06\text{ mol/L Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{pH} = 8,28$) (Lemic i sur. 2021.) pri sobnoj temperaturi uz stalno miješanje na tresilici tijekom 2 sata. Nakon završetka inkubacije, alikvot razorenih kapsulica u citratnom puferu od 1 mL je odpipetiran u triplikatu u epruvetu za ekstrakciju. U svaku epruvetu je dodan 1 mL etanola te je ekstrakcija karotenoida provedena heksanom (Pickworth i sur. 2013.). Nakon dodatka 2 mL heksana u svaku epruvetu, smjesa je miješana vorteksiranjem i centrifugirana 5 min pri 4000 rpm (Centric 322A, Tehnica, Slovenija). Gornji heksanski sloj je kapalicom odvojen u odmjernu tikvicu od 10 mL, a postupak je ponovljen do obezbojenja heksanskog sloja (dva puta).

Sadržaj ukupnih karotenoida u ekstraktu određen je spektrofotometrijski (Helios γ , Thermo Electron Corporation, Velika Britanija) pri valnoj duljini od 450 nm. Za kvantifikaciju je korišten

apsorpcijski koeficijent β -karotena u heksanu ($A_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2592$) (Rodriguez-Amaya 2001.), a rezultat je izražen kao ekvivalent β -karotena u uzorku kapsulica, $\mu\text{g/g}$.

3.3. *IN VITRO* OTPUŠTANJE KAROTENOIDA U CITRATNOM PUFERU

Postupak otpuštanja karotenoida kapsulica u *in vitro* uvjetima u citratnom puferu proveden je prema postupku opisanom u radu Xue i sur. (2013). Kapsulice (0,4 g) izvagane su u Erlenmayerovu tikvicu u četverplikatu te je dodano 50 mL citratnog pufera u svaku tikvicu. Tikvice su inkubirane pri 37 °C uz stalnu trešnju (50 rpm) u kupelji (SW 22, Julabo, SAD) tijekom 2 sata. Smjesa je uzorkovana nakon 5 (2 mL), 10 (2 mL), 30 (1 mL), 60 (1 mL) i 120 (1 mL) minuta.

Prema metodi opisanoj u radu Montoya-Arroyo i sur. (2022.), karotenoidi iz alikvota su ekstrahirani tako da je alikvot pomiješan s 2 mL 1%-tne otopine askorbinske kiseline u etanolu, 900 μL destilirane vode i 1200 μL zasićene otopine natrij hidroksida. Uzorci su saponificirani 30 min na 70 °C uz stalno miješanje. Nakon hlađenja na ledu, u svaku epruvetu dodano je 50 μL butiliranog hidroksitoluena (BHT) u etanolu. Smjese su zatim neutralizirane dodavanjem 1200 μL ledene octene kiseline. Odmah nakon neutralizacije, u svaku je epruvetu dodano 2 mL heksana, nakon čega je sadržaj epruvete vorteksiran i centrifugiran 5 min pri 4000 rpm (Centric 322A, Tehnica). Nakon centrifugiranja, gornji heksanski sloj je odvojen u staklenu epruvetu za uparavanje. Ekstrakcija heksanom ponovljena je do obezbojenja heksanskog sloja (tri puta). U svaku epruvetu sa sakupljenim ekstraktima dodano je 100 μL internog standarda trans- β -apo-8'-karotenala (Sigma Aldrich, Njemačka), nakon čega su heksanski ekstrakti upareni pomoću rotacijskog vakuumskeg uparivača (RVC 2-25CD Plus, Martin Christ, Njemačka). Suhi ostatak otopljen je u 200 μL otopine acetonitril:metanol:metilen klorid (45:20:35, v/v/v).

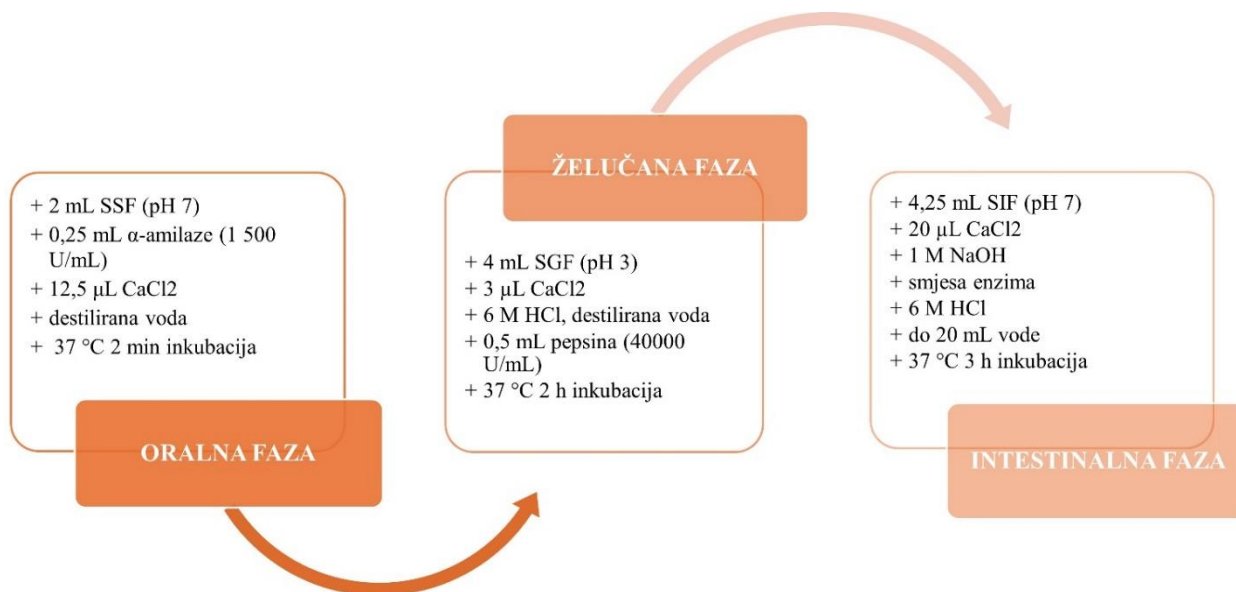
Sadržaj pojedinih karotenoida u ekstraktima kvantificiran je kromatografskom metodom obrnutih faza opisanom u radu Kurilich i Juvik (1999.) na HPLC sustavu SpectraSystem (Thermo Separation Products, Inc., SAD). HPLC sustav sastojao se od kvaterne gradijent pumpe (P4000), sustava za otplinjavanje (SCM1000), automatskog sustava za injektiranje uzorka (AS3000), grijača kolone te UV/Vis (UV2000) detektora. Podaci su sakupljeni i obrađeni ChromQuest 5.0 softwareom (Thermo Fisher Scientific, SAD). Spojevi su razdvojeni na dvije serijski povezane

C18 kolone obrnute faze: Vydac 201TP54 (5 μm , 4,6 \times 150 mm; Hichrom, UK) i Zorbax RX-C18 (5 μm , 4,6 \times 150 mm; Agilent Technologies, SAD). Kolone su bile zaštićene pomoću Supelguard Discovery C18 predkolone (5 μm , 4 \times 20 mm; Supelco, SAD). Pokretna faza sastojala se od smjese acetinitril:metanol:diklormetan (75:25:5, v/v/v) koja sadrži 0,1% BHT i 0,05% trietilamina. Protok pokretne faze bio je namješten na 1,8 mL/min pri sobnoj temperaturi. Volumen injektiranja otopina uzoraka bio je 30 μL , a karotenoidi su detektirani pri 450 nm.

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

3.4. OTPUŠTANJE KAROTENOIDA U UVJETIMA *IN VITRO* PROBAVLJIVOSTI

INFOGEST metoda je standardizirani *in vitro* protokol određivanja probavljivosti (Minekus i sur. 2014.) koji je uz određene modifikacije prilagođen za simulaciju probavljivosti karotenoida kod kokoši nesilica (Zurak i sur. 2021.). Simulacija probave izvodi se pomoću oralne (SSF, pH 7), želučane (SGF, pH 3) i intestinalne (SIF, pH 7) otopine (Brodkorb i sur. 2019.). Prije samog postupka, sve navedene otopine su temperirane i pripremljene su otopine žuči i enzima, a sam postupak proveden je prema shemi prikazanoj slikom 7. Kako bi se pratilo otpuštanje u određenim vremenskim intervalima, za svaku vremensku točku analiza je provedena u zasebnoj Falcon epruveti u četveroplikatu.



Slika 7. Shematski prikaz INFOGEST metode (Minekus i sur. 2014.)

U metodi su korišteni enzimi: α -amilaza (A3716 označene aktivnosti 10 U/mg; eksperimentalno utvrđena 10 U/mg), pepsin (P7000, označena aktivnost 599 U/mg, eksperimentalno utvrđena 574 U/mg), pankreatin (P7545, označena aktivnost 8 \times USP, eksperimentalno utvrđena aktivnost tripsina 9 U/mg), amiloglukozidaza (A7095, označena aktivnost \geq 260 U/mg) i žučne soli (B8631). Sadržaj žučnih soli koji treba biti dodan reakcijskoj smjesi enzima i uzorka je izračunat korištenjem podatka da ekstrakt svinjske žuči sadrži 50% žučnih soli s prosječnom molekulskom masom od 442 g/mol (Vinarov i sur. 2012.).

Prije početka samog postupka, kapsulice su usitnjene u tarioniku kako bi se simulirao rad mišićnog želuca peradi (Zurak i sur. 2021.). Zatim je 0,4 g usitjenih kapsulica izvagano u Falcon epruvete od 50 mL te su pomiješane s 1,25 mL destilirane vode, 2 mL SSF otopine, 0,25 mL otopine α -amilaze (1500 U/mL u ultračistoj vodi) te 12,5 μ L 0,3 mol/L otopine CaCl₂ kako bi se simulirala oralna faza. Konačni volumen uzorka nadopunjen je destiliranom vodom do 5 mL te je u svaku epruvetu dodano 8 staklenih kuglica. Epruvete s uzorcima su vorteksirane, a zatim inkubirane i miješane na 37 °C tijekom dvije minute u vodenoj kupelji (SW 22, Julabo).

Nakon oralne faze započela je simulacija želučane faze pri čemu je otpuštanje karotenoida praćeno nakon 0,5, 1, 1,5 i 2 sata. U epruvete je dodano 4 mL SGF otopine, 3 μ L 0,3 mol/L otopine

CaCl₂ i 0,5 mL pepsin otopine (40000 U/mL u ultračistoj vodi). pH 3 smjesa postignut je dodavanjem 6 mol/L otopine HCl, a destilirana voda je dodana do konačnog volumena od 10 mL. Epruvete su vorteksirane i inkubirane 2 sata na 37 °C u vodenoj kupelji. Alikvoti od 5 mL uzeti epruvetama predviđenim za uzorkovanje tijekom želučane faze. Alikvoti su ohlađeni na ledu 10 min radi taloženja i obavijeni aluminijskom folijom kako bi se spriječila degradacija karotenoida uslijed djelovanja povišene temperature i izloženosti svjetlosti. Prije završne intestinalne faze, otopine žuči i pankreatina pripremljene su otapanjem u SIF otopini (pH 7).

U epruvetama predviđenim za uzorkovanje u intestinalnoj fazi (2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 i 5 sati inkubacije), nakon 2 h inkubacije dodano je 4,25 mL SIF otopine, 20 µL 0,3 mol/L otopine CaCl₂, 1,25 mL otopine soli žuči i 2,5 mL otopine pankreatina (800 U/mL) i amilglukozidaze (13 U/mL). pH vrijednost je podešena na 7 dodavanjem 1 mol/L otopine NaOH, a konačni volumen od 20 mL postignut je dodatkom destilirane vode. Nakon vorteksiranja, epruvete su inkubirane 3 sata na 37 °C u vodenoj kupelji, a uzorkovanje alikvota za svaku vremensku točku tijekom intestinalne faze provedeno je prema postupku opisanom za uzorkovanje tijekom želučane faze.

Za ekstrakciju karotenoida iz uzorkovanih alikvota digesta dodano je 2 mL heksana u svaki alikvot, nakon čega su smjese vorteksirane i centrifugirane 3 minute pri 4000 rpm (Centric 322A, Tehnica). Nakon centrifugiranja, gornji heksanski sloj je odvojen u epruvetu za uparavanje, a postupak ekstrakcije ponovljen je do obezbojenja heksanskog sloja (četiri puta). U svaki ekstrakt dodano je 100 µL internog standarda trans-β-apo-8'-karotenala te je uparen na rotacijskom vakuuromskom uparivaču (RVC 2-25CD Plus, Martin Christ). Suhi ostatak nakon isparavanja otopljen je u 200 µL otopine acetonitril:metanol:metilen klorid (45:20:35, v/v/v), a sadržaj karotenoida određen je kromatografskom metodom obrnutih faza opisanom u poglavlju 3.3.

3.5. OTPUŠTANJE KAROTENOIDA U *IN VIVO* UVJETIMA U POKUSU S NESILICAMA

Otpuštanje karotenoida iz kapsulica u *in vivo* uvjetima ispitano je preko određivanja sadržaja karotenoida u žumanjcima jaja u pokusu s nesilicama koje su hranjene potpunim krmnim smjesama s dodatkom 0,5 i 1% kapsulica. Pri tome su promjene sadržaja karotenoida u

žumanjcima nesilica hranjenih s dodatkom kapsulica uspoređeni sa žumanjcima kokoši nesilica hranjenih standardnom smjesom s dodatkom 8 mg/kg kantaksantina.

3.5.1. SMJEŠTAJ I DRŽANJE KOKOŠI NESILICA

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

Pokus je proveden na 45 kokoši nesilica pasmine Lohmann Brown u pokusnom objektu Zavoda za hranidbu životinja Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nesilice su dopremljene u objekt 30. kolovoza 2023. godine, kada su imale 18 tjedana, a preuzete su s peradarske farme Nujić Marko d.o.o. iz Ribnice. Istraživanje je započelo 4. ožujka 2024. godine, u vrijeme kada su nesilice navršile 44 tjedna starosti, a trajalo je do 7. travnja 2024. godine.

Postupkom randomizacije, ukupno 45 kokoši nesilica pasmine Lohmann Brown razvrstano je 15 obogaćenih kaveza s po tri jedinke u svakom kavezu. Kavezi su bili postavljeni unutar slobodnostojećeg baterijskog sustava s ukupno 24 kaveza. Svaki kavez je imao visinu od 60 cm i površinu od 60 × 64 cm, pružajući 1269 cm² prostora po nesilici. U kavezima su se nalazile dvije nipl pojilice, pocinčane žljebaste hranilice smještene s vanjske strane prednjeg dijela kaveza (12 cm po nesilici), kao i drvene prečke (15 cm po nesilici). Ispod svakog kaveza bila je postavljena limena posuda za sakupljanje izmeta, a paralelno ispod hranilica nalazio se žičani prostor za prikupljanje jaja. Tijekom istraživanja, temperatura unutar pokusnog objekta bila je održavana na 18 ± 2 °C, dok se svjetlosni režim sačinjavao od 16 sati svjetla i 8 sati mraka. Objekt je bio opremljen potpuno automatiziranim sustavom za kontrolu temperature, a ventilacija se provodila prema potrebi.

3.5.2. HRANIDBENI TRETMANI I SAKUPLJANJE UZORAKA

Prije početka pokusa, proveden je pripremni period u trajanju od dva tjedna, od 19. veljače do 3. ožujka 2024. godine. Svrha ovog razdoblja bila je pripremiti organizam nesilica za istraživanje, odnosno očistiti njihov probavni trakt od rezervi karotenoida iz hrane kojom su hranjene prije pokusa. Tijekom tog razdoblja, nesilice su hranjene standardnom potpunom krmnom smjesom za kokoši nesilice bez dodatka pigmenta, a smjese su bile sastavljene tako da zadovoljavaju potrebe komercijalnih Lohmann Brown nesilica u početnoj fazi proizvodnje jaja prema National Research Council (NRC. 1994.) i uputama Lohmann Breeders GmbH (2022.). Potpuna krmna smjesa za nesilice je pripremljena u dovoljnim količinama za cijelo trajanje pokusa kako ne bi bilo razlika u rezultatima zbog promjena sastojka smjese. Pripremljena je u tvornici stočne hrane Kušić promet d.o.o. iz Sv. Ivana Zeline, a sastav smjese i vitaminsko-mineralnog premiksa prikazani su tablicama 1 i 2.

Pokusne smjese hranidbenih tretmana pripremljene su dodatkom pigmentata u standardnu potpunu krmnu smjesu za kokoši nesilice. U smjesu pozitivne kontrole (T0) dodan je pigment Carophyll red (DSM-Firmenich AG, Švicarska) tako da smjesa sadrži 8 mg/kg kantaksantina dok je u smjese tretmana T1 i T2 dodan različit udio inkapsuliranih karotenoida. U T1 smjesu ručno je umiješano 0,5% kapsulica, dok je u T2 smjesu umiješano 1%. Pokus je započeo 4. ožujka 2024., a pet kaveza je postupkom randomizacije dodijeljeno svakom od tri tretmana (T0, T1 i T2) (slika 8). Tijekom istraživanja, nesilice su imale neograničen pristup hrani i vodi. Kako bi se smanjilo rasipanje, izračunato je da je svakoj nesilici potrebno 125 g hrane dnevno. Zbog toga, hranilice su tri puta tjedno (utorkom, četvrtkom, subotom, a zatim ponedjeljkom) punjene sa 700 g smjese, dok se ostale dane dodavalo 300 g po potrebi.

Počevši od početnog dana pokusnog razdoblja, sva jaja su se sakupljala u kraćim vremenskim intervalima kako bi se pratio rast i stabilizacija sadržaja karotenoida. Pri tome su uzorkovana 0., 2., 3., 5., 7., 9., 10., 12., 14., 16., 18., 20., 21. i 22. dan od početka hranjenja hranidbenim tretmanima u 9 h ujutro, a žumanjci su korišteni za određivanje karotenoidnog profila HPLC metodom.

Tablica 1. Sastav potpune krmne smjese za kokoši nesilice

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

Tablica 2. Vitamini i minerali premiksa dodani u 1 kg potpune krmne smjese za kokoši nesilice

Vitamini	Količina	Mikroelementi-Biopleksi iz TNT Layer Pack	
			mg
Vitamin A	10000 IJ	Biopleks Zn	30
Vitamin D	2500 IJ	Biopleks Mn	30
Vitamin E	20 mg	Biopleks Cu	5
Vitamin K	3 mg	Biopleks Fe	5
Vitamin B1	1 mg	SelPleks	0,2
Vitamin B2	4 mg	Jod	1
Vitamin B6	3 mg		
Vitamin B12	25 mg		
Pantotenska kiselina	10 mg		
Nikotin amid	30 mg		
Folna kiselina	0.5 mg		
Biotin	50 mg		
Kolin	400 mg		

Baterija 3

61 – T1	62 – T2	63 – T0	64 – T1
65 – T2	66 – T0	67 – T1	68 – T2

Baterija 4

69 – T0	70 – T2	71 – T1	72 – T0
73 – T1	74 – T2	75 – T0	76 –

Slika 8. Raspodjela kaveza na hranidbene tretmane postupkom randomizacije (T0 – pozitivna kontrola, T1 - dodatak 0,5% kapsulica, T2 – dodatak 1% kapsulica)

3.5.3. ANALIZA SAKUPLJENIH ŽUMANJAKA

Sakupljena jaja su raspoređena po kavezima te su sva jaja sakupljena istog dana iz istog kaveza spojena kako bi predstavljali jedan uzorak. Nakon razbijanja jaja, žumanjak je odvojen od bjelanjka. Žumanjci su dodatno odvojeni od bjelanjka valjanjem na papirnatom ubrusu, nakon čega su bili spojeni u plastične čaše označene prema brojevima kaveza. Žumanjci istog kaveza istog dana su spojeni u istoj čaši i pomiješani.

Ekstrakcija karotenoida iz uzoraka žumanjaka provedena je prema postupku opisanom u radu Surai i sur. (2001.). 0,4 g pomiješanih žumanjaka je izvagano u epruvetu za ekstrakciju te je u svaku epruvetu dodano 2 mL 5%-tne otopine NaCl u etanolu (1:1). Smjesa je homogenizirana (T 10 ULTRA-TURRAX, IKA, Njemačka) uz dodatak 3 mL heksana. Nakon vorteksiranja smjese, epruvete su centrifugirane (Centric 322A, Tehnica) 5 min pri 4000 rpm. Gornji heksanski sloj je odvojen u epruvete za uparavanje, a postupak ekstrakcije je ponovljen do obezbojenja heksanskog sloja (dva puta). U ekstrakt svakog uzorka dodano je 100 µL internog standarda trans-β-apo-8'-karotenala, te su sakupljeni heksanski ekstrakti upareni na vakuum uparivaču (RVC 2-25CD plus, Martin Christ). Suhi ostatak otopljen u 300 µL otopine acetonitril:metanol:metilen klorid

(45:20:35, v/v/v), a sadržaj karotenoida određen je kromatografskom metodom obrnutih faza opisanom u poglavlju 3.3.

3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada dobivenih podataka provedena je statističkim paketom SAS (verzija 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Određivanje stabilnosti kapsulica ekstrakata kadifice provedeno je prema potpuno nasumičnom rasporedu s tri repeticije, a dobiveni rezultati su obrađeni analizom varijance koristeći MIXED proceduru s uvjetima skladištenja i vremenom skladištenja kao fiksnim utjecajima. Pokus s nesilicama proveden je prema potpuno nasumičnom rasporedu s tri hranidbena tretmana u pet repeticija. Dobiveni rezultati su obrađeni analizom varijance koristeći MIXED proceduru s hranidbenim tretmanom i danom pokusa kao fiksnim utjecajima. Razlike su smatrane statistički značajnima ako je $P \leq 0,05$. Ostali dobiveni rezultati obrađeni su u Microsoft Excel-u.

4. REZULTATI

4.1. STABILNOST KAPSULICA EKSTRAKTA KAROTENOIDA KADIFICE

Prilikom određivanja stabilnosti kapsulica izabrani su sljedeći uvjeti skladištenja: -20 °C kao idealna temperatura skladištenja, +4 °C kao temperatura skladištenja koja je u praksi poželjna za čuvanje različitih izvora karotenoida (Gunjević i sur. 2024.), sobna temperatura kao uobičajena temperatura skladištenja s i bez prisutnosti svjetla, te 40 °C kao temperatura koja može dovesti do pojačane degradacije karotenoida s i bez prisutnosti svjetla.

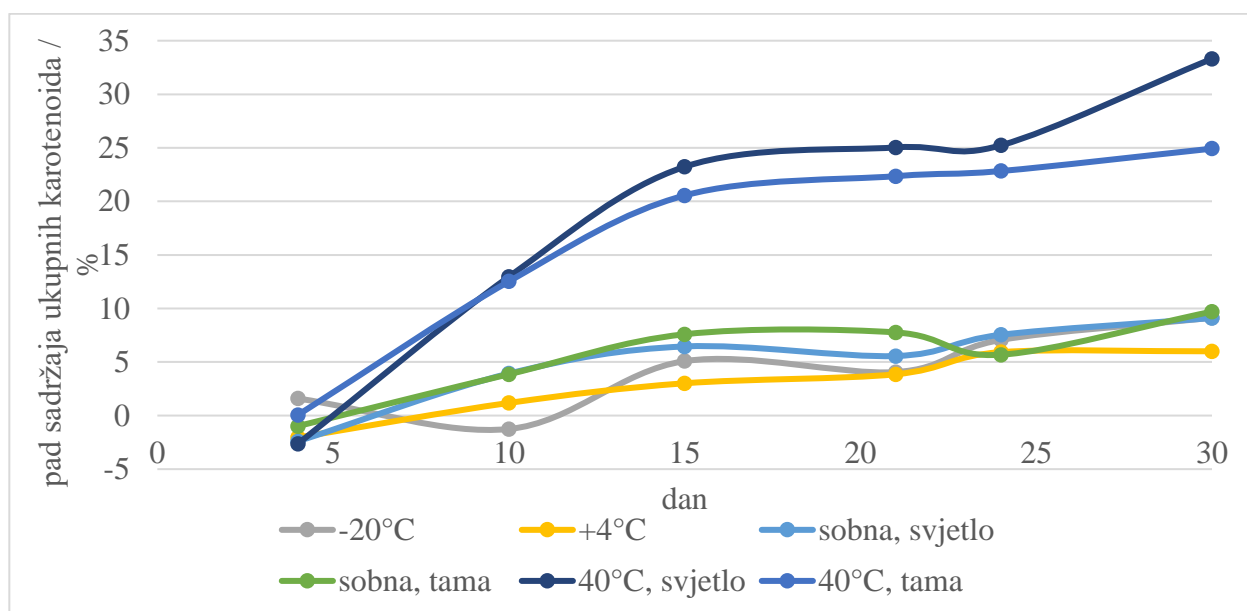
Rezultati određivanja stabilnosti pripremljenih kapsulica ekstrakta karotenoida kadifice prikazani su u tablici 4.1.1. Utvrđen je značajan utjecaj uvjeta skladištenja ($P < 0,001$), vremena skladištenja ($P < 0,001$) kao i njihove interakcije ($P < 0,001$).

Tablica 3. Promjene sadržaja ukupnih karotenoida u pripremljenim kapsulicama ekstrakta karotenoida kadifice skladištenim pri različitim uvjetima tijekom 30 dana

Uvjeti skladištenja	Vrijeme skladištenja / dan						
	0	4	10	15	21	24	30
-20 °C	1,451ab	1,427abc	1,469aA	1,375cdeA	1,392bcdA	1,348deA	1,318eA
+4 °C	1,405ab	1,434a	1,388abB	1,363bcA	1,351bcA	1,322cA	1,321cA
sobna, svjetlo	1,447ab	1,481a	1,390bcB	1,353bcA	1,366bcA	1,337bcA	1,314bcA
sobna, tama	1,458ab	1,472a	1,401bcB	1,347bcA	1,345bcA	1,375bcA	1,316bcA
40 °C, svjetlo	1,432a	1,469a	1,245bC	1,098cC	1,073cB	1,070cB	0,954dC
40 °C, tama	1,464a	1,463a	1,281bcC	1,163dB	1,136deB	1,130deB	1,099eB

^{ABC}Rezultati u istom stupcu (različiti uvjeti skladištenja istog dana skladištenja) označeni različitim velikim slovima statistički se razlikuju ($P < 0,05\%$). ^{abcde}Rezultati u istom redu (različiti dani skladištenja istog uvjeta skladištenja) označeni različitim malim slovima statistički se razlikuju ($P < 0,05\%$).

Tijekom prvih četiri dana skladištenja sadržaj karotenoida u kapsulicama je sličan pri svim uvjetima skladištenja. Do prvog značajnijeg pada dolazi 10. dana skladištenja kada stabilnost kapsulica skladištenih na -20 °C ostaje nepromijenjena dok kod ostalih uvjeta skladištenja sadržaj ukupnih karotenoida počinje opadati. Pri tome se razlikuju dvije skupine uvjeta skladištenja – s jedne strane +4 °C i sobna temperatura s i bez svjetla s prosječnim padom sadržaja ukupnih karotenoida od 3,0% i s druge strane 40 °C s i bez svjetla s prosječnim padom sadržaja ukupnih karotenoida od 12,7% (grafikon 1). Navedene skupine uvjeta skladištenja su se razlikovale i dalje tijekom cijelog razdoblja skladištenja pri čemu je sadržaj karotenoida na kraju promatranog razdoblja skladištenja u kapsulicama skladištenim pri +4 °C i na sobnoj temperaturi s i bez svjetla bio u prosjeku niži 8,3% u odnosu na početak razdoblja skladištenja dok je u kapsulicama skladištenim na 40 °C s i bez svjetla bio u prosjeku niži 29,1% u odnosu na početak razdoblja skladištenja. Nakon 15. dana skladištenja počinje opadati i sadržaj ukupnih karotenoida i u kapsulicama skladištenim na -20 °C, te taj pad sličan padu sadržaja ukupnih karotenoida kapsulica skladištenih na +4 °C i na sobnoj temperaturi s i bez svjetla (51 vs. 57%) te je ovaj odnos između navedenih uvjeta skladištenja zadržan do kraja promatranog razdoblja.

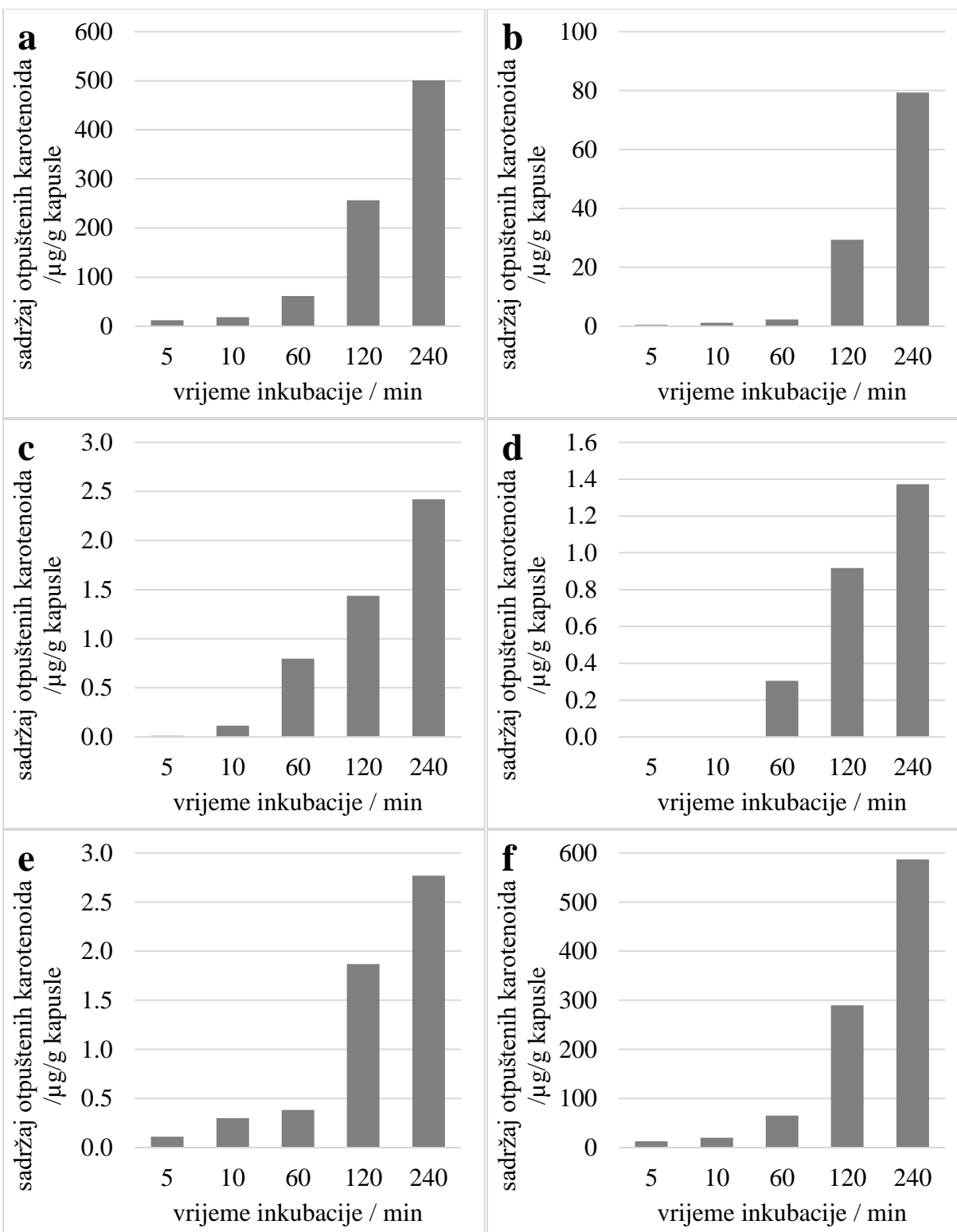


Grafikon 1. Pad sadržaja ukupnih karotenoida u pripremljenim kapsulicama ekstrakta karotenoida kadifrice skladištenim pri različitim uvjetima tijekom 30 dana u odnosu na početak skladištenja

4.2. OTPUŠTANJE KAROTENOIDA IZ KAPSULICA U CITRATNOM PUFERU

Rezultati otpuštanja pojedinačnih i ukupnih karotenoida tijekom inkubiranja u citratnom puferu pri 37 °C tijekom 240 min su prikazani u grafikonu 2. Tijekom prvih sat vremena inkubiranja dolazi do manjeg otpuštanja svih pojedinačnih karotenoida – u prosjeku je otpušteno 11,5% prisutnih karotenoida. U sljedećem satu inkubiranja dolazi do značajnijeg porasta u sadržaju otpuštenih karotenoida najvjerojatnije kao rezultat intenzivnog razaranja kapsulica, te se nakon 240 min otpusti 85,46% ukupnih karotenoida prisutnih u kapsulicama.

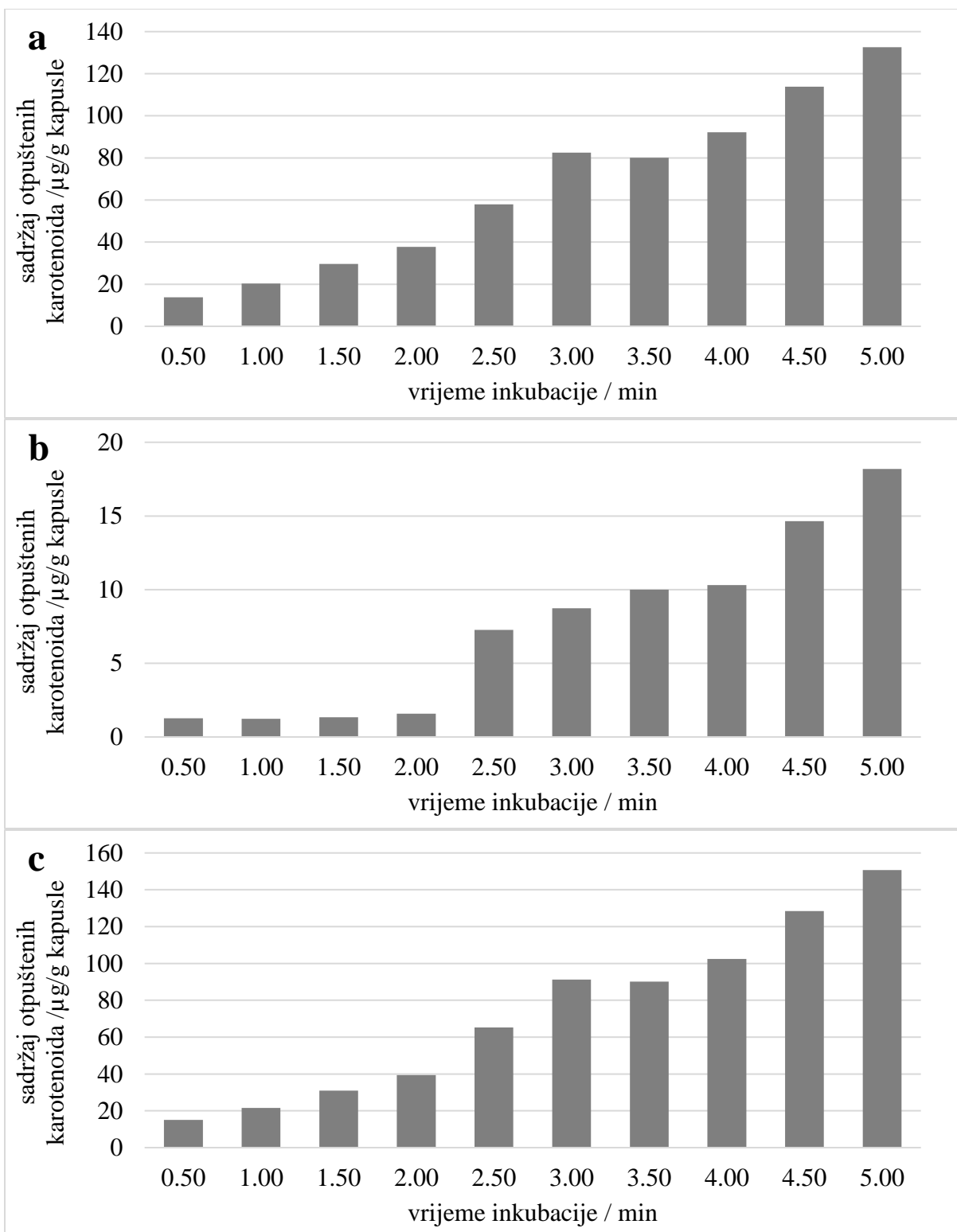
Lutein je bio najzastupljeniji karotenoid u kapsulicama te je i najviše ovog karotenoida otpušteno tijekom inkubiranja kapsulica u citratnom puferu. Nakon 120 min inkubacije otpušteno je 45,0% a nakon 240 min 88,0% luteina inkapsuliranog u pripremljenim kapsulicama. Zeaksantin je sljedeći najzastupljeniji karotenoid, a tijekom inkubiranja iz kapsulica je otpušteno 79,31 µg/g kapsule, što predstavlja 73,4% ukupnog zeaksantina u kapsulicama. α-kriptoksantin, β-kriptoksantin i β-karoten su karotenoidi u značajno nižem sadržaju u pripremljenim kapsulicama ekstrakta kadifice (njihov udio je bio niži od 2%), te je i u citratnom puferu nakon inkubacije otpušten njihov niski sadržaj. Nakon 240 min inkubacije, iz kapsula je oslobođeno 2,42 µg/g kapsule α-kriptoksantina, što čini 69,9% ukupno prisutnog u kapsulicama. β-kriptoksantin je bio najmanje zastupljen karotenoid u kapsulicama te je jedini čije otpuštanje nije detektirano u prvih 10 min, a prvi put je detektiran nakon 60 min inkubacije. Nakon 240 minuta, zabilježeno je najniže otpuštanje ovog karotenoida, sa sadržajem od 1,37 µg/g kapsule, što predstavlja 48,43% ukupno prisutnog u kapsulicama. Što se tiče β-karotena, nakon 240 min inkubacije u citratnom puferu otpušteno je 2,77 µg/g kapsule, što predstavlja 93,06% ukupno prisutnog u kapsulicama.



Grafikon 2. Otpuštanje luteina (a), zeaksantina (b), α -kriptoksantina (c), β -kriptoksantina (d), β -karotena (e) i ukupnih karotenoida (f) iz kapsulica ekstrakta karotenoida kadifrice u citratnom puferu

4.3. OTPUŠTANJE KAROTENOIDA IZ KAPSULICA INKUBACIJOM TJEKOM INFOGEST METODE PROBAVLJIVOSTI

Rezultati analize otpuštanja karotenoida pripremljenih kapsulica u uvjetima simuliranim INFOGEST metodom prikazani su u Grafikonu 3. Tijekom inkubacije probavnim enzimima u INFOGEST metodi, α -kriptoksantin, β -kriptoksantin i β -karoten nisu detektirani niti u jednoj vremenskoj točki. Što se tiče luteina i zeaksantina, tijekom prva dva sata inkubacije tj. u uvjetima koji simuliraju probavu u želucu otpušteno je 6,6% luteina (37,73 $\mu\text{g/g}$ kapsule) i 1,47% (1,58 $\mu\text{g/g}$ kapsule) zeaksantina. Do kraja inkubacije otpušteno je 132,55 $\mu\text{g/g}$ kapsule luteina (23.3% od prisutnog u kapsulicama) i 16,84 $\mu\text{g/g}$ kapsule zeaksantina (16,8% od prisutnog u kapsulicama). Slično kao i za otpuštanje u citratnom puferu, i tijekom otpuštanja u *in vitro* uvjetima INFOGEST probavljivosti, otpuštanje ukupnih karotenoida prati otpuštanje luteina. Tako je nakon želučane faze otpušteno 39,32 $\mu\text{g/g}$ kapsule ukupnih karotenoida (5,7% od ukupno prisutnih u kapsulicama) te nakon intestinalne faze otpušteno je 150,74 $\mu\text{g/g}$ kapsule (22,0% od ukupno prisutnih u kapsulicama) pri čemu udio otpuštenih luteina čini 88,0%.



Grafikon 3. Otpuštanje luteina (a), zeaksantina (b) i ukupnih karotenoida (c) iz kapsulica ekstrakta karotenoida kadifice tijekom simulirane probave *in vitro* INFOGEST metodom probavljivosti

Što se tiče luteina i zeaksantina, tijekom prva dva sata inkubacije tj. u uvjetima koji simuliraju probavu u želucu otpušteno je 6,6% luteina (37,73 µg/g kapsule) i 1,47% (1,58 µg/g kapsule) zeaksantina. Značajniji rast otpuštenih karotenoida je vidljiv tek u intestinalnoj fazi (od 2 do 5 sata inkubacije) što je rezultat djelovanja pankreatina tj. smjese enzima proteaza, lipaza i amilaze. Do kraja inkubacije otpušteno je 132,55 µg/g kapsule luteina (23.3% od prisutnog u kapsulicama) i 16,84 µg/g kapsule zeaksantina (16,8% od prisutnog u kapsulicama). Slično kao i za otpuštanje u citratnom puferu, i tijekom otpuštanja u *in vitro* uvjetima INFOGEST probavljivosti, otpuštanje ukupnih karotenoida prati otpuštanje luteina. Tako je nakon želučane faze otpušteno 39,32 µg/g kapsule ukupnih karotenoida (5,7% od ukupno prisutnih u kapsulicama) te nakon intestinalne faze otpušteno je 150,74 µg/g kapsule (22,0% od ukupno prisutnih u kapsulicama) pri čemu udio otpuštenih luteina čini 88,0%.

4.4. OTPUŠTANJE KAROTENOIDA U POKUSU S NESILICAMA

Otpuštanje karotenoida pripremljenih kapsulica ekstrakta karotenoida kadifice ispitan je *in vivo* pokusom s kokošima nesilicama, pri čemu se pratio sadržaj karotenoida u žumanjcima jaja od početka hranjenja hranidbenim tretmanima do 22. dana. U Tablici 4. prikazani su rezultati analize varijance utjecaja hranidbenog tretmana koji se razlikovao u izvoru karotenoida, dana pokusa i njihove interakcije. Rezultati pokazuju očekivani utjecaj dana pokusa, te hranidbenog tretmana na sadržaj svih pojedinačnih i ukupnih karotenoida u žumanjcima jaja.

Tablica 4. Rezultati analize varijance sadržaja karotenoida u žumanjcima jaja tijekom promatranog razdoblja od početka pokusa do 22. dana

Karotenoid	Hranidbeni tretman (T)	Dan pokusa (D)	T × D
Lutein	<0.001	<0.001	<0.001
Zeaksantin	0.0016	<0.001	0.0585
α-kriptoksantin	<0.001	<0.001	<0.001
β-kriptoksantin	<0.001	<0.001	<0.001
β-karoten	<0.001	<0.001	<0.001
Ukupni karotenoidi	<0.001	<0.001	<0.001

Sadržaj pojedinačnih i ukupnih karotenoida u žumanjcima jaja nesilica hranjenih hranidbenim tretmanima prikazan je u tablici 5. Na početku pokusa sadržaj pojedinačnih i ukupnih karotenoida sličan je u jajima svih hranidbenih tretmana, s vrijednostima sadržaja ukupnih karotenoida 12,66 $\mu\text{g/g}$ u žumanjcima tretmana T0, 10,63 $\mu\text{g/g}$ u žumanjcima tretmana T1 i 11,41 $\mu\text{g/g}$ u žumanjcima tretmana T0. Nakon početka hranjenja, počinje rasti sadržaj karotenoida u žumanjcima nesilica hranjenih hranidbenim tretmanima s dodatkom pripremljenih kapsulica ekstrakta karotenoida kadifice pri čemu su prve razlike između tretmana detektirane između 5 i 10 dana pokusa ovisno o karotenoidu. Međutim, potrebno je napomenuti da je rast ukupnih karotenoida u žumanjcima jaja nesilica hranjenih tretmanom T0 rezultat rasta sadržaja karotenoida kantaksantina koji nije prikazan u rezultatima u tablici 5. Njegov sadržaj počinje rasti nakon trećeg dana pokusa te postiže maksimalan sadržaj od 3,5 $\mu\text{g/g}$ nakon 10. dana pokusa. Samim time, sadržaj ostalih karotenoida žumanjaka nesilica hranjenih tretmanom T0 rezultat je karotenoida kukuruza koji je korišten u sastavljanju potpune krmne smjese za kokoši nesilice. Upravo taj doprinos je potrebno uzeti u obzir i u sadržaju karotenoida žumanjaka nesilica hranjenih pokusnim tretmanima s dodatkom pripremljenih kapsulica. Posljednjeg dana pokusa, sadržaj ukupnih karotenoida u žumanjcima kontrolne skupine iznosio je 17,62 $\mu\text{g/g}$, što predstavlja prosječan porast od 3,45 $\mu\text{g/g}$ u odnosu na početak pokusa. Kod nesilica hranjenih tretmanom T1 sadržaj ukupnih karotenoida je iznosio 22,22 $\mu\text{g/g}$, što je prosječan porast od 5,64 $\mu\text{g/g}$, dok je kod nesilica hranjenih tretmanom T2 zabilježen sadržaj od 25,6 $\mu\text{g/g}$, s prosječnim porastom od 6,29 $\mu\text{g/g}$.

Tablica 5. Sadržaj pojedinačnih i ukupnih karotenoida ($\mu\text{g/g}$) u žumanjcima jajeta nesilica hranjenih potpunim krmnim smjesama sa različitim izvorima karotenoida tijekom 22 dana od početka hranjenja

Dan pokusa	T0	T1	T2	T0	T1	T2
	Lutein			Zeaksantin		
0	3.95b	3.32f	3.56g	6.47d	5.43e	5.83e
2	4.00ab	3.88f	4.27g	6.55bcd	6.35de	7.00de
3	4.00ab	5.00ef	5.42g	6.55bcd	6.70cd	6.90de
5	4.54abB	6.86dAB	7.67fA	7.43abcd	6.84cd	7.65cd
7	4.96abB	7.33dAB	7.48fA	6.50cd	7.59abc	7.46cd
9	6.22ab	6.96d	7.07f	8.12a	7.63abc	7.05d

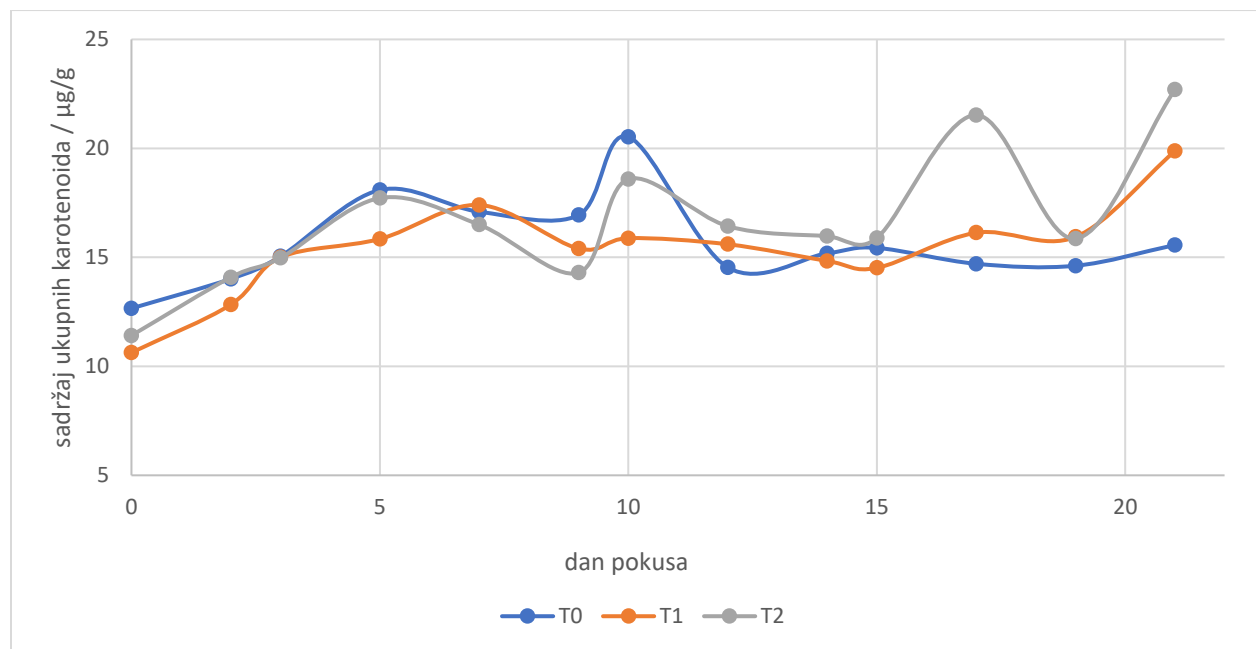
10	6.40aC	11.25cB	14.79cdeA	8.35aA	6.72cdB	7.93cdA
12	5.53abB	11.11cA	13.08eA	7.21abcd	6.55cde	7.03d
14	5.77abC	11.54bcB	14.10deA	7.53abcd	6.81cd	7.52cd
16	5.87abC	11.31cB	13.94deA	7.67abc	6.74cd	7.45cd
18	5.94abC	13.18abcB	18.02bA	7.39abcdB	8.13abB	9.65aA
20	6.34abB	15.41aA	16.64bcA	8.36a	8.17ab	8.44bc
21	5.67abC	15.28B	20.64aA	7.73abB	8.48aAB	9.39abA
22	5.32abB	13.93abA	15.92bcdA	7.52abcd	7.24bcd	8.34bc
<hr/>						
	α -kriptoksantin			β -kriptoksantin		
0	0.51aA	0.43cdAB	0.46cB	1.12bA	0.94dB	1.01cAB
2	0.52a	0.50bc	0.55b	1.13b	1.10c	1.21b
3	0.52aB	0.58bAB	0.61bA	1.14bB	1.26bAB	1.33bA
5	0.59aC	0.67aB	0.75aA	1.29aC	1.47aB	1.65aA
7	0.57aC	0.73aA	0.74aA	1.25abB	1.61aA	1.61aA
9	0.35bC	0.72aA	0.69aA	0.47cB	1.57aA	1.52aA
10	0.36b	0.30fg	0.35de	0.49c	0.39e	0.47ef
12	0.31b	0.29g	0.31de	0.42c	0.38e	0.41f
14	0.32b	0.31ef	0.33de	0.44c	0.40e	0.44ef
16	0.33b	0.31ef	0.33de	0.45c	0.39e	0.44ef
18	0.33bB	0.39dAB	0.43cdA	0.46c	0.50e	0.59e
20	0.36b	0.38de	0.38de	0.49c	0.48e	0.51
21	0.21cB	0.38deA	0.31deA	0.27dB	0.47eA	0.42efAB
22	0.29b	0.30fg	0.34de	0.38cd	0.38e	0.45ef
<hr/>						
	β -karoten			Ukupni karotenoidi		
0	0.60a	0.51ef	0.54f	12.66c	10.63g	11.41j
2	0.61a	0.59cd	0.65df	12.81c	12.43fg	13.69ij
3	0.61a	0.68bc	0.71bcd	13.34c	14.21ef	14.97hij
5	0.69aB	0.79abAB	0.88aA	15.93bc	16.64de	18.61fg
7	0.67aB	0.87aA	0.86abA	17.45ab	18.83cd	18.15fgh
9	0.20bB	0.84aA	0.82abcA	18.94ab	17.71de	17.16ghi
10	0.20bC	0.39fgB	0.64dfA	19.50aB	19.06cdB	24.17cdeA
12	0.18bC	0.38fgB	0.54fA	16.84abcB	18.72cdAB	21.36efA
14	0.18bC	0.40fgB	0.58dfA	17.57abB	19.46bcdAB	22.96deA
16	0.18bC	0.40fgB	0.59dfA	17.88abB	19.14bcdB	22.73deA
18	0.23bC	0.42fgB	0.87aA	18.02abC	22.64abB	29.55abA
20	0.24bC	0.62cdA	0.68cdfA	18.83abB	25.05aA	26.66bcA
21	0.12bB	0.30gA	0.36gA	18.60abC	24.91aB	31.12aA
22	0.10bC	0.37fgB	0.53fA	17.62abB	22.22abcA	25.60cdA

^{a-j}Za karotenoide, rezultati u istom stupcu (različiti dani pokusa istog hranidbenog tretmana) označeni različitim malim slovima statistički se razlikuju ($P < 0,05\%$). ^{ABC}Za karotenoide, rezultati u istom redu

(različiti hranidbeni tretmani istog dana pokusa) označeni različitim velikim slovima statistički se razlikuju ($P < 0,05\%$).

T0 – hranidbeni tretman s dodatkom 8 mg/kg kantaksantina, T1 – hranidbeni tretman s dodatkom 0,5% kapsulica ekstrakta karotenoida kadifica, T2 – hranidbeni tretman s dodatkom 0,5% kapsulica ekstrakta karotenoida kadifica.

Kao što se može vidjeti u tablici 5 i grafikonu 4, sadržaj ukupnih karotenoida u žumanjcima jaja je sličan između hranidbenih tretmana prvih devet dana pokusa, nakon čega dolazi do značajnih varijacija u sadržaju. Sadržaj ukupnih karotenoida u žumancima jaja hranidbenog tretmana T1 znatnije se povećao 18. dana ($22,64 \mu\text{g/g}$), a najviši sadržaj je zabilježen je 21. dana pokusa ($24,17 \mu\text{g/g}$). U žumanjcima hranidbenog tretmana T2, sadržaj ukupnih karotenoida značajnije se povećao 10. dana pokusa ($24,17 \mu\text{g/g}$) a najviši sadržaj je zabilježen 21. dana pokusa ($31,22 \mu\text{g/g}$).



Grafikon 4. Sadržaj ukupnih karotenoida u žumanjcima hranidbenih tretmana tijekom promatranog razdoblja pokusa s nesilicama (T0 – hranidbeni tretman s dodatkom 8 mg/kg kantaksantina, T1 – hranidbeni tretman s dodatkom 0,5% kapsulica ekstrakta karotenoida kadifica, T2 – hranidbeni tretman s dodatkom 0,5% kapsulica ekstrakta karotenoida kadifica)

5. RASPRAVA

Karotenoidi su zbog svoje strukture spojevi skloni degradaciji te njihovu degradaciju može uzrokovati niz različitih oksidirajućih čimbenika poput svjetla, kiselina, metala, temperature i slobodnih radikala (Boon i sur. 2010.). Kako bi se povećala njihova stabilnost, a time i omogućila njihova duža upotreba u hrani, potrebno je smanjiti negativan utjecaj navedenih oksidirajućih faktora. Zbog toga je provedeno ovo istraživanje u kojem je ispitan učinak inkapsuliranjem kalcijevim alginatom na stabilnost inkapsuliranog ekstrakta karotenoida cvijeta kadifice kao osnovni preduvjet za korištenje kapsulica kao izvor karotenoida za boju žumanjka u hranidbi kokoši nesilica. Rezultati istraživanja skladištenih pri izabranim uvjetima skladištenja pokazuju jasno odvajanje u stabilnosti kapsulica skladištenih pri -20 °C, +4 °C i sobnoj temperaturi s i bez svjetla od skladištenih na 40 °C s i bez svjetla. Prema tome, inkapsuliranje ekstrakta karotenoida kadifice kalcijevim alginatom očuvalo je karotenoide tj. povećalo stabilnost kapsulica skladištenih pri 4 °C i pri sobnoj temperaturi bez obzira na prisutnost svjetla u odnosu na idealnu temperaturu skladištenja pri -20 °C. S druge strane, inkapsuliranje nije povećalo stabilnost karotenoida u uvjetima u kojima dolazi do pojačane degradacije karotenoida (40 °C bez obzira na prisutnost svjetla).

Rezultati stabilnosti dobiveni u provedenom istraživanju se mogu usporediti sa sličnim istraživanjem Hojjati i sur. (2012.) gdje se kantaksantin dobiven od bakterije *Dietzia natronolimnaea* HS-1 inkapsulirao sojinim polisaharidima (SSPS), arapskom gumom i maltodekstrinom. Proizvedene kapsulice skladištene su u uvjetima svjetla i tame pri 4, 25 i 45 °C kroz četiri mjeseca. U navedenom istraživanju došlo je do degradacije karotenoida kapsulica pri svim temperaturama skladištenja, posebice 45 °C i s prisutnošću svjetla. U ovom istraživanju, do degradacije karotenoida u prvih 14 dana skladištenja došlo je pri 40 °C bez obzira na prisutnost svjetla, a suprotno navedenom istraživanju gdje je došlo do pada sadržaja karotenoida, kapsulice skladištene na 4 °C su bile stabilnije.

U drugom istraživanju (Xue i sur. 2013.), inkapsulacija karotenoida praha nusproizvoda rajčice se provela želatinom i arapskom gumom, a kapsulice su skladištene na 4, 25 i 35 °C kroz 30 dana. U navedenom istraživanju utvrđen je trend pada sadržaja karotenoida pri povećanju temperature i vremena skladištenja pa su se karotenoidi degradirali u udjelu od 9,64%, 27,97% i 40,87% od

početnog sadržaja prilikom skladištenja kapsulica na 4, 25 i 35 °C. Kapsulice ekstrakta karotenoida kadifice proizvedene u ovom istraživanju su bile stabilnije u odnosu na kapsulice u istraživanju Xue i sur. (2013.) jer su bile stabilnije u sličnim temperaturama skladištenja: pad sadržaja karotenoida od 9.4% pri sobnoj temperaturi bez obzira na prisutnost svjetla u ovom istraživanju u odnosu na 27.97% pada sadržaja karotenoida pri 25 °C u navedenom istraživanju te pad sadržaja karotenoida od 29.1% 40 °C bez obzira na prisutnost svjetla u ovom istraživanju u odnosu na 40.87% pada sadržaja karotenoida pri 35 °C u navedenom istraživanju. Prema tome inkapsulacija kalcijevim alginatom korištena u ovom istraživanju je bila učinkovitija u očuvanju stabilnosti kapsulica karotenoida u odnosu na inkapsuliranje želatinom i arapskom gumom u radu Xue i sur. (2013.).

Za istraživanje otpuštanja karotenoida u pripremljenim kapsulicama ekstrakta karotenoida kadifice izabrani su različiti mediji – u *in vitro* uvjetima citratni pufer i INFOGEST metoda probavljivosti te u *in vivo* uvjetima pokus s nesilicama. Citratni pufer uzrokuje razaranje inkapsuliranja kalcijevim alginatom (Lemic i sur. 2021.) zbog čega je ovaj pufer izabran za simulaciju otpuštanja karotenoida iz pripremljenih kapsulica ekstrakta kadifice u idealnim uvjetima.

Tijekom inkubacije u citratnom puferu na 37 °C, nakon 240 min otpušteno je ukupno 586,751 µg karotenoida/g kapsule, što čini 85,5% ukupno prisutnih karotenoida u pripremljenim kapsulicama ekstrakta kadifice. S obzirom da je lutein u najvećem udjelu od svih prisutnih karotenoida u kapsulicama, sadržaji otpuštenih ukupnih karotenoida prate trend otpuštanja luteina pri čemu je udio luteina u otpuštenim karotenoidima 85,4%. Prema tome, potencijal pripremljenih kapsulica ekstrakta karotenoida kadifice da se otpuste tijekom probave čini 85,5% ukupno prisutnih karotenoida.

U već spomenutom istraživanju Xue i sur. (2013.) određeno je otpuštanje kapsulica karotenoida u 0,01 mol/l KH₂PO₄-citratnom puferu, pH 3,5, pri čemu je nakon 2 sata inkubacije otpušteno oko 30% karotenoida. U usporedbi s ovim istraživanjem, autori su odredili gotovo 3 puta niže otpuštanje iz kapsulica karotenoida praha nusproizvoda rajčice, međutim treba napomenuti da su koristili pufer pH 3,5 kako bi simulirali uvjete želuca, iako pH želuca može biti i niži. Autori su zaključili da su korišteni materijali za inkapsulaciju (želatina i arapska guma) omogućili određenu zaštitu karotenoida od ranog otpuštanja. Značajno viši rezultati u ovom

istraživanju su najvjerojatnije posljedica intenzivnijeg razaranja kapsulica u citratnom puferu pri pH 8,28. Ova razlika može biti povezana s razlikama u formulaciji kapsulica i njihovoj otpornosti na razaranje u različitim puferima, kao i s različitim vrstama i količinama korištenih materijala za inkapsulaciju.

Nakon određivanja stabilnosti pripremljenih kapsulica ekstrakta karotenoida kadifice, sljedeći korak u ispitivanju prikladnosti kapsulica za hranidbu nesilica je određivanje otpuštanja karotenoida iz kapsulica u simuliranim uvjetima probave. Za ovo ispitivanje izabrana je standardizirana INFOGEST metoda prilagođena probavnom traktu nesilica (Minekus i sur. 2014.; Zurak i sur. 2021.). S obzirom da inkubacija u citratnom puferu predstavlja idealne uvjete za razaranje kapsulica, potrebno je u uvjetima simulirane probave ispitati može li probavni trakt nesilica razoriti pripremljene kapsulice kako bi se karotenoidi mogli otpustiti za micelarizaciju u probavnom traktu i zatim apsorpciju u nesilica (Zurak i sur. 2021.).

Tijekom inkubacije probavnim enzimima u INFOGEST metodi, α -kriptoksantin, β -kriptoksantin i β -karoten nisu detektirani niti u jednoj fazi simulirane probave. Razlog tome može biti manja polarnost ovih karotenoida u odnosu na lutein i zeaksantin. Primjerice, van het Hof i sur. (1999.) su utvrdili da je lutein pet puta više biodostupan u odnosu na β -karoten zbog više polarnosti. S obzirom da je u probavnom traktu vodeni medij, manje polarni karotenoidi će se teže probavljati tj. otpuštati iz matriksa hrane tijekom probave. Međutim, moguće je da je i sama metoda uzrok ovakvom rezultatu. Postoji cijeli niz čimbenika koji mogu utjecati na biodostupnost karotenoida iz matriksa hrane tijekom određivanja probavljivosti i biodostupnosti *in vitro* metodom, a među njima su koncentracija soli žuči (Petry i Mercadante 2019.) i masti (Tan i sur. 2020.) te je moguće da njihova koncentracija tijekom korištene INFOGEST metode nije bila dovoljna da bi se otpustili i manje polarni karotenoidi. S druge strane, karotenoidi kadifice su vezani esterima (Vechpanich i Shotipruk 2010.) koji imaju drugačije vrijeme zadržavanja prilikom kromatografskog određivanja. S obzirom da tijekom ekstrakcije karotenoida iz digesta tijekom inkubacije u različitim vremenskim točkama INFOGEST metode nije provedena saponifikacija, moguće je da su ovi karotenoidi bili vezani u estere i nisu mogli biti detektirani primijenjenom HPLC metodom obrnutih faza.

Suprotno provedenom istraživanju, Szabo i sur. (2021.) su pokazali da inkapsulacija karotenoida iz nusproizvoda rajčice (otopljenih u lanenom ulju) s arapskom gumom i

maltodekstrinom rezultira otpuštanjem i manje polarnih karotenoida tijekom provedene inkubacije *in vitro* metode probavljivosti. Tijekom inicijalne faze probave najviše je otpušteno luteina (66,3 µg/100 mL), zatim likopena (15,7 µg/100 mL) i potom β-karotena (7,1 µg/100 mL).

Lutein i zeaksantin, jedini detektirani karotenoidi tijekom inkubacije probavnim enzimima u INFOGEST metodi, su slabo otpušteni iz kapsulica ekstrakta kadifice tijekom prva dva sata inkubacije (6,6% luteina i 1,47% zeaksantina). Značajniji rast otpuštenih karotenoida je vidljiv tek u intestinalnoj fazi (od 2 do 5 sata inkubacije) što je rezultat djelovanja pankreatina tj. smjese enzima proteaza, lipaza i amilaze te intenzivnijeg razaranja strukture kapsulica. Tijekom nastavaka inkubacije, raste udio otpuštenih karotenoida pri čemu je nakon pet sati inkubacije otpušteno 23,3% prisutnog luteina i 16,8% prisutnog zeaksantina u kapsulicama. Ovaj trend rasta otpuštanja karotenoida s trajanjem inkubacije s probavnim enzimima je suprotan trendu uočenom u spomenutom radu Szabo i sur. (2021.). Navedeni autori su primijetili silazni trend otpuštanja karotenoida u želučanoj i intestinalnoj fazi gdje su vrijednosti otpuštenog luteina iznosile 18,3 i 2,8 µg/100 mL.

Ako se usporede rezultati otpuštanja karotenoida u idealnim uvjetima (citratni pufer) i u simuliranim uvjetima probave *in vitro* INFOGEST metode probavljivosti, tijekom simulirane probave otpušteno je tek trećina ukupnih karotenoida od moguće otpuštene količine razaranjem kapsulica. Prema tome, ako se uzmu u obzir rezultati samo provedene *in vitro* metode probavljivosti, pripremljene kapsulice ekstrakta kadifice nemaju visok potencijal primjene u hranidbi nesilica.

Otpuštanje karotenoida pripremljenih kapsulica ekstrakta karotenoida kadifice ispitan je *in vivo* pokusom s kokošima nesilicama. Pri tome je kao parametar kojim se pratilo otpuštanje karotenoida izabran sadržaj karotenoida u žumanjcima jaja. Nakon početka hranjenja nesilica smjesama hranidbenih tretmana sadržaj pojedinačnih i ukupnih karotenoida počinje polako rasti pri čemu značajniji rast počinje nakon sedmog dana pokusa. Maksimalne vrijednosti sadržaja ukupnih karotenoida u žumanjcima jaja nesilica hranjenih pozitivnom kontrolom uočene su već nakon devetog dana pokusa, dok se u žumanjcima s nesilica hranjenih pokusnim smjesama s dodatkom kapsulica ekstrakta karotenoida kadifice maksimalne vrijednosti javljaju kasnije, tek nakon 18. dana pokusa (22,64 – 25,05 µg/g kod T1 i 25,60 – 31,12 µg/g). Navedeni rezultati upućuju na slabiji rast iskorištenja karotenoida kapsulica.

Uočene varijacije u sadržaju karotenoida u žumanjcima nesilica hranjenih tretmanima s dodatkom kapsulica ekstrakta karotenoida kadifice upućuju na moguću neprikladnost primjene nastalih kapsulica u hranidbi nesilica u ovom obliku tj. veličini. S obzirom na visok sadržaj ukupnih karotenoida u kapsulicama, njihove veličine od 2 do 3 mm, te niskog udjela u smjesama hranidbenih tretmana moguće je selektivno uzimanje hrane od strane kokoši nesilica što uzrokuje neujednačenu raspodjelu u žumanjcima tijekom dana provođenja pokusa. Navedeno upućuje da je prikladnije koristiti puno sitnije kapsulice (do 1 mm) s nižim sadržajem karotenoida kako bi se ujednačenije umiješale u smjesu.

Uspoređujući rezultate *in vitro* INFOGEST probavljivosti i *in vivo* pokusa s nesilicama, u *in vivo* uvjetima se postiže bolje iskorištenje karotenoida iz kapsulica nego što je očekivano prema *in vitro* rezultatima. Mogući razlog ovakvim rezultatima je prisutnost enzima u probavnom sustavu nesilica koji mogu probaviti saponificirane karotenoide, kao i mehanički želudac koji dodatno usitnjava kapsule i oslobađa njihov sadržaj. Također, unatoč značajnom povećanju sadržaja karotenoida u žumanjcima nesilica hranjenih tretmanima s dodatkom kapsulica, povećanje sadržaja nije proporcionalno dodatku kapsulica u smjese hranidbenih tretmana. Mogući razlog ovakvom rezultatu je moguća kompeticija za apsorpciju karotenoida kada raste njegov sadržaj u hrani (Zurak i sur. 2021.).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

- Inkapsuliranje karotenoida kadifice (*Tagetes erecta* L.) kalcijevim alginatom povećava njihovu stabilnost u standardnim uvjetima skladištenja hrane za nesilice (sobna temperatura s i bez prisustva svjetla);
- Potencijal otpuštanja ukupnih karotenoida iz kapsulica u idealnim uvjetima (citratni pufer) značajno je viši nego u uvjetima simulirane probave prema *in vitro* INFOGEST metodi tj. inkapsuliranje negativno utječe na otpuštanje karotenoida u *in vitro* uvjetima probavljivosti;
- Sadržaj karotenoida u žumanjcima jaja nesilica hranjenih hranidbenim tretmanima s dodatkom kapsulica raste ali ne u očekivanom obujmu, te inkapsuliranje negativno utječe na otpuštanje karotenoida u *in vivo* ali u manjem utjecaju nego što je očekivano prema *in vitro* metodi probavljivosti;
- Inkapsuliranje karotenoida kadifice kalcijevim alginatom ima potencijal za primjenu u hranidbi nesilica ali je potrebno provesti daljnja istraživanja kako bi se optimizirala ekstrakcija karotenoida iz kadifice, njihov sadržaj karotenoida i veličina kapsulica.

6. ZAHVALA

Ovim putem zahvaljujemo se izv. prof. dr. sc. Kristini Kljak na izdvojenom vremenu, strpljenju i iscrpnim savjetima, bez kojih izrada i pisanje ovog rada ne bi bilo moguće. Također, zahvaljujemo se prof. dr. sc. Marku Vincekoviću na pomoći pri realizaciji ovog rada i savjetima prilikom izrade kapsulica. Na kraju, zahvaljujemo se i Dori Zurak, mag. ing. agr., kao i djelatnicama laboratorija za Zavoda za hranidbu životinja na pomoći prilikom provedbe laboratorijskih analiza.

7. POPIS LITERATURE

1. Boon C. S., McClements D. J., Weiss J., Decker E. A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 50(6): 515-532.
2. Brodkorb A., Egger L., Alminger M., Alvito P., Assunção R., Balance S., Bohn T., Bourlieu Lacanal C., Boutrou R., Carrière F., Clemente A., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Edwards C., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A. R., Martins C., Marze S., McClements D. J., Ménard O., Minekus M., Portmann R., Santos C. N., Souchon I., Singh P. R., Vegarud G. E., Wickham M.S.J., Weitschies W., Recio I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*. 14: 991-1014.
3. Carter S., Connole E. S., Hill A. M., Buckley J. D., Coates A. M. (2023). Eggs and cardiovascular disease risk: An update of recent evidence. *Current Atherosclerosis Reports*. 25: 373-380.
4. da Silva L. C., Menezes Castelo R., Cheng H. N., Biswas A., Fero Furtado R., Alves C. R. (2022). Methods of microencapsulation of vegetable oil: Principles, stability and applications – a minireview. *Food Technology & Biotechnology*. 60 (3): 308-320.
5. Dansou D. M., Zhang H., Yu Y., Wang H., Tang C., Zhao O., Qin Y., Zhang J. (2023). Carotenoid enrichment in eggs: From biochemistry perspective. *Animal Nutrition*. 14: 315-333.
6. Gençdağ E., Özdemir E. E., Demirci K., Görgüç A., Yılmaz F. M. (2022). Copigmentation and stabilization of anthocyanins using organic molecules and encapsulation techniques. *Current Plant Biology*. 29, 100238.
7. González-Peña M. A., Ortega-Regules A. E., de Parrodi C. A., Lozada-Ramírez J. D. (2023). Chemistry, occurrence, properties, applications, and encapsulation of carotenoids - A review. *Plants*. 12, 313.
8. Gunjević V., Musa M. M., Zurak D., Svečnjak Z., Duvnjak M., Grbeša D., Kljak, K. (2024). Carotenoid degradation rate in milled grain of dent maize hybrids and its relationship with the grain physicochemical properties. *Food Research International*. 177: 113909.

9. Hojjati M., Razavi S. H., Rezaei K., Gilani K. (2014). Stabilization of canthaxanthin produced by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 with spray drying microencapsulation. *Journal of Food Science and Technology*. 51(9): 2134-2140.
10. Juric S., Vlahovicek-Kahlina K., Duralija B., Bandic L., Nekic P., Vincekovic M. (2021). Stimulation of plant secondary metabolites synthesis in soilless cultivated strawberries (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne) using zinc-alginate microparticles. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 45(3): 324-334.
11. Kavtarashvili A.S., Stefanova I.L., Svitkin V.S. (2019). Functional egg production. III. The role of the carotenoids. *Agricultural Biology*. 54(4): 681-692.
12. Kralik I., Kralik G., Gvozđanić K. (2021). Specifics of table eggs production in the Republic of Croatia. *Agroeconomia Croatica*. 11(1): 126-136.
13. Kurilich A. C., Juvik J. A. (1999). Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 1948-1955.
14. Lemic D., Orešković M., Mikac K. M., Marijan M., Jurić S., Vlahoviček-Kahlina K. Vinceković M. (2021). Sustainable pest management using biodegradable apitoxin-loaded calcium-alginate microspheres. *Sustainability*. 13: 6167.
15. Lohmann Breeders GmbH. (2022). Lohmann Brown-Classic Layers. Management Guide. Cage Housing. <https://lohmann-breeders.com/media/strains/cage/management/LOHMANN-Brown-Classic-Cage.pdf> – pristup 05.02.2024.
16. Marounek M., Pebriansyah A. (2018). Use of carotenoids in feed mixtures for poultry: a review. *Agricultura tropica et subtropica*. 51(3): 107-111.
17. Minekus M., Alming M., Alvito P., Ballance S., Bohn T., Bourlieu C., Carriere F., Boutrou R., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Egger L., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A., Marze S., McClements D.J., Menard O., Recio I., Santos C.N., Singh R.P., Vegarud G.E., Wickham M.S.J., Weitschies W., Brodtkorb A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*. 5(6): 1113-1124.
18. Montoya-Arroyo A., Toro-González C., Sus N., Warner J., Esquivel P., Jiménez V. M. Franka J. (2022). Vitamin E and carotenoid profiles in leaves, stems, petioles and flowers

- of stinging nettle (*Urtica leptophylla* Kunth) from Costa Rica. Journal of The Science of Food and Agriculture. 102: 6340-6348.
19. National Research Council (NRC). (1994). Nutrient Requirements of Poultry. 9. revidirano izdanje. Natl. Acad. Press, Washington.
 20. Park Y. J., Park S., Arasu M. V., Al-Dhabi N. A., Ahn H., Kim J. K., Park S. U. (2017). Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different cultivars of *Tagetes* flowers. Molecules. 22, 313.
 21. Patel N., Lalwani D., Gollmer S., Injeti E., Sari Y., Nesamony J. (2016). Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation. Progress in Biomaterials. 5: 117-133.
 22. Petry F. C., Mercadante A. Z. (2019). Bile amount affects both the degree of micellarization and the hydrolysis extent of carotenoid esters during in vitro digestion. Food & Function. 10(12): 8250-8262.
 23. Pickworth C. L., Loerch S. C., Kopec R. E., Schwartz S. J. Fluharty F. L. (2012). Concentration of pro-vitamin A carotenoids in common beef cattle feedstuffs. Journal of Animal Science. 90(5): 1553-1561.
 24. Réhault-Godbert S., Guyot N., Nys Y. (2019). The golden egg: Nutritional value, bioactivities, and emerging benefits for human health. Nutrients. 11(3): 684.
 25. Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI press, Washington.
 26. Skřivanová V., Englmaierová M., Bendová M., Skřivan M. (2017). Effect of the source and level of carotenoids in diets on their retention in eggs. Czech Journal Animal Science. 62: 323-330.
 27. Spasevski N., Tasić T., Vukmirović Đ., Banjac V., Rakita S., Lević J., Đuragić O. (2017). Effect of different levels of marigold and paprika on egg production and yolk colour. Archiva Zootechnica. 20(2): 51-57.
 28. Surai P. F., Speake B. K., Wood N. A., Blount J. D., Bortolotti G. R., Sparks. N. H. (2001). Carotenoid discrimination by the avian embryo: A lesson from wild birds. Comp. Biochem. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 128: 743-750.
 29. Szabo K., Eموke Teleky B., Ranga F., Simon E., Pop O. L., Babalau-Fuss V., Kapsalis N., Vodnar D. C. (2021). Bioaccessibility of microencapsulated carotenoids, recovered from

- tomato processing industrial by-products, using *in vitro* digestion model. LWT. 152: 112285.
30. Tan Y., Zhang Z., Zhou H., Xiao H., McClements D. J. (2020). Factors impacting lipid digestion and β -carotene bioaccessibility assessed by standardized gastrointestinal model (INFOGEST): oil droplet concentration. Food & Function. 11(8): 7126-7137.
 31. Tokas J., Malik K., Punia H. (2018). Analysis of carotenoid composition in petal extracts of marigold (*Tagetes erecta*). International Journal of Chemical Studies. 6(1): 741-744.
 32. van het Hof K. H., Brouwer I. A., West C. E., Haddeman E., Steegers-Theunissen R. P., van Dusseldorp M., Weststrate J. A., Eskes T. K. A. B., Hautvast, J. G. (1999). Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of β -carotene. The American Journal of Clinical Nutrition. 70(2): 261-268.
 33. Vechpanich J., Shotipruk, A. (2010). Recovery of free lutein from *Tagetes erecta*: Determination of suitable saponification and crystallization conditions. Separation Science and Technology. 46(2): 265-271.
 34. Vinarov Z., Petkova Y., Tcholakova S., Denkov N., Stoyanov S., Pelan E., Lips, A. (2012). Effects of emulsifier charge and concentration on pancreatic lipolysis. 1. In the absence of bile salts. Langmuir. 28: 8127-8139.
 35. Wen C., Su Y., Tao Z., Cheng Z., Zhou D., Wang T., Zhou Y. (2021). Dietary supplementation with microencapsulated lutein improves yolk color and lutein content in fresh and cooked eggs of laying hens. Journal Poultry Science Association. 58(2): 97-102
 36. Wen C., Xu X., Zhou D., Yu Q., Wang T., Zhou Y. (2022). The effects of canthaxanthin deposition in egg yolk of laying hens. Poultry Science. 101:101889.
 37. Xue F., Li C., Pan S. (2013). In vivo antioxidant activity of carotenoid powder from tomato byproduct and its use as a source of carotenoids for egg-laying hens. Food & Function. 4:610-617.
 38. Zurak D., Grbeša D., Duvnjak M., Kiš G., Međimurec T., Kljak K. (2021). Carotenoid content and bioaccessibility in commercial maize hybrids. Agriculture. 11: 586.

8. SAŽETAK

Autori: Karla Čorbić, Nikola Linić i Barbara Vuk

Inkapsuliranje ekstrakta karotenoida kalcijevim alginatom povećava stabilnost ali smanjuje iskorištenje karotenoida u kokoši nesilica

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mogućnost primjene kapsulica ekstrakta karotenoida cvijeta kadifice (*Tagetes erecta* L.) kao izvora karotenoida u hranidbi nesilica. Karotenoidi kadifice su ekstrahirani acetonom, te inkapsulirani kalcijevim alginatom ionskim geliranjem. Pripremljenim kapsulicama je ispitana stabilnost prilikom različitih uvjeta skladištenja, a otpuštanje karotenoida ispitano je u *in vitro* uvjetima (citratni pufer pri 37 °C i *in vitro* INFOGEST metoda probavljivosti) i *in vivo* uvjetima (pokus s nesilicama). Pokus s nesilicama je proveden s 45 Lohmann Brown nesilica, a u hranidbene tretmane je dodano 0,5 i 1% pripremljenih kapsulica. Na +4 °C i sobnoj temperaturi (s i bez svjetla) zabilježen je umjeren pad sadržaja karotenoida kapsulica (3% nakon 10 dana), usporediv sa skladištenjem na -20 °C, dok je pri 40 °C (s i bez svjetla) došlo do značajne degradacije (12,7% nakon 10 i 29,1% nakon 30 dana). Nakon 2 sata inkubacije, 85,6% ukupnih karotenoida je otpušteno iz pripremljenih kapsulica u citratnom puferu. INFOGEST metodom određeno je ograničeno otpuštanje karotenoida iz kapsulica, sa samo 23,3% luteina i 16,8% zeaksantina prisutnog u kapsulicama otpuštenog nakon intestinalne faze. Nasuprot tome, *in vivo* pokus je rezultirao boljim iskorištenjem karotenoida, s rastom sadržaja ukupnih karotenoida u žumanjcima od 5,64 µg/g i 6,29 µg/g u odnosu na početak pokusa. Inkapsuliranje ekstrakta karotenoida cvijeta kalcijevim alginatom ima potencijal primjene u hranidbi peradi ali je potrebno optimizirati kapsulice kako bi se povećali iskorištenje karotenoida.

Ključne riječi: karotenoidi, inkapsulacija, stabilnost, probavljivost, kokoši nesilice

9. SUMMARY

Authors: Karla Čorbić, Nikola Linić and Barbara Vuk

Encapsulation of carotenoid extract in calcium alginate increases stability but reduces carotenoid utilization in laying hens

The aim of this study was to investigate the possibility of using particles containing carotenoid extracts from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) as a source of carotenoids in the diet of laying hens. Marigold carotenoids were extracted with acetone and encapsulated by ionic gelation of calcium alginate. The prepared particles were tested for stability under different storage conditions and the release of carotenoids was evaluated *in vitro* (in citrate buffer at 37°C and using the INFOGEST *in vitro* digestion method) and *in vivo* (laying hen trial). The hen trial was conducted with 45 Lohmann Brown hens and the dietary treatments included the addition of 0.5% and 1% of the prepared particles. At 4°C and room temperature (with and without light), a moderate decrease in carotenoid content was observed (3% after 10 days), similar to storage at -20°C, while at 40°C (with and without light) a significant degradation occurred (12.7% after 10 days and 29.1% after 30 days). After 2 hours of incubation, 85.6% of the total carotenoids were released from the prepared particles in the citrate buffer. The INFOGEST method showed a limited release of carotenoids from the capsules, with only 23.3% of the lutein and 16.8% of the zeaxanthin contained in the particles being released after the intestinal phase. In contrast, the *in vivo* trial resulted in better utilization of the carotenoids, with an increase in total carotenoid content in the yolks of 5.64 µg/g and 6.29 µg/g compared to the beginning of the trial. The encapsulation of carotenoid extracts from marigold flowers with calcium alginate has a potential for application in poultry nutrition, but it is necessary to optimize the particles to increase the utilization of carotenoids.

Key words: carotenoids, encapsulation, stability, digestibility, laying hen

ŽIVOTOPISI

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

Nikola Linić rođen je u Zagrebu 5. listopada 2000. godine. Nakon završene osnovne škole, obrazovanje nastavlja u prirodoslovnoj školi Vladimira Preloga kao ekološki tehničar. Završetkom srednje škole 2019. godine upisuje smjer animalnih znanosti Agronomskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Preddiplomski studij završava u srpnju 2022. godine te upisuje diplomski studij Hranidba životinja i hrana na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji pohađa do danas.

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