

Obogaćivanje konzumnih jaja luteinom

Grčević, Manuela

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:711995>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Manuela Grčević, dipl. ing.

OBOGAĆIVANJE KONZUMNIH JAJA LUTEINOM

- Doktorski rad -

Osijek, 2015.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Manuela Grčević, dipl. ing.

OBOGAĆIVANJE KONZUMNIH JAJA LUTEINOM

- Doktorski rad -

Mentor: dr. sc. dr. h. c. Gordana Kralik, prof. emeritus

Povjerenstvo za ocjenu:

- 1. dr. sc. Zlata Kralik, docentica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, predsjednica i komentorica**
- 2. dr. sc. dr. h. c. Gordana Kralik, professor emeritus Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, mentorica i član**
- 3. dr. sc. Milan Sak-Bosnar, redoviti profesor Odjela za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član**

Osijek, 2015.

REPUBLIKA HRVATSKA
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Manuela Grčević, dipl. ing.

OBOGAĆIVANJE KONZUMNIH JAJA LUTEINOM

- Doktorski rad -

Mentor: dr. sc. dr. h.c. Gordana Kralik, prof. emeritus

Javna obrana doktorskog rada održana je 05. lipnja 2015. godine pred Povjerenstvom za obranu:

- 1. dr. sc. Zlata Kralik, docentica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, predsjednica i komentorica**
- 2. dr. sc. dr. h. c. Gordana Kralik, professor emeritus Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, mentorica i član**
- 3. dr. sc. Milan Sak-Bosnar, redoviti profesor Odjela za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član**

Osijek, 2015.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorski rad

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Poslijediplomski doktorski studij: Poljoprivredne znanosti

Smjer: Stočarstvo

UDK: 637.4.04/07

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Poljoprivreda

Grana: Stočarstvo

Obogaćivanje konzumnih jaja luteinom

Manuela Grčević, dipl. ing.

Rad je izrađen na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: prof. emer. dr. sc. dr. h. c. Gordana Kralik

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj luteina dodanog u hranu nesilica na povećanje sadržaja luteina u žumanjku standardnih jaja i jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama kao i njegovo djelovanje na pokazatelje kvalitete jaja, profil masnih kiselina i oksidaciju lipida u žumanjcima te biokemijske pokazatelje u krvi nesilica. Istraživanje je provedeno u istom terminu u dva usporedna pokusa (tretmani K i O) na ukupno 600 kokoši nesilica Tetra SL hibrida koje su bile u 31. tjednu starosti, a trajalo je 5 tjedana. Svaki tretman obuhvaćao je po 300 nesilica podijeljenih u kontrolnu i dvije pokusne skupine. U tretmanu K nesilice su hranjene standardnom smjesom, a u tretmanu O smjesom koja sadrži 5% mješavine ulja s povećanim udjelom omega-3 masnih kiselina. Pokusne skupine unutar tretmana razlikovale su se po razinama luteina dodanog u smjesu na sljedeći način: bez dodatka luteina (K₀ i O₀), dodano 200 mg/kg luteina (K₂₀₀ i O₂₀₀) i dodano 400 mg/kg luteina (K₄₀₀ i O₄₀₀). Rezultati istraživanja pokazali su značajno (P<0,001) obogaćivanje jaja luteinom u oba tretmana. Sadržaj luteina u jajima porastao je prosječno 7,65 puta u tretmanu K te 5,39 puta u tretmanu O. U tretmanu K zabilježen je značajan (P=0,028) utjecaj luteina na povećanje mase jaja K₂₀₀ skupine te značajno (P=0,001) deblja ljuska jaja u K₄₀₀ skupini. Lutein je značajno (P<0,001) utjecao na smanjenje pH vrijednosti svježeg žumanjka K₂₀₀ skupine i povećanje pH vrijednosti svježih bjelanjaka O₂₀₀ i O₄₀₀ skupina. Utvrđen je značajan utjecaj (P<0,001) luteina na porast vrijednosti boje žumanjka (EggMulti Tester) u oba tretmana. Primjećuje se značajan utjecaj (P<0,001) luteina na smanjenje CIE L* i povećanje CIE a* i CIE b* vrijednosti boje žumanjka u tretmanu K, dok je u tretmanu O lutein značajno utjecao (P<0,001) samo na povećanje CIE a* vrijednosti žumanjka. Dodatak luteina uzrokovao je značajan porast sadržaja ukupnih MUFA (P=0,007) te smanjenje ukupnih n-6 PUFA (P=0,002) i n-3 PUFA (P=0,021) u K₂₀₀ skupini, dok je u O tretmanu lutein značajno povećao (P=0,017) sadržaj n-3 PUFA i značajno (P=0,025) smanjio omjer n-6/n-3 PUFA. Lutein nije utjecao (P>0,05) na vrijednosti TBARS-a u žumanjcima jaja i biokemijskih pokazatelja u krvi nesilica u oba tretmana.

Broj stranica: 121

Broj slika/grafikona: 10/8

Broj tablica: 30

Broj literaturnih navoda: 193

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: lutein, omega-3 masne kiseline, kvaliteta jaja, boja žumanjka, profil masnih kiselina, oksidacija lipida

Datum obrane: 05. lipanj 2015.

Povjerenstvo za obranu:

1. **doc. dr. sc. Zlata Kralik** – komentorica i predsjednica
2. **prof. emer. dr. sc. dr. h. c. Gordana Kralik** – mentorica i član
3. **prof. dr. sc. Milan Sak-Bosnar** – član

Rad je pohranjen u:

Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

PhD thesis

Faculty of Agriculture in Osijek
Postgraduate study: Agricultural Sciences
Course: Animal Breeding

UDK: 637.4.04/.07
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Agriculture
Branch: Animal Breeding

Enrichment of table eggs with lutein

Manuela Grčević, Mag. Eng.

Thesis performed at Faculty of Agriculture in Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Supervisor: Prof. Emer. Dr. Dr. h. c. Gordana Kralik

The aim of this study was to examine the impact of lutein added to the feed of laying hens on the content of lutein in yolk of standard eggs and eggs enriched with omega-3 fatty acids, as well as its effect on the eggs' quality indicators, fatty acid profile, lipid oxidation in yolks and biochemical parameters of hens blood. The research was conducted in two parallel experiments (treatments K and O) on a total of 600 laying hens of Tetra SL hybrid that were 31 weeks old, and lasted for five weeks. Each treatment comprised of 300 hens divided into a control and two experimental groups. In the treatment K hens were fed with standard mixture, and in the treatment O with a mixture containing 5% oil mixture with increased content of omega-3 fatty acids. Experimental groups within the treatment differed depending on the levels of lutein added to the mixture in the following way: without the addition of lutein (K₀ and O₀), added 200 mg/kg lutein (K₂₀₀ and O₂₀₀) and added 400 mg/kg lutein (K₄₀₀ and O₄₀₀). The results of the study showed a significant (P<0.001) enrichment of eggs with lutein in both treatments. The content of lutein in eggs increased by an average of 7.65 fold in the treatment K and 5.39 fold in treatment O. In K treatment there was a significant effect of lutein (P=0.028) on increasing the egg weight in K₂₀₀ group and significantly (P=0.001) thicker egg shell in K₄₀₀ group. Lutein has significantly (P<0.001) influenced the decrease of pH values of fresh egg yolks in K₂₀₀ group and increase of pH values of fresh egg whites in O₂₀₀ and O₄₀₀ groups. A significant influence (P<0.001) of lutein on increase of egg yolk color values (EggMulti Tester) was determined in both treatments. There has been a significant effect (P <0.001) of lutein on decrease of CIE L* and increase of CIE a* and CIE b* values of yolk color in the treatment K, while in the treatment O lutein significantly affected (P<0.001) only the increase of CIE a* value of yolk color. Addition of lutein caused a significant increase in the content of total MUFA (P=0.007) and a decrease of total n-6 PUFA (P=0.002) and n-3 PUFA (P=0.021) in K₂₀₀ group, while in the O treatment lutein significantly increased (P=0.017) the content of n-3 PUFA and significantly reduced (P=0.025) the ratio of n-6/n-3 PUFA. Lutein did not affect (P>0.05) the TBARS values of egg yolks and biochemical parameters of hens blood in both treatments.

Number of pages: 121
Number of figures/graphs: 10/8
Number of tables: 30
Number of references: 193
Original in: croatian

Key words: lutein, omega-3 fatty acids, egg quality, yolk color, fatty acids profile, lipid oxidation

Date of the thesis defense: 5 June 2015.

Reviewers:

1. **Assist. Prof. Zlata Kralik** – co-mentor and president
2. **Prof. Emer. Dr. Dr. h. c. Gordana Kralik** – mentor and member
3. **Prof. Dr. Milan Sak-Bosnar** – member

Thesis deposited in:

Library of Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

KAZALO

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 3 |
| 2.1. Proizvodnja i potrošnja jaja u Republici Hrvatskoj | 3 |
| 2.2. Kokošja jaja | 4 |
| 2.2.1. Građa jaja | 6 |
| 2.3. Karotenoidi | 8 |
| 2.3.1. Struktura karotenoida | 8 |
| 2.3.2. Biodostupnost karotenoida | 11 |
| 2.3.2.1. Apsorpcija, prijenos i pohranjivanje karotenoida u organizmu | 11 |
| 2.3.3. Biološke funkcije i aktivnosti karotenoida | 13 |
| 2.3.3.1. Karotenoidi u membranama | 14 |
| 2.3.3.2. Kemija karotenoida | 15 |
| 2.3.3.3. Karotenoidi kao antioksidansi | 16 |
| 2.3.3.4. Apsorpcija svjetla i fotokemijska svojstva karotenoida | 17 |
| 2.3.4. Karotenoidi u hranidbi peradi | 18 |
| 2.3.5. Karotenoidi u žumanjku jajeta | 21 |
| 2.4. Lutein | 22 |
| 2.4.1. Lutein i zdravlje ljudi | 24 |
| 2.5. Obogaćivanje jaja luteinom | 28 |
| 2.6. Jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama | 32 |
| 2.7. Funkcionalna hrana | 35 |
| 3. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA | 37 |
| 4. MATERIJAL I METODE RADA | 38 |
| 4.1. Plan i provedba istraživanja | 38 |
| 4.2. Hranidba | 39 |
| 4.3. Kemijska analiza hrane | 40 |
| 4.4. Proizvodni pokazatelji nesilica | 41 |
| 4.5. Istraživanje kvalitete jaja | 41 |
| 4.6. Sadržaj luteina u hrani i žumanjcima jaja | 42 |
| 4.7. Masne kiseline u hrani i žumanjcima jaja | 45 |
| 4.8. Oksidacija lipida u žumanjcima | 47 |
| 4.9. Biokemijska analiza krvi | 48 |
| 4.10. Statistička obrada podataka | 48 |
| 5. REZULTATI I RASPRAVA | 49 |
| 5.1. Proizvodni pokazatelji nesilica tijekom pripremnog razdoblja | 49 |
| 5.2. Tretman K | 50 |
| 5.2.1. Proizvodni pokazatelji nesilica | 50 |
| 5.2.2. Pokazatelji kvalitete jaja | 51 |
| 5.2.3. Sadržaj luteina u žumanjcima jaja | 64 |
| 5.2.4. Masne kiseline u žumanjcima jaja | 67 |
| 5.2.5. Oksidacija lipida u žumanjcima jaja | 71 |
| 5.2.6. Biokemijski pokazatelji u krvi nesilica | 73 |

| | |
|--|------------|
| 5.3. Tretman O | 76 |
| 5.3.1. Proizvodni pokazatelji nesilica | 76 |
| 5.3.2. Pokazatelji kvalitete jaja | 77 |
| 5.3.3. Sadržaj luteina u žumanjcima jaja | 92 |
| 5.3.4. Masne kiseline u žumanjcima jaja | 94 |
| 5.3.5. Oksidacija lipida u žumanjcima jaja | 97 |
| 5.3.6. Biokemijski pokazatelji u krvi nesilica | 100 |
| 6. ZAKLJUČCI | 103 |
| 7. LITERATURA | 106 |
| 8. SAŽETAK | 119 |
| 9. SUMMARY | 120 |
| ŽIVOTOPIS | 121 |

1. UVOD

Ljudi su od davnina koristili određene namirnice ne samo kao izvor osnovnih nutrijenata potrebnih za rast i razvoj organizma, već i kako bi poboljšali opće psihofizičko stanje. Poznata je izreka grčkog liječnika Hipokrata: „Neka hrana bude tvoj lijek, a lijek tvoja hrana“, koja govori da se i u antičko doba proučavao utjecaj hrane na zdravlje pojedinca. Razvojem moderne znanosti, medicine i terapije lijekovima koncept „hrane kao lijeka“ pomalo je zanemaren (**Hasler, 2002.**), međutim zadnjih nekoliko desetljeća pozornost se ponovno usmjerava na namirnice koje bi mogle imati ulogu u očuvanju zdravlja i prevenciji bolesti. Potrošači ujedno postaju svjesniji činjenice da prehrana može djelovati kao prva linija obrane u prevenciji različitih kroničnih bolesti uzrokovanih starenjem (karcinom, srčane bolesti, osteoporoza, artritis, problemi s vidom).

Jaje je namirnica koja je vrlo rasprostranjena u prehrani ljudi. Sadrži bjelančevine najveće biološke vrijednosti, esencijalne masne kiseline, vitamine topljive u mastima, minerale kalcij, fosfor, željezo i cink. Ono što ih razlikuje od drugih namirnica je činjenica da, pored vrlo kvalitetnog nutritivnog sastava, mogu biti obogaćena sastojcima koji imaju dokazano pozitivno djelovanje na zdravlje ljudi (omega-3 masne kiseline, vitamini, antioksidansi), i to na prirodan način, putem metabolizma nesilica. Takva „obogaćena“ jaja konzumiraju se kao sastavni dio svakodnevne prehrane i u potpunosti odgovaraju definiciji funkcionalne hrane. Na tržištu Republike Hrvatske, osim standardnih, prisutna su samo jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, dok na svjetskom tržištu postoje jaja istovremeno obogaćena s dva i više funkcionalnih sastojaka. Takva su, primjerice, Benefic® jaja, obogaćena jodom, vitaminom D, folnom kiselinom, vitaminom E, selenom, luteinom i zeaksantinom te omega-3 masnim kiselinama (**Bourre i Galea, 2006.**).

Lutein, biljni pigment rasprostranjen u zelenom lisnatom povrću i sastavni dio žute pjege oka kod ljudi, u posljednje je vrijeme predmet brojnih istraživanja zbog svog zaštitnog djelovanja na zdravlje očiju, kože, krvnih žila te živčanog sustava. Posebno je važna njegova uloga u očnim tkivima gdje, zajedno sa zeaksantinom, djeluje kao antioksidans i učinkovit filter visokoenergetske plave svjetlosti, štiteći fotoreceptore od oštećenja (**Krinsky, 2002.**). Poznata je uloga luteina u prevenciji razvoja senilne makularne degeneracije (AMD - Age-related Macular Degeneration) koja je glavni uzrok nepovratne sljepoće kod ljudi starijih od 65 godina. Zbog oštećenja fotoreceptora djelovanjem visokoenergetske plave svjetlosti i slobodnih radikala prisutnih u oku dolazi do gubitka

centralnog vida i vidne oštine (**Nilsson i sur., 2003**).. Navedene promjene mogu se spriječiti odgovarajućim unosom luteina u organizam.

Hranidbom peradi može se značajno utjecati na sastav i kvalitetu jajeta, posebno na sastav masnih kiselina, koncentraciju mikroelemenata i vitamina (**Kralik i sur., 2008.a**). Budući da je lutein topljiv u mastima, na njegov sadržaj u žumanjku jajeta može se utjecati dizajniranjem smjesa za nesilice. Dodatkom povećanih razina luteina u smjese utječe se na povećanje koncentracije luteina u žumanjcima jaja. Jaja s povećanim sadržajem luteina predstavljaju značajan doprinos unosu luteina kod ljudi, koji je u svakodnevnoj prehrani nizak zbog sve rjeđe konzumacije zelenog lisnatog povrća, glavnog izvora luteina u prehrani ljudi.

Jaja istovremeno obogaćena omega-3 masnim kiselinama i luteinom predstavljaju namirnicu koja ljudima, osim kvalitetnih hranjivih sastojaka, osigurava unos tvari koje imaju pozitivan utjecaj na zdravlje i prevenciju razvoja određenih bolesti.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Proizvodnja i potrošnja jaja u Republici Hrvatskoj

Peradarska proizvodnja u Republici Hrvatskoj ima dugu tradiciju. Počeci organizirane proizvodnje vežu se uz 1953. godinu i izgradnju farme Kokingrad u kombinatu „Belje“, dok su 1961. izgrađene prve farme „Koke“ u Varaždinu (**Kralik i sur., 2008.a**). Proizvodnja konzumnih jaja u Republici Hrvatskoj odvija se na peradarskim farmama, kao i na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima, i trenutno zadovoljava potrebe stanovništva iako je posljednjih godina vidljiv pad broja proizvedenih jaja (**Statistička izvješća, 2014.**). Podaci Statističkog ljetopisa za razdoblje 2008. – 2013. godine o broju kokoši nesilica, proizvodnji i potrošnji jaja prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Broj kokoši nesilica, proizvodnja i potrošnja jaja u Republici Hrvatskoj

| Godina | 2008. | 2009. | 2010. | 2011. | 2012. | 2013. |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Broj kokoši nesilica* | 5 486 401 | 5 673 041 | 4 357 905 | 4 078 789 | 3 696 170 | 3 979 081 |
| Proizvodnja jaja, tis. kom.* | 787 304 | 805 166 | 704 119 | 691 791 | 584 957 | 605 553 |
| Potrošnja jaja, kom. po članu kućanstva** | 144 | 148 | 158 | 153 | - | - |

Izvor: *Statistička izvješća 1509/2014, str. 28.; **Statistički ljetopis Republike Hrvatske 2013., str. 196.

Iz Tablice 1. vidljivo je smanjenje broja kokoši nesilica kao i proizvodnje jaja u razdoblju 2008.-2012., dok je u slučaju potrošnje jaja zabilježen porast do 2010., a zatim u 2011. lagani pad. U najnovijem izdanju Statističkog ljetopisa za 2014. godinu ne postoje podaci o količinama prehrambenih proizvoda utrošenim u kućanstvima za 2012. i 2013. godinu, već su podaci izraženi kao „Vrijednost otkupljenih i prodanih proizvoda poljoprivrede, šumarstva i ribarstva“ pa stoga nisu ni navedeni u Tablici 1.

U Republici Hrvatskoj, na temelju podataka iz Upisnika farmi kokoši nesilica (**Ministarstvo poljoprivrede, 2014.**), postoji 127 farmi s 350 i više nesilica koje podliježu obvezi označavanja jaja za konzamaciju, kako je to određeno Pravilnikom o registraciji gospodarstava na kojima se uzgajaju kokoši nesilice (**NN 113/10., 05/13. i 36/13.**). Iako je Ministarstvo poljoprivrede još 2005. godine propisalo minimalne uvjete za zaštitu kokoši

nesilica do danas je svega 15 farmi djelomično usklađeno, od ukupno 127. Djelomična usklađenost odnosi se na činjenicu da, pored sustava držanja u neobogaćenim kavezima, imaju proizvodnju i u nekom od drugih sustava držanja nesilica (obogaćeni kavezi, stajsko i slobodno držanje). Nakon 30. lipnja 2014. godine navedeni sustavi obvezni su ukoliko farme žele nastaviti proizvodnju. Raspodjela broja nesilica u sustavima obveznim nakon 30. lipnja 2014. godine je sljedeća (**Ministarstvo poljoprivrede, 2014.**):

- obogaćeni kavezi 963.980 životinja,
- slobodni sustav 25.255 životinja,
- stajski sustav 270.416 životinja.

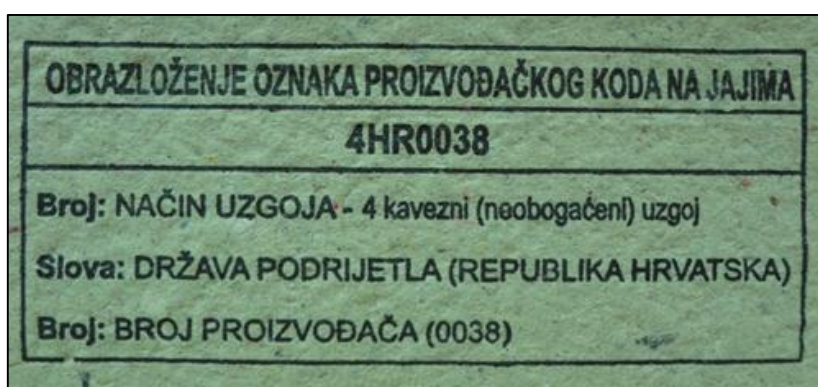
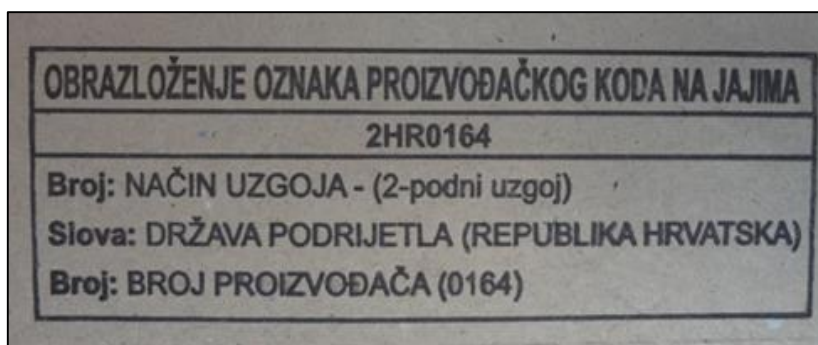
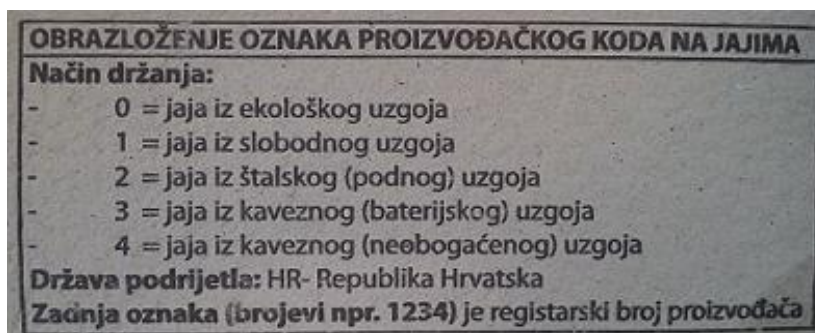
2.2. Kokošja jaja

Prema Pravilniku o kakvoći jaja (**NN 115, 2006.**), *jaja* su kokošja jaja u ljusci dobivena od kokoši nesilica namijenjena prehrani ljudi ili upotrebi u prehrambenoj industriji, a moraju se proizvoditi, pakirati, čuvati i transportirati na način kojim se osigurava očuvanje njihove kakvoće. S obzirom na masu, jaja se dijele u četiri razreda i označavaju s XL (jaja od 73 g i veća), L (jaja od 63 g do 73 g), M (jaja od 53 g do 63 g) i S (jaja manja od 53 g) oznakama na pojedinačnim pakiranjima. Općim odredbama za označavanje jaja Pravilnika određeno je da jaja na tržištu moraju imati oznaku iz koje je vidljiva država podrijetla (za Republiku Hrvatsku – RH), broj proizvođača i podatak o načinu uzgoja peradi izražen brojem, na sljedeći način (Slika 1.):

- „0“ za jaja iz ekološkog (organskog) uzgoja,
- „1“ za jaja iz slobodnog (free-range) uzgoja,
- „2“ za jaja iz štalskog (podnog) uzgoja,
- „3“ za jaja iz kaveznog (baterijskog) uzgoja.

Od 1. srpnja 2014. na jajima i ambalaži postoji i oznaka „4“ koja označava jaja iz kaveznog (neobogaćenog) uzgoja.

U slučaju da se podatak o načinu uzgoja peradi nalazi i na pakiranju jaja, pored odgovarajućeg broja mora postojati i tekstualni opis odgovarajućeg načina uzgoja, npr. „0 – jaja iz ekološkog uzgoja“.



Slika 1. Oznake podrijetla na ambalaži jaja na tržištu Republike Hrvatske (foto: M. Grčević, 2015.)

Zbog jednostavne dostupnosti i značajnog konzumiranja jaja u prehrani ljudi, potrebno je voditi računa o njihovoj zdravstvenoj ispravnosti, kvaliteti i sljedivosti. Budući da se jaja uslijed nepravilnog rukovanja, skladištenja i drugih postupaka prilikom proizvodnje i prerade mogu lako pokvariti i postati izvor zaraze za veliki broj ljudi, važno je znati njihovo podrijetlo kako bi se u budućnosti mogle osigurati mjere koje će onemogućiti nepravilno rukovanje i skladištenje jaja u objektima proizvođača ili trgovaca, odnosno spriječiti moguće buduće probleme vezane uz zdravstvenu ispravnost i sigurnost jaja. U članku 6. Pravilnika o kakvoći jaja navedeno je da na svakoj pošiljci jaja koja izlazi iz

proizvodne jedinice (kao i na pratećoj dokumentaciji) moraju biti navedene sljedeće oznake:

- naziv, adresa i broj proizvodne jedinice,
- broj jaja ili njihova težina,
- datum nesenja,
- datum otpreme.

Prema oznakama navedenima na ambalaži moguće je u svakom trenutku utvrditi podrijetlo jaja.

2.2.1. Građa jaja

Osnovni dijelovi jajeta su ljuska, bjelanjak i žumanjak. Ljuska štiti jaje od vanjskih utjecaja i omogućava izmjenu plinova i prijenos topline. Ispod ljuske nalaze se dvije rožnate opne, jedna priliježe uz ljusku a druga obavija unutarnji sadržaj. Na tupom dijelu jajeta vidljiva je zračna komorica koja nastaje razdvajanjem opni nakon nesenja jaja zbog hlađenja jajeta i skupljanja njegovog sadržaja. Ispod opne nalazi se bjelanjak u tri sloja: vanjski rijetki bjelanjak (20-30%), središnji gusti (57-60%) te unutarnji rijetki bjelanjak (15-17%). Bjelanjak obavija žumanjak kojeg u središtu jajeta drže halaze, spiralne tvorevine gustog bjelanjka (**Kralik i sur., 2008.a**).

Jaja sadrže kvalitetne i lakoprobavljive bjelančevine čija je biološka vrijednost veća od bjelančevina ostalih namirnica. Sastav aminokiselina bjelančevina jaja najbliži je bjelančevinama ljudskog tijela. Biološka vrijednost bjelančevina jaja je 100, jer se sve u potpunosti zadržavaju i iskorištavaju u organizmu (**Mandić, 2007.**). Bjelančevine su najvećim dijelom prisutne u bjelanjku i to ovoalbumin (70%), ovoglobulin, ovomucin, dok ih je u žumanjku znatno manje (ovovitelin i levitin). Najvažnije aminokiseline prisutne u jajetu su cistin, triptofan i lizin, a bitne su za razvoj embrija. Iako jaja sadrže manje bjelančevina od mesa (13% : 15-22%), bjelančevine jaja su važnije jer imaju veću biološku vrijednost (**Mandić, 2007.**). Jaja su također važan izvor esencijalnih masnih kiselina, mineralnih tvari i vitamina nužnih za pravilno funkcioniranje organizma.

Zbog kvalitetnog nutritivnog sastava i prihvatljive cijene njihova je uporaba u prehrani ljudi vrlo česta. Kemijski sastav 100 g jestivog dijela jajeta prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Kemijski sastav 100 g jestivog dijela jajeta

| Sastojak / 100 g jestivog dijela | Jedinica | Svježe jaje | Kuhano jaje |
|-------------------------------------|----------|-------------|-------------|
| Voda | g | 76,15 | 74,62 |
| Energija | kcal | 143 | 155 |
| Bjelančevine | g | 12,56 | 12,58 |
| Ukupne masti | g | 9,51 | 10,61 |
| Ugljikohidrati | g | 0,72 | 1,12 |
| Ukupni šećeri | g | 0,37 | 1,12 |
| Željezo | mg | 1,75 | 1,19 |
| Fosfor | mg | 198 | 172 |
| Kalij | mg | 138 | 126 |
| Natrij | mg | 142 | 124 |
| Vitamin A | µg | 160 | 149 |
| Vitamin E | mg | 1,05 | 1,03 |
| Vitamin D (D2+D3) | µg | 2,0 | 2,2 |
| Vitamin K | µg | 0,3 | 0,3 |
| SFA | g | 3,126 | 3,267 |
| MUFA | g | 3,658 | 4,077 |
| PUFA | g | 1,911 | 1,414 |
| Kolesterol | mg | 372 | 373 |

USDA, National Nutrient Database for Standard Reference Release 26

Energetska vrijednost od prosječno 150 kcal ne čini jaja kaloričnom namirnicom, ali sadržaj kolesterola od 370 mg predstavlja problem, zbog čega je AHA (American Heart Association) 1993. godine preporučila ograničenje konzumacije jaja i unos kolesterola na manje od 300 mg/dan (**Chait i sur., 1993.**). Dugo su na snazi bile preporuke liječnika kardiologa o izbjegavanju jaja u prehrani ljudi, ne bi li se na taj način smanjila razina kolesterola u krvi, odnosno smanjio rizik od nastanka srčanih bolesti. AHA je 2000. godine izdala novo priopćenje u kojem se navodi da hrana bogata kolesterolom, ali s niskim sadržajem zasićenih masnih kiselina, kao što su žumanjci jaja, ima mali utjecaj na razine kolesterola u LDL česticama (**Krauss i sur., 2000.**). Bez obzira na to, AHA i dalje preporučuje unos kolesterola manji od 300 mg/dan, jer su epidemiološki podaci pokazali da je povećani unos kolesterola hranom povezan s porastom rizika od nastanka srčanih bolesti neovisno o razini kolesterola u plazmi (**Qureshi i sur., 2007.**). Različiti autori (**Hu i sur. 1999.; Qureshi i sur., 2007.; Zazpe i sur., 2011.**) istraživali su povezanost konzumacije jaja i rizika od nastanka bolesti srca, krvnih žila te moždanog udara.

Zajednički zaključak je, da konzumacija do 1 jajeta dnevno ne povećava rizik od nastanka bolesti srca, krvnih žila ili moždanog udara kod zdravih ljudi.

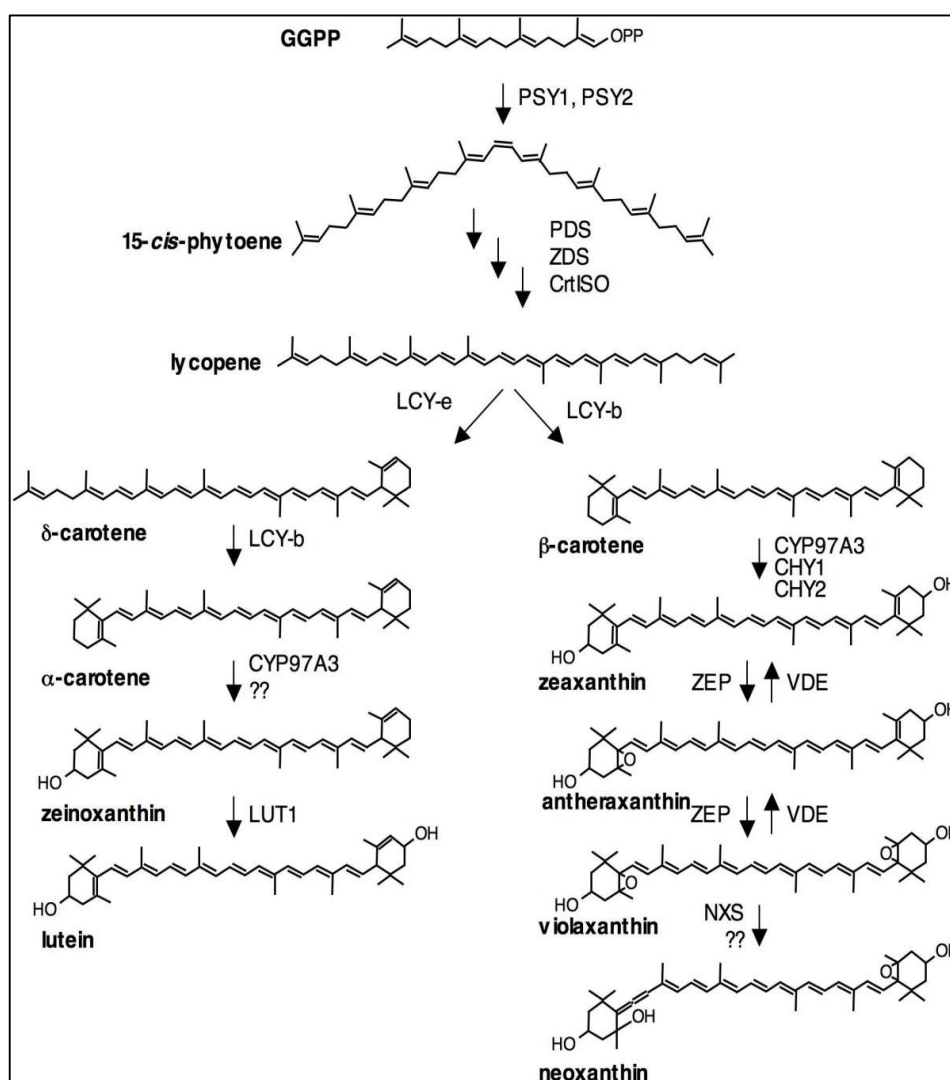
2.3. Karotenoidi

Karotenoidi obuhvaćaju velik broj spojeva prisutnih u okolišu. To su u mastima topljivi obojeni pigmenti koji imaju različite uloge u staničnoj biologiji. Ime su dobili prema kristalima (β -karoten) koje je Wachenroder 1831. izolirao iz mrkve i nazvao ih „karoten“. Polarnije pigmente žute boje izolirane iz jesenskog lišća Berzelius (1837.) je nazvao ksantofilima. Richard Willstatter 1907. utvrdio je empirijsku formulu karotenoida (C₄₀), a Tswett 1911. uporabom naprednijih tehnika kromatografije odvojio je velik broj pigmenata kojima je dao zajedničko ime „karotenoidi“ (**Johnson, 2007.**). Od prvog pojašnjenja strukture β -karotena u dvadesetim godinama prošlog stoljeća (1928.-1930.), koju su predstavili Richard Kuhn te Paul Karrer, do 2004. otkriveno je oko 750 različitih karotenoida (**Maoka, 2009.**). Oko 50 karotenoida čine sastavni dio ljudske prehrane (**Khachik, 2006.**), dok ih je svega 20-ak prisutno u ljudskoj krvi i tkivima (**Rao i Rao, 2007.**). Najčešći i najznačajniji su: likopen, lutein, α -karoten, β -karoten, β -kriptoksantin i zeaksantin (**Stahl i Sies, 1996.**). U prirodi ih sintetiziraju fotosintetski organizmi (biljke i mikroorganizmi) i neke ne-fotosintetske eubakterije.

Većina karotenoida u hrani potječe od obojenog povrća, voća i sokova. Osim toga, manje količine mogu se dobiti iz mlijeka i hrane koja sadrži mliječnu mast, žumanjaka jaja, morske ribe i iz hrane u koju su karotenoidi dodani kao bojila tijekom prerade. Animalni izvori karotenoida, kao što su mliječni proizvodi i žumanjak, imaju promjenjiv sadržaj karotenoida, što se uglavnom može pripisati razlikama u sadržaju pigmenata u hrani za životinje. Godišnje doba može utjecati na sadržaj karotenoida u mlijeku, budući da krave apsorbiraju više karotenoida iz ljetne ispaše nego iz zimske hrane (**Rock, 1997.**).

2.3.1. Struktura karotenoida

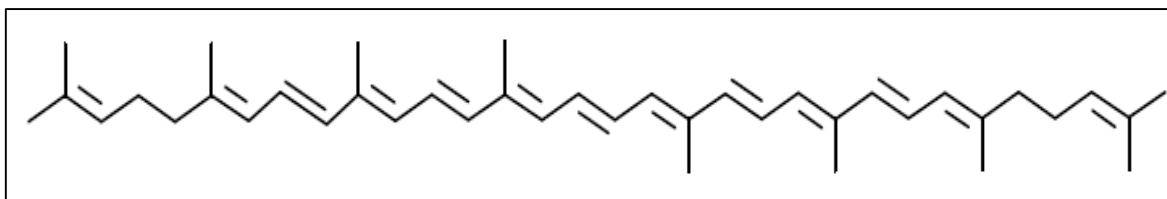
Karotenoidi su izoprenoidni spojevi koji nastaju međusobnim povezivanjem dvije C₂₀ geranilgeranil difosfat (GGPP) molekule. Na taj način stvara se C₄₀ ugljikov kostur iz kojeg se izvide sve ostale strukturne varijacije. Dalje se, aktivnošću različitih enzima, biosintetiziraju karotenoidni spojevi (Slika 2.)



Slika 2. Biosinteza karotenoida (*Diretto i sur., 2006.*)

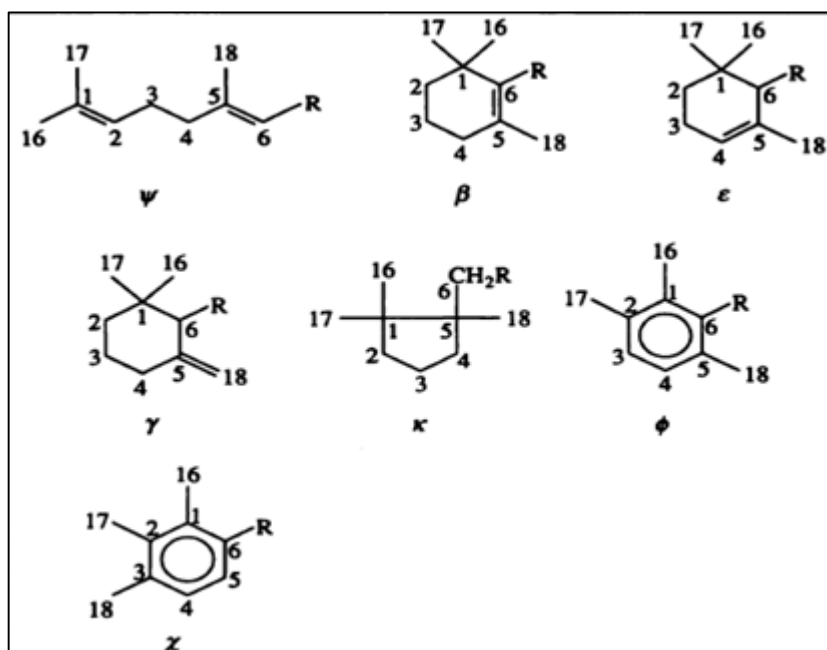
Većina karotenoida sadrži 40 ugljikovih atoma (C_{40}) iako se mogu razlikovati po duljini lanca. Karotenoidi sadrže 9-13 konjugiranih dvostrukih veza (većina u all-trans poziciji) i upravo je ta konjugiranost odgovorna za njihovu funkcionalnost. S obzirom na postojanje cis/trans konfiguracija moguće je velik broj različitih izomera, ali zbog uvjeta planarnosti (ravnine) molekule izomerni potencijal je značajno ograničen. Iako postoji nekoliko stabilnih cis molekula, njihovo stvaranje je obično onemogućeno zbog prostornih smetnji metilnih skupina tijekom rotacije (**Johnson, 2007.**).

Osnovna struktura karotenoida prikazana je pomoću molekule likopena $C_{40}H_{56}$, koji je najjednostavniji predstavnik skupine (Slika 3.).



Slika 3. Likopen – najjednostavniji predstavnik C₄₀ karotenoidnih spojeva – osnovna struktura (Fiedor i Burda, 2014.)

Osnovna struktura karotenoida može se promijeniti na različite načine: stvaranjem prstenaste strukture na jednom ili oba kraja molekule, pri čemu nastaje 7 različitih krajnjih skupina (Slika 4.), promjenama u stupnju hidrogenacije (zasićenja veze) te dodatkom funkcionalnih skupina koje sadrže kisik (Britton, 1995.). Karotenoidi koji sadrže jednu ili više kisikovih funkcionalnih skupina nazivaju se ksantofilima, dok su osnovni ugljikovodici poznati kao karoteni.



Slika 4. Sedam različitih krajnjih skupina karotenoida (Britton, 1995.)

Najznačajnije obilježje strukture karotenoida je dugi sustav izmjeničnih jednostrukih i dvostrukih veza koje tvore središnji dio molekule. Na taj način stvoren je konjugirani sustav u kojem su π -elektroni delokalizirani cijelom dužinom polienskog lanca (nisu vezani uz određeni ugljikov atom ili kovalentnu vezu) te upravo zbog toga karotenoidi kao skupina imaju jedinstven molekularni oblik, kemijsku reaktivnost i svojstva apsorpcije svjetlosti (Britton, 1995.).

2.3.2. Biodostupnost karotenoida

Zbog loše topljivosti karotenoida, njihova biodostupnost niža je u odnosu na druge sastojke topljive u mastima, kao što su α -tokoferol i triacilgliceroli (**Richelle i sur., 2004.**; **Maiani i sur., 2009.**). Da bi stanice crijeva mogle upiti karotenoide, oni se moraju otopiti u probavnoj tekućini (**Yonekura i Nagao, 2007.**). Karotenoidi se prvo moraju „osloboditi“ iz hrane, a taj proces je otežan kod nekih vrsta hrane. Karotenoidi se teško oslobađaju iz sirovog povrća zbog čvrste strukture stanične stijenke, ali prerada i toplinska obrada ubrzavaju njihovo otpuštanje zbog uništavanja stanične strukture (**Rock i sur., 1998.**) i utječu na slabljenje veza između karotenoida i bjelančevina ili otapanje kristalnih kompleksa karotenoida (**Parker, 1996.**). Slobodni karotenoidi moraju se dobro raspršiti u probavnom sustavu, što je često ograničeno zbog visoke hidrofobnosti C40 izoprenoidnog ugljikovog kostura. U tom slučaju lipidi iz hrane olakšavaju raspršenje karotenoida. Karotenoidi se otapaju u lipidima iz hrane i tada raspršuju u obliku emulzije u probavnu tekućinu. Probava lipida iz hrane u emulziji nastavlja se uz pomoć lipolitičkih enzima i žučne tekućine te se karotenoidi na kraju otapaju u miješanoj miceli (**Kotake-Nara i Nagao, 2011.**). Miješana micela sastoji se od fosfolipida, kolesterola, slobodnih masnih kiselina, monoacilglicerola, i žučnih soli (**Reboul, 2013.**). Smatra se da karotenoidi otopljeni u miješanoj miceli postaju dostupni za unos u epitelne stanice crijeva.

2.3.2.1. Apsorpcija, prijenos i pohranjivanje karotenoida u organizmu

Apsorpcija i metabolizam karotenoida jako se razlikuju između životinjskih vrsta. Kod ljudi i nekoliko drugih sisavaca (npr. neki primati, tvor, govedo) stanice sluznice crijeva mogu apsorbirati značajnu količinu karotenoida koji se kasnije nepromijenjeni pojavljuju u krvotoku i perifernim tkivima. Kod glodavaca se karotenoidi s provitaminskom aktivnošću pretvaraju u vitamin A u sluznici crijeva ili se izluče probavom pa su i njihove koncentracije u plazmi vrlo niske i raspodjela u tkivima se ne može usporediti s onom kod ljudi (**Rock, 1997.**).

Apsorpcija karotenoida odvija se u sluznici crijeva. Dugo se pretpostavljalo da se apsorpcija karotenoida odvija pasivnom difuzijom, s koncentracijskim gradijentom između količine karotenoida u miješanoj miceli i staničnoj membrani (**Parker, 1996.**). Međutim, naknadnim istraživanjima utvrđeno je postojanje različitih membranskih transportera koji

prenose karotenoide u stanice crijeva, odnosno omogućuju olakšanu difuziju (**Reboul i sur., 2005.**). Prvi pronađen je SR-BI (Scavenger Receptor class B type I) (**Lobo i sur., 2001.**), za kojeg je utvrđeno da ima ulogu u crijevnoj apsorpciji luteina (**Reboul i sur., 2005.**), β -karotena (**Van Bennekum i sur., 2005.**), zeaksantina (**During i sur., 2008.**) i likopena (**Moussa i sur., 2008.**).

Brojni čimbenici utječu na apsorpciju karotenoida u organizmu što je definirano pojavom tih spojeva ili njihovih metabolita u limfnoj ili krvnoj cirkulaciji ili poboljšanjem statusa vitamina A u onih jedinki koje mogu iskoristiti karotenoide kao prekursore vitamina A. Učinkovitost apsorpcije karotenoida obično je relativno mala (<30%) a postotak apsorbiranih karotenoida značajno se smanjuje s porastom njihovog unosa putem hrane (**Olson, 1994.**). Sadržaj masti u hrani ima značajan učinak na apsorpciju karotenoida. Poznato je da se karotenoidi apsorbiraju samo u prisustvu konjugiranih žučnih soli, a mast stimulira izlučivanje žučnih soli te na taj način utječe na poboljšanje apsorpcije. *In vitro* istraživanja pokazala su da je za apsorpciju karotenoida važna veličina micela kako bi crijevne stanice mogle „upiti“ karotenoide (**Olson, 1994.**). Neki sastojci hrane imaju negativan učinak na apsorpciju karotenoida. Prehrambena vlakna smanjuju bioraspoloživost makronutrijenata, posebno masti, te na taj način utječu i na apsorpciju spojeva topljivih u mastima. Tako je pokazano da pektin utječe na smanjenje apsorpcije β -karotena (**Rock i Swendseid, 1992.**), alginati uzrokuju lošu bioraspoloživost fukoksantina iz morskih algi (**Kotake-Nara i Nagao, 2011.**) a druga vlakna topljiva u vodi inhibiraju apsorpciju β -karotena i luteina u modelnim stanicama crijeva (**Yonekura i Nagao, 2009.**). Samo jedan dio dostupnih karotenoida unese se u stanice crijeva i izluči u limfu u obliku hilomikrona koji dalje cirkuliraju u krvotoku. Nakon što lipoproteinske lipaze razgrade hilomikrone, jetra preuzima karotenoide iz ostataka hilomikrona. Karotenoidi se tada skladište u jetri ili ponovno izlučuju kao lipoproteini vrlo niske gustoće (VLDL) u krvotok, a zatim dalje raznose cirkulacijom u obliku lipoproteina niske gustoće (LDL). Na kraju tkiva upijaju karotenoide putem LDL receptora. Jako hidrofobni karotenoidi, kao što su β -karoten i likopen, smješteni su u unutaršnjem dijelu LDL-a, dok su manje hidrofobni ksantofili, kao lutein i zeaksantin, ravnomjerno raspoređeni između LDL-a i HDL-a, i nalaze se na vanjskoj površini lipoproteinskih čestica (**Yeum i Russell, 2002.**).

Glavna skladišna tkiva karotenoida su masno tkivo (posebno zbog svog volumena) i jetra, iako su oni pronađeni i u plućima, bubrezima, vratu maternice, prostati i većini drugih tkiva. Visoke koncentracije karotenoida pronađene su u tkivima koja su bogata LDL

receptorima, kao što su žuto tijelo, tkivo nadbubrežne žlijezde i testisi, što je vjerojatno posljedica nespecifičnog unosa lipoproteinima. Makula (žuta pjega) oka je posebno bogata luteinom i zeaksantinom, ali ne i drugim karotenoidima, a koncentracija ta dva spoja podjednaka je u ovom tkivu. Taj omjer se značajno razlikuje od onog u krvotoku gdje koncentracija luteina uvelike premašuje koncentraciju zeaksantina (**Rock i sur., 1997.**).. Općenito, koncentracija karotenoida u tkivima izravno odražava prehrambeni unos tih spojeva, povećavajući se s povećanim unosom i smanjujući s nedostatnim unosom. Zbog toga karotenoidi plazme mogu služiti kao biomarkeri unosa povrća i voća (glavni prehrambeni izvori). Iako je glavni fokus većine prehrambenih istraživanja na ljudima promjena koncentracije karotenoida u plazmi ili serumu, također rastu i njihove koncentracije u perifernim tkivima kao rezultat uzimanja tih spojeva ili konzumiranja hrane bogate karotenoidima.

2.3.3. Biološke funkcije i aktivnosti karotenoida

U fotosintetskim organizmima, kao što su biljke, karotenoidi imaju funkcionalnu ulogu u fotosintezi i zaštiti od svjetla (**Krinsky, 1994.**). Glavni pigmenti uključeni u fotosintezu su klorofili i karotenoidi. U biljkama karotenoidi djeluju kao pomoćni pigmenti koji apsorbiraju svjetlosnu energiju, a zatim tu energiju prenose na klorofil za uporabu u fotosintezi (**Demming-Adams i sur., 1996.**). Karotenoidi djeluju također kao neutralizatori UV svjetla, štiteći biljke od fotooksidacije i njenih štetnih učinaka, sprječavajući oštećenje stanica djelovanjem singletnog kisika. Fotosinteza u atmosferi kisika bila bi nemoguća bez karotenoida. Karotenoidi su u fotosintetskim tkivima smješteni uz klorofil kako bi ga zaštitili od fotooksidativnog oštećenja (**Delgado-Vargas i sur., 2000.**). Osim u fotosintezi, biljni karotenoidi služe i kao pigmenti koji zajedno s antocijanima i betalainima daju boju cvijeću, voću pri dozrijevanju i drugim dijelovima biljaka. Takvi karotenoidi mogu se pronaći u suncokretu, nevenu, bananama, breskvama, narančama, rajčicama, paprikama, dinjama i kukuruzu.

Glavna uloga karotenoida u ljudi i životinja je funkcija prekursora vitamina A (**Kenneth, 2000.**). Karotenoidi s aktivnošću provitamina A ključne su komponente ljudske prehrane, apsorbiraju se kroz prehranu i često metaboliziraju u druge spojeve. Prehrambeni karotenoidi, uključujući i one koji nemaju aktivnost provitamina A, uključeni su u zaštitu

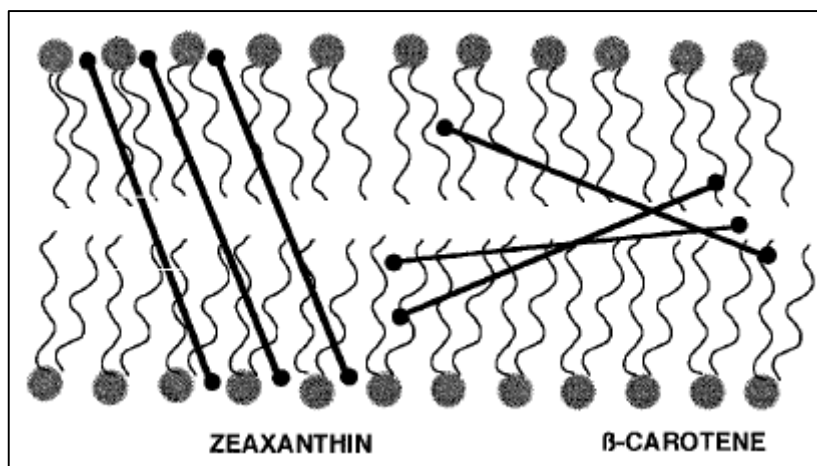
od određenih oblika karcinoma, kardiovaskularnih i neuroloških bolesti (**Fiedor i Burda, 2014.**).

Iako se karotenoidi razlikuju po strukturi ipak ih možemo smatrati jednom skupinom spojeva kad su u pitanju osnovne kemijske i fizikalne osobine.

Karotenoidi su izrazito hidrofobne molekule (slabo ili potpuno netopljive u vodi) te se u tkivima nalaze u hidrofobnim područjima stanice kao što su unutarnje strane membrana (**Fiedor i Burda, 2014.**). U slučaju povezanosti s bjelančevinama omogućen im je pristup vodenom okolišu. Polarne funkcionalne skupine omogućuju karotenoidima interakciju s drugim polarnim molekulama i sudjelovanje u reakcijama u vodenom substaničnom mediju ili na membrani. Budući da su vrlo hidrofobni, karotenoidi pokazuju snažnu sklonost međusobnom povezivanju i kristalizaciji u vodenom mediju. Povezivanje mijenja fizikalna svojstva karotenoida, npr. apsorpciju svjetla i kemijsku reaktivnost te topljivost, čime utječe na apsorpciju i bioraspoloživost kod životinja kao i sposobnost uklapanja i funkcioniranja u substaničnim strukturama (**Britton, 1995.**).

2.3.3.1. Karotenoidi u membranama

U biološkim sustavima karotenoidi rijetko postoje kao slobodne molekule, već su uglavnom povezani s proteinima ili lipoproteinskim strukturama, odnosno sastavni su dio složene membranske strukture. Položaj i orijentacija molekule karotenoida u lipidnom dvosloju ovisi o strukturi i svojstvima pojedinog karotenoida ali i o sastavu i strukturi membrane. Čisti ugljikovodici, kao što su β -karoten i likopen, smješteni su unutar hidrofobne jezgre membrane, paralelno s površinom, i zadržavaju određen stupanj pokretljivosti (**Britton, 1995.**). Ako molekula karotenoida sadrži polarnu funkcionalnu skupinu, kao što je hidroksi skupina, tada ona utječe na orijentaciju karotenoida. U slučaju diola (dvije OH skupine), kao što su astaksantin i zeaksantin, javlja se međudjelovanje između hidroksi skupina na prstenovima karotenoida i polarnih glava fosfolipida koje čine dvosloj, pri čemu se molekula orijentira okomito na lipidni dvosloj i u potpunosti „premošćuje“ membranu (Slika 5.). Stoga su i reakcije s njihovim konjugiranim dvostrukim C=C vezama moguće po cijeloj dubini membrane (**Young i Lowe, 2001.**). Takvi karotenoidi mogu povećati krutost i mehaničku čvrstoću membrane (**Lazrak i sur., 1987.**).



Slika 5. Položaj različitih karotenoida u membrani (Young i Lowe, 2001.)

Položaj molekule u membrani ima jak utjecaj na reakcije različitih karotenoida s, primjerice, peroksi radikalima. Beta-karoten i likopen mogu učinkovito reagirati samo s radikalima koji su stvoreni u hidrofobnom, unutarnjem dijelu membrane, dok zeaksantin i lutein, koji svojim krajnjim skupinama prodiru u polarnom zonu i izloženi su vodenoj okolini, također reagiraju sa slobodnim radikalima koji nastaju u vodenoj fazi. Stoga neki karotenoidi mogu biti učinkovitiji od drugih u antioksidativnoj zaštiti membrana (Woodall i sur., 1997.).

2.3.3.2. Kemija karotenoida

Svojstva i funkcije karotenoida ovise prije svega o strukturi same molekule. Konjugirani sustav dvostrukih veza je najvažniji čimbenik u reakcijama karotenoida kao što su, na primjer, prijenos energije u fotosintezi i reakcije sa slobodnim radikalima (Young i Lowe, 2001.). Karotenoidni polienski lanac osjetljiv je na napade radikala, jer je zbog delokalizacije π -elektrona to područje molekule bogato elektronima. Zbog delokaliziranih elektrona karotenoidi su pogodni za stabiliziranje reaktivnih međuprodukata, kao što su karbokationi ili radikali. Delokalizirani elektroni primarno su odgovorni za brzu oksidativnu razgradnju karotenoida nakon izlaganja čak i malim količinama kisika (npr. nakon pročišćavanja), Johnson (2007.). U staničnim organelama i membranama karotenoide od oksidacije štiti povezanost s bjelančevinama, mastima i drugim susjednim molekulama. Čak i uz takvu prirodnu biološku zaštitu karotenoidi su osjetljivi na oksidativno oštećenje ako postanu izloženi oksidirajućim tvarima ili slobodnim radikalima (posebno superoksidu i peroksidu). U mnogim reakcijama oksidacije karotenoid se raspada

na manje dijelove, pri čemu je uobičajeni znak raspada karotenoida gubitak njihove boje (**Britton, 1995.**). Kad se karotenoid nađe u blizini singletnog kisika i međusustavni prijenos viška kisikove energije na karotenoid bude neuspješan, singletni kisik može izravno napasti karotenoid („žrtveno vezanje“). Oksidacija krajnjih prstenova molekula karotenoida također utječe na njihovu sposobnost antioksidativnog djelovanja te u mnogo slučajeva povećava njihovu sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Oksidacijom krajnjih prstenova sprječava se napad radikala na nekonjugirane dvostruke veze u prstenu ili hidroksilne skupine (**Johnson, 2007.**).

2.3.3.3. Karotenoidi kao antioksidansi

Ljudski organizam izložen je različitim prooksidansima koji su sposobni oštetiti biološki važne molekule kao što su DNK, bjelančevine, ugljikohidrati i masti (**Halliwell, 1996.**). Mnoge ozbiljne ljudske bolesti, uključujući rak i srčane bolesti, u određenom stadiju uključuju oksidativne procese posredovane slobodnim radikalima. Da bi molekula karotenoida bila učinkovit antioksidans, morala bi ukloniti te radikale iz sustava reakcijom s njima i stvaranjem bezopasnih produkata ili prekidanjem lančanih reakcija slobodnih radikala. Antioksidativno djelovanje molekule karotenoida ovisi o njenoj strukturi, ali i o svojstvima oksidirajućih spojeva (**Young i Lowe, 2001.**). Karotenoidi mogu biti učinkoviti antioksidansi u organskim otopinama pod definiranim uvjetima, no koncentracija karotenoida u životinjskom i ljudskom tkivu obično je mnogo manja od onih koje se koriste za dokazivanje antioksidativne aktivnosti u modelnim sustavima (**Britton, 1995.**). Karotenoidi su u obrambenim reakcijama najčešće uključeni u deaktiviranje dva reaktivna kisikova spoja, singletni molekularni kisik ($^1\text{O}_2$) i peroksil radikal. Također učinkovito deaktiviraju pobuđene molekule uključene u stvaranje radikala i singletnog kisika (**Young i Lowe, 2001.**). Međudjelovanje karotenoida s $^1\text{O}_2$ uvelike ovisi o fizičkom „hvatanju“, koje uključuje izravan prijenos energije između molekula. Energija singletnog molekularnog kisika prenosi se na molekulu karotenoida, čime nastaje osnovno stanje kisika i tripletni pobuđeni karotenoid. Umjesto daljnjih kemijskih reakcija karotenoid se vraća u osnovno stanje raspršujući energiju u međudjelovanju s okolnim otapalom. Budući da karotenoidi ostaju netaknuti tijekom fizičkog hvatanja singletnog kisika ili pobuđenih molekula, mogu se nekoliko puta ponovno koristiti u ciklusima hvatanja (**Stahl i Sies, 2003.**). Učinkovitost karotenoida za fizičko hvatanje povezano je s brojem konjugiranih dvostrukih veza prisutnih u molekuli, koje određuju njihovu najnižu razinu tripletne

energije. Beta-karoten i strukturno slični karotenodi imaju razine tripletne energije blizu energiji singletnog kisika, čime se omogućuje prijenos energije. Uz β -karoten učinkoviti hvatači singletnog kisika su, također, i zeaksantin, kriptoksantin te α -karoten, a svi su prisutni u ljudskom serumu i tkivima (**Stahl i Sies, 2003.**). Među raznim radikalima koji se stvaraju pod oksidativnim uvjetima u organizmu karotenoidi najučinkovitije reagiraju s peroksil radikalima. Oni se stvaraju u procesu lipidne oksidacije, a deaktiviranje tih spojeva prekida slijed reakcije, što u konačnici vodi do oštećenja u lipofilnim odjeljcima. Zbog lipofilnosti i specifične sposobnosti hvatanja peroksilnih radikala, karotenoidi imaju važnu ulogu u zaštiti staničnih membrana i lipoproteina od oksidativnog oštećenja (**Sies i Stahl, 1995.**).

2.3.3.4. Apsorpcija svjetla i fotokemijska svojstva karotenoida

Kad organska molekula apsorbira svjetlosnu energiju nastaje višeenergetsko, pobuđeno stanje te molekule. U slučaju karotenoida, jedan od veznih π elektrona sustava konjugiranih dvostrukih veza promaknut je u prethodno slobodnu π^* antiveznu orbitalu. Pi elektroni vrlo su delokalizirani i pobuđeno stanje je relativno niske energije, stoga je energija potrebna da dođe do prijelaza relativno mala i odgovara svjetlosti u vidljivom području u rasponu valnih duljina od 400 do 500 nm. Zbog toga su karotenoidi intenzivno žute, narančaste ili crvene boje (**Britton, 1995.**). Karotenoidi imaju sposobnost otpuštanja viška energije u okoliš u obliku topline. To im ujedno omogućava i apsorpiranje energije pobuđenih molekula, kao što su singletni kisik i tripletni klorofil, čime se sprječava oštećenje bjelančevina, DNK i fotosintetskog sustava. U fotosintetskom tkivu karotenoidi imaju ključnu ulogu u organizaciji svakog fotosustava, regulirajući intenzitet dolazne i odlazne svjetlosti. Vrlo su učinkoviti u apsorpciji i prijenosu energije. Karotenoidi mogu re-emitirati energiju do susjedne molekule klorofila (na taj način šireći apsorpcijski spektar fotosistema) ili mogu bezopasno otpustiti energiju u okoliš u obliku topline (**Johnson, 2007.**).

U biološkim sustavima izloženost svjetlu dovodi do stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva koji su štetni za biomolekule i utječu na stabilnost substaničnih struktura, stanica i tkiva (**Stahl i Sies, 2002.**). Fotooksidativni procesi imaju ulogu u patološkim procesima vezanim uz neke bolesti tkiva izloženih svjetlu, kao što su oči i koža. Makularna degeneracija je glavni uzrok nepovratne sljepoće među starijom populacijom u zapadnom svijetu a utječe

na žutu pjegu (macula lutea) mrežnice, područje najveće vidne oštine (**Landrum i Bone, 2001**). Lutein i zeaksantin su pigmenti odgovorni za boju tog tkiva dok drugi karotenoidi kao likopen, α -karoten ili β -karoten nisu pronađeni u žutoj pjegi. Zaštita od fotooksidativnih procesa povezana je s antioksidativnom aktivnošću makularnih karotenoida te njihovom učinku filtriranja svjetla. Učinkovitost karotenoida u filtriranju plavog svjetla istraživana je u jednoslojnim liposomima (**Junghans i sur., 2001.**). Liposomi su umetnuti u hidrofилni prostor jezgre s fluorescentnom bojom koju aktivira plavo svjetlo, a različiti karotenoidi su smješteni u lipofilne membrane. Fluorescencija je bila niža u liposomima koji su sadržavali karotenoide nego u kontrolnima pri izloženosti plavom svjetlu, ukazujući na filtracijski učinak. U ovom modelu lutein i zeaksantin pokazali su bolju učinkovitost filtriranja od β -karotena ili likopena. Pretpostavlja se da je veća učinkovitost luteina i zeaksantina u filtriranju plavog svjetla posljedica razlika u položaju molekula unutar liposomske membrane. Takve razlike mogu također biti razlog zašto se lutein i zeaksantin mogu ugraditi u membrane u većim količinama od drugih karotenoida kao što su β -karoten i likopen. Kad je koža izložena UV svjetlu početna reakcija je crvenilo kože (eritem). Postoje dokazi *in vitro* i *in vivo* istraživanja da β -karoten sprječava fotooksidativna oštećenja i štiti od nastanka opekline od sunca (erythema solare), navode **Stahl i Sies (2002.)**. Kad se β -karoten primjenjuje sam ili u kombinaciji s α -tokoferolom tijekom 12 tjedana, stvaranje eritema izazvanog simulatorom sunčevog svjetla znatno je smanjeno od 8. tjedna nadalje (**Stahl i sur., 2000.**). Takvi zaštitni učinci postižu se također i unosom karotenoida hranom pri čemu je konzumacija paste rajčice u količini koja odgovara dozi od 16 mg likopena/danu tijekom 10 tjedana uzrokovala porast razine likopena u serumu i ukupnih karotenoida u koži (**Stahl i sur., 2001.**). Stvaranje eritema bilo je značajno niže u skupini koja je konzumirala pastu rajčice, u usporedbi s kontrolom. Stoga se zaštita od eritema uzrokovanih UV svjetlošću može postići promjenom prehrane.

2.3.4. Karotenoidi u hranidbi peradi

Ptice uglavnom dobro apsorbiraju karotenoide koji sadrže kisik. Učinkovitost apsorpcije karotenoida iz hrane ovisi o mnogim čimbenicima, a apsorpcija u crijevima određuje cijeli proces. Apsorpcija karotenoida kod sisavaca može se podijeliti u četiri faze: probava hrane, stvaranje lipidnih miješanih micela, unos karotenoida u stanice sluznice crijeva i izlučivanje u plazmu putem limfnog sustava (**Williams i sur., 1998.**). Budući da u ptica

limfni sustav nije razvijen, pretpostavka je da se karotenoidi transportiraju direktno do jetre i drugih tkiva putem portomikrona (lipoproteini bogati mastima koje stanice crijeva otpuštaju u portalnu venu) (Surai i sur., 2001.). U prirodi se karotenoidi pojavljuju u slobodnom (alkoholnom) obliku ili esterificirani. Stoga je hidroliza estera karotenoida djelovanjem gušteračinih esteraza važan korak u njihovoj apsorpciji. Diester luteina iz hrane hidrolizira se uglavnom u lutein, koji se apsorbira kroz stijenku crijeva u krvotok te se u serumu oko 90% ukupnog luteina pojavljuje kao slobodni alkohol, a ostatak u obliku monoestera (Tyczkowski i Hamilton, 1986.). Posljedica toga je nakupljanje luteina u žumanjcima jaja kokoši hranjenih diesterom luteina. Glavni izvori karotenoida u hranidbi peradi u Europi su kukuruz, proizvodi od kukuruza, lucerna, brašno lucerne i komercijalni koncentraciji, uključujući neven i papriku (Nys, 2000.). Većina navedenih krmiva sadrži uglavnom lutein i zeaksantin plus β -karoten (brašno lucerne) i β -kriptoksantin (kukuruz i kukuruzni gluten). Glavna razlika između američke hranidbe bazirane na kukuruzu i europske hranidbe bazirane na pšenici i ječmu je u sadržaju karotenoida (lutein+zeaksantin), koji je više nego dvostruko veći u hrani na bazi kukuruza (Surai i Sparks, 2001.a). Ta se razlika javlja zbog niskog sadržaja karotenoida u pšenici i ječmu iako oba krmiva sadrže lutein i zeaksantin kao glavne karotenoide. Nakon unosa hrane, djelovanjem probavnih enzima dolazi do otpuštanja karotenoida iz hrane. Slobodni karotenoidi zajedno s drugim mastima iz hrane emulgiraju se u prisustvu žučnih soli i stvaraju uljne kapljice. Dalje se, djelovanjem lipaza, uljne kapljice razgrađuju i stvaraju miješane micela. Hidrofobne jezgre micela sadrže nepolarne masti, kao što su kolesterol i oksikarotenoidi, koje se dijele između uljne i micelarne faze. U ptica razgradnja masti počinje u želucu, gdje su žučne soli i lipaze gušterače odgovorne za hidrolizu oko 30% triglicerida iz hrane (Sklan i sur., 1978.). Emulgiranje masti iz hrane ubrzava se kako se himus (polutekuća masa djelomično probavljene hrane izbačena iz želuca u duodenum) pomiče u tanko crijevo i miješa sa sekretima žuči i gušterače. Glavno mjesto apsorpcije masti u ptica je jejunum, iako se dio apsorpcije odvija i u ileumu (Hurwitz i sur., 1973.). Na učinkovitost raspršivanja karotenoida utječe prisutnost ili odsustvo drugih komponenti hrane, kao i opće stanje uhranjenosti životinje. Topljive bjelančevine i peptidi iz hrane mogu pomoći u raspršivanju karotenoida. Masti u hrani omogućuju prijenos karotenoida iz želuca u crijeva te su izvor nekih proizvoda probave koji sudjeluju u stvaranju micela. Količina i kvaliteta masti iz hrane imaju veliki utjecaj na izlučivanje žuči i stvaranje micela i stoga na efikasnost apsorpcije karotenoida u tankom crijevu. Istraživanja su pokazala da je količina masti potrebna za optimalnu apsorpciju luteina u crijevima puno veća nego u

slučaju vitamina E te α - i β -karotena, za čiju je uspješnu apsorpciju potrebna ograničena količina masti (**Roodenburg i sur., 2000.**). Rezultati istraživanja **Hollandera (1981.)** pokazala su da prisutnost masnih kiselina različitih duljina lanca i stupnja zasićenja značajno utječe na brzinu apsorpcije karotenoida. Kratkolančane zasićene masne kiseline i dugolančane nezasićene masne kiseline poboljšavaju apsorpciju luteina kod pilića (**Hamilton, 1992.**).

U posljednje vrijeme sve je veći ekonomski značaj ksantofila u bojenju kože brojlera i žumanjka jaja. Poznato je da se na intenzitet i boju može utjecati količinom i vrstom upotrijebljenog ksantofila. **Breithaupt (2007.)** navodi da u hranidbi nesilica i u žumanjku jaja smije biti prisutno osam ksantofila, i to: kapsantin (E 160c), β -Apo-8'-karotenol (E 160e), β -Apo-8'-karotenska kiselina etil ester (E 160f), lutein (E 161b), kriptoksantin (E 161c), kantaksantin (E 161g), zeaksantin (E 161h) i citranaksantin (E 161i). Najveća dopuštena koncentracija navedenih ksantofila u hrani za nesilice može biti 80 mg/kg, s izuzetkom kantaksantina, koji smije biti dodan u količini od 8 mg/kg. Uporaba kantaksantina u prevelikim koncentracijama dovodi do stvaranja kristala u mrežnici oka i oštećenja očnih tkiva (**Baker, 2001.**). Zbog bolje pigmentacijske učinkovitosti, u usporedbi s primjerice citranaksantinom, kantaksantin je još uvijek najčešće korišteni crveni pigment u hranidbi peradi. Kapsantin je prirodni crveni pigment koji se proizvodi mljevenjem osušene crvene paprike. Nedostatak mu je što utječe na pojavu crvenkaste nijanse u žumanjcima i što se u hrani peradi mora koristiti u količinama i 3,5 puta većima nego, na primjer, sintetski kantaksantin. Zbog toga je uporaba sintetskih crvenih ksantofila, kao što je kantaksantin, još uvijek široko prihvaćena i rasprostranjena (**Breithaupt, 2007.**). Lutein je najčešći ksantofil u većini zelenih lisnatih biljaka (špinat, blitva) i laticama cvijeća (kadifca, neven). Dobiva se nakon fermentacije i sušenja latica ekstrakcijom s organskim otapalima, koja se naknadno uklone destilacijom. Lutein je žuti pigment koji se najčešće ne dodaje sam u hranu za perad, jer može prouzročiti zelenkastu nijansu žumanjka, već u kombinaciji s narančastim i crvenim ksantofilima. Da bi se dobio isti pigmentacijski efekt, lutein iz kadifce mora se dodati u 6 puta većim koncentracijama u usporedbi sa β -apo-8'-karotenolom (**Breithaupt, 2007.**).

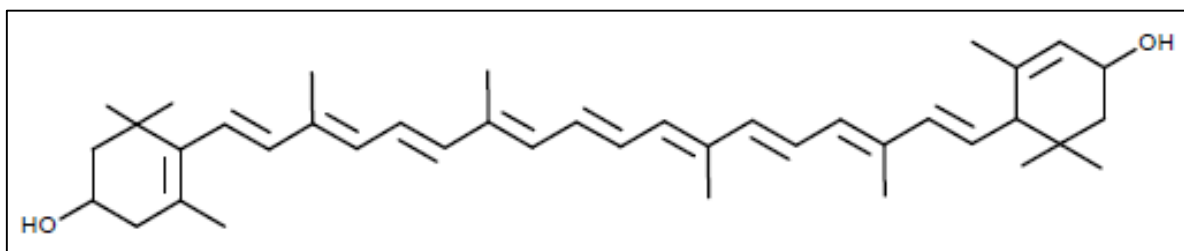
2.3.5. Karotenoidi u žumanjku jajeta

Koncentracija karotenoida u žumanjku jajeta ovisi o njihovom sadržaju u hrani. **Surai i sur. (1998.a)** proveli su istraživanje u kojem su kokoši hranjene komercijalnom smjesom na bazi pšenice i ječma, pri čemu je koncentracija karotenoida u žumanjcima jaja bila 10,8-12,6 $\mu\text{g/g}$. Slična koncentracija karotenoida (13,3 $\mu\text{g/g}$) zabilježena je u žumanjcima jaja kokoši nesilica hranjenih smjesom na bazi pšenice, ječma i soje (**Surai i Speake, 1998.**). Nasuprot tome, **Strand i sur. (1998.)** zabilježili su znatno manju koncentraciju karotenoida (1,4 $\mu\text{g/g}$) u žumanjcima kad su kokoši hranjene smjesom na bazi pšenice i ječma, što se još dodatno smanjilo na 0,2-0,4 $\mu\text{g/g}$ pri hranidbi posebno dizajniranim smjesama s niskim sadržajem karotenoida. Dodatkom algi u hranu nesilica značajno je povećana koncentracija karotenoida u žumanjku (4,8-8,0 $\mu\text{g/g}$). U pokusu **Hamiltona i Parkhursta (1990.)**, u kojem su kokoši tri tjedna konzumirale hranu s niskim sadržajem karotenoida s ciljem smanjenja koncentracije karotenoida u žumanjku na 1,9 $\mu\text{g/g}$, naknadnim dodatkom saponificiranog oleoresina nevena (koji je osiguravao 70 mg luteina po kg hrane) povećana je koncentracija karotenoida u žumanjku na 45,4 $\mu\text{g/g}$, a istovremeni dodatak ulja sjemenki pamuka dodatno je povećao koncentraciju karotenoida u žumanjku na 80,9 $\mu\text{g/g}$. Koncentracija karotenoida zabilježena u žumanjku kokoši hranjenih hranom na bazi kukuruza iznosila je 24-30 $\mu\text{g/g}$ (**Surai i sur., 1998.b; Handelman i sur., 1999.**). **Surai i Sparks (2001.a)** navode da je koncentracija karotenoida u žumanjku bila 32 $\mu\text{g/g}$ kada su kokoši hranjene hranom na bazi kukuruza, u usporedbi s 15,2 $\mu\text{g/g}$ u žumanjcima jaja kokoši hranjenih hranom na bazi pšenice i ječma. Zanimljivo je da jaja pura, pataka i gusaka hranjenih hranom na bazi kukuruza sadrže mnogo manje karotenoida (19,6; 17,3 i 14,6 $\mu\text{g/g}$) nego kokošja jaja, odražavajući specifičnost vrsta u apsorpciji karotenoida i njihovom prijenosu u žumanjak (**Surai i sur., 1998.b**). Iako je opće prihvaćeno da je sastav karotenoida u žumanjku posljedica njihovog sastava u hrani, mnoge vrste ptica imaju sposobnost kemijske modifikacije i selektivnog odlaganja pigmenta (**Brush, 1990.**). Kao rezultat brojnih eksperimenata s različitim izvorima karotenoida zaključeno je da boja žumanjka potječe od relativno nespecifičnog odlaganja oksikarotenoida. Za odlaganje je potrebno da oksikarotenoid posjeduje funkcionalne skupine koje sadrže kisik, kao što su hidroksil, keto ili esterske skupine, koje pružaju umjereno polarna svojstva (**Marusich i Bauernfeind, 1981.**). Budući da ugljikovodični karotenoidi, kao što je β -karoten, ne posjeduju takve funkcionalne skupine i ne odlažu se u žumanjku kokošnjih jaja u značajnim količinama, pretpostavka je da se β -karoten u organizmu peradi u potpunosti pretvara u

vitamin A ili na drugi način metabolizira te stoga ne doprinosi boji žumanjka jaja (**Hencken, 1992.**).

2.4. Lutein

Lutein je biljni pigment koji zajedno sa svojim izomerom zeaksantinom pripada ksantofilskoj skupini karotenoida. Ksantofili sadrže dvije hidroksilne skupine, po jednu na svakom kraju molekule, zbog čega je i njihova polarnost veća u odnosu na druge karotenoide (**Golzar Adabi i sur., 2010.**). Zbog prisustva hidroksilnih skupina na terminalnim prstenima, lutein nema provitaminsku aktivnost (vitamin A) u ljudskom organizmu, što je vjerojatno i razlog zašto je njegova potencijalna uloga u ljudskom zdravlju dugo bila zanemarivana (**Granado i sur., 2003.**). Na Slici 6. prikazana je strukturna formula luteina.



Slika 6. Strukturna formula luteina (**Fiedor i Burda, 2014.**)

Kao i drugi karotenoidi, lutein je topljiv u mastima te se u crijevima ugrađuje u hilomikrone koji ga prenose do jetre. Više od 50% luteina u krvi prenose lipoproteini velike (HDL) gustoće, dok je ostatak podijeljen između lipoproteina male (LDL) i vrlo male gustoće (VLDL) gustoće (**Wang i sur., 2007.**). Ljudski organizam ne može sintetizirati karotenoide i stoga ih je potrebno unositi hranom. Lutein se u prirodi nalazi u slobodnom obliku ili u obliku mono- ili diestera (hidroksilne skupine esterificirane slobodnim masnim kiselinama) (**Granado i sur., 2003.**). Lutein i zeaksantin najzastupljeniji su u tamnozelenom lisnatom povrću, kao što su špinat, kelj, raštika, salata, ali i u paprikama, mandarinama, kukuruzu i žumanjku jajeta (**Sommerburg i sur., 1998.**). Pročišćeni kristalni lutein je žuto-narančaste boje, što u zelenom lisnatom povrću nije vidljivo zbog maskirajućeg djelovanja klorofila (**Alves-Rodrigues i Shao, 2004.**).

Prosječan sadržaj luteina u pojedinim namirnicama prikazan je u Tablici 3.

Tablica 3. Prosječan sadržaj luteina u nekim namirnicama

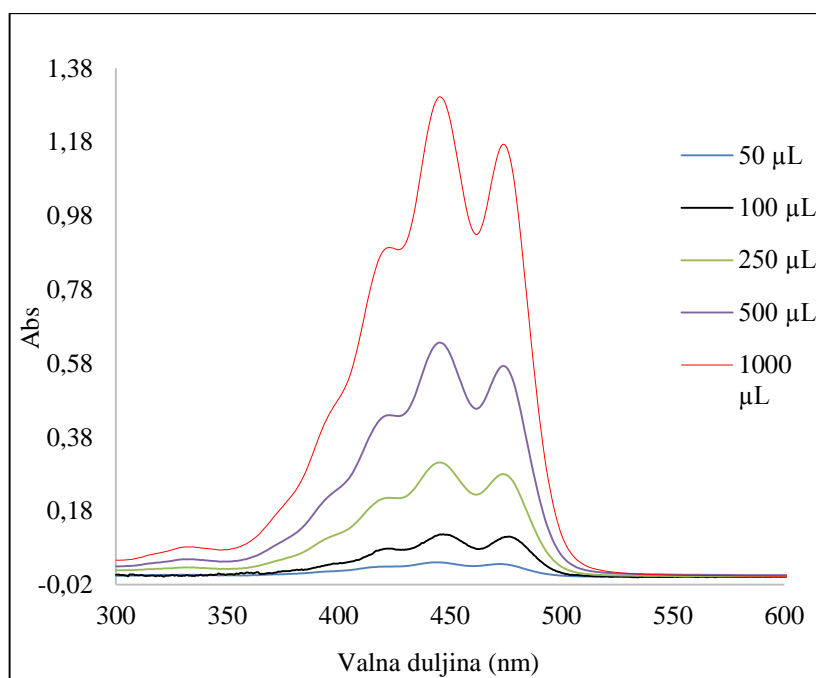
| Namirnica | Sadržaj luteina (mg/100 g jestivog dijela) | Izvor |
|-----------------------------|---|--|
| Špinat | 8,95 | Hamuška i sur., 2005. Perry i sur., 2009. USDA |
| | 6,60 | |
| | 12,20* | |
| Špinat, kuhani | 12,64 | Perry i sur., 2009. USDA |
| | 11,31* | |
| Kupus Savoy | 6,89 | Hamuška i sur., 2005. |
| Kelj, kuhani | 8,88 | Perry i sur., 2009. USDA |
| | 18,25* | |
| Salata romaine | 3,82 | Perry i sur., 2009. USDA |
| | 2,31 | |
| Salata butterhead | 1,65 | Hamuška i sur., 2005. USDA |
| | 1,22* | |
| Brokula | 1,97 | Hamuška i sur., 2005. USDA |
| | 1,40* | |
| Brokula, kuhana | 0,77 | Perry i sur., 2009. USDA |
| | 1,08* | |
| Tikvice, sirove | 1,14 | Hamuška i sur., 2005. USDA |
| | 2,13* | |
| Tikvice, kuhane | 1,36 | Perry i sur., 2009. USDA |
| | 1,15* | |
| Žumanjak (kavezni uzgoj) | 1,07 | Hamuška i sur., 2005. Perry i sur., 2009. USDA |
| | 0,92 | |
| | 1,09* | |
| Jaje | 0,42 | Hamuška i sur., 2005. Perry i sur., 2009. USDA |
| | 0,34 | |
| | 0,50* | |

*USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26; rezultati iskazani kao zbroj sadržaja luteina i zeaksantina

Iako žumanjak jajeta nije najbolji prehrambeni izvor luteina, njegova bioiskoristivost u ljudskom organizmu veća je iz žumanjka, u usporedbi s biljnim izvorima ili dodacima prehrani (**Chung i sur., 2004.**). Lutein se u žumanjku jajeta nalazi u topljivom lipidnom matriksu, koji se sastoji od kolesterola, triacilglicerola i fosfolipida, zajedno s drugim mikronutrijentima topljivim u mastima, kao što su vitamini A, D i E (**Golzar Adabi i sur., 2010.**). Pretpostavlja se da upravo sadržaj kolesterola, kao i sastav masnih kiselina jaja, utječu na poboljšanu iskoristivost i povećanje sadržaja luteina u serumu ljudi (**Chung i sur., 2004.**).

2.4.1. Lutein i zdravlje ljudi

Lutein i njegov izomer zeaksantin jedinstveni su u odnosu na druge karotenoide u ljudskom organizmu, jer su u najvećim koncentracijama prisutni u specifičnim tkivima oka. Lutein i zeaksantin gusto su koncentrirani u žutoj pjegi (*macula lutea*), malom području mrežnice odgovornom za centralni vid i visoku vidnu oštrinu te su jedini karotenoidi prisutni u ovom tkivu (**Landrum i Bone, 2001.**). Isti je slučaj i s očnom lećom gdje su lutein i zeaksantin također jedini prisutni karotenoidi (**Gao i sur., 2011.**). Njihov sadržaj u pigmentu žute pjege premašuje njihove odgovarajuće razine u serumu nekoliko tisuća puta). Lutein je koncentriran u perifernom dijelu mrežnice i vidnim štapićima, dok je zeaksantin sastavni dio čunjića žute pjege (**Bone i sur., 1988.**). Zajedno čine pigment žute pjege (makularni pigment). U očnim tkivima djeluju kao antioksidansi i učinkoviti filtri visokoenergetske plave svjetlosti (**Krinsky, 2002.**). Plava svjetlost je najviši energetski oblik vidljive svjetlosti i poznato je da uzrokuje fotooksidativna oštećenja stvarajući reaktivne kisikove spojeve. Reaktivni kisikovi spojevi nastaju u mrežnici zbog potrošnje kisika, kao i pretvorbe visokoenergetske svjetlosti fotona u elektrokemijske signale (**Panfoli i sur., 2012.**). Jedna od najvažnijih uloga luteina u mrežnici je djelovanje kao hvatač slobodnih radikala kisika pri uvjetima oksidativnog stresa. To mu omogućuje njegova kemijska struktura, odnosno dvije hidroksilne skupine koje privlače reaktivne kisikove spojeve (**Landrum i sur., 2012.**). Nadalje, lutein selektivno apsorbira plavu svjetlost jer mu je vrhunac apsorpcije u spektru na 446 nm (Slika 7.). Plava svjetlost uzrokuje 100 puta više oštećenja u usporedbi s narančastom svjetlošću, ovisno o vremenu izloženosti. Stoga je lutein, zahvaljujući svojim sposobnostima filtriranja, učinkovit u sprječavanju oštećenja fotoreceptora djelovanjem plave svjetlosti (**Nilsson i sur., 2003.**). Najveća koncentracija fotoreceptora odgovornih za centralni vid i oštrinu vida nalazi se u žutoj pjegi. Karakteristična boja žute pjege potječe u potpunosti od luteina i zeaksantina. Prisutnost karotenoida sposobnih za apsorpciju plave svjetlosti u žutoj pjegi, prije svega luteina, govori o njihovoj zaštitnoj ulozi. Makularna degeneracija uzrokovana starošću (Age-related Macular Degeneration - AMD) vodeći je uzrok sljepoće kod ljudi iznad 65 godina u razvijenom svijetu. Prvo istraživanje koje je pokazalo direktnu povezanost između unosa luteina i rizika od nastanka AMD-a proveli su **Seddon i sur. (1994.)**. Autori su utvrdili najjaču povezanost između luteina i zeaksantina i smanjenog rizika od AMD-a, odnosno da su pojedinci koji imaju smanjen unos luteina u većoj opasnosti od razvoja AMD-a.



Slika 7. Apsorpcijski spektar luteina – maksimum apsorpcije na 446 nm (izvor: M. Grčević, 2015)

Istraživanje **Curran-Celentano i sur. (2001.)** pokazalo je pozitivnu povezanost između razine luteina u serumu ili hrani i gustoće makularnog pigmenta, sugerirajući da prehrambeni izvori luteina mogu utjecati na sadržaj luteina u očnim tkivima, odnosno zaštitnu ulogu luteina iz seruma i hrane protiv AMD-a. Lutein i zeaksantin su jedini karotenoidi prisutni u očnoj leći (**Gao i sur., 2011.**), gdje također pokazuju zaštitnu ulogu od nastanka očnih mrena. Mrena nastaje kao posljedica taloženja bjelančevina očne leće, a pod utjecajem oksidativnih oštećenja, što rezultira oštećenjem vida ili sljepoćom. Lutein, zahvaljujući svojim antioksidativnim svojstvima, smanjuje fototoksično oštećenje bjelančevina i DNK leće (**Roberts i sur., 2008.**) te utječe na smanjenje lipidne peroksidacije u očnim lećama dijabetičara (**Barker, 2010.**).

U novije vrijeme sve se više istražuje utjecaj luteina u održavanju kognitivnih funkcija odraslih kao i njegova uloga u razvoju živčanog sustava kod djece. Lutein je najzastupljeniji karotenoid u mozgu. Kod odraslih čini 31% od ukupnog sadržaja karotenoida (**Johnson, 2013.**), dok je kod djece njegov udio veći i iznosi 59% (**Vishwanathan i sur., 2014.**), što upućuje na moguću dodatnu ulogu luteina u ranom razvoju mozga. Istraživanja su pokazala značajnu povezanost između sadržaja luteina i zeaksantina u žutoj pjegi (makularni pigment) i moždanom tkivu, pri čemu se makularni pigment može koristiti kao mjera sadržaja pigmenta u moždanom tkivu. To je važno jer je

utvrđena pozitivna povezanost između gustoće makularnog pigmenta (**Renzi i sur., 2008.**), odnosno sadržaja luteina u moždanom tkivu (**Johnson i sur., 2013.**) i općih kognitivnih funkcija kod starijih ljudi. Nadalje, istraživanje **Johnson i sur. (2008.)**, u kojem su starije žene (60-80 godina) tijekom četiri mjeseca konzumirale dodatke luteina (12 mg/dan), dokozaheksaenske kiseline (DHA, 800 mg/dan) ili njihovu kombinaciju, pokazalo je značajno poboljšanje fluentnosti govora kod ispitanica u svim navedenim skupinama. Pamćenje i brzina učenja značajno su se poboljšali kod ispitanica u skupini s kombinacijom luteina i DHA, kod kojih je također primijećen i trend učinkovitijeg učenja. S obzirom na navedeno vjerojatno je da lutein može pozitivno utjecati na kognitivne funkcije kod odraslih ljudi. Kod novorođenčadi lutein značajno povećava antioksidativnu aktivnost u serumu (**Perrone i sur., 2010.**), što je posebno važno u ranom neonatalnom razdoblju, gdje oksidativni stres ima ključnu ulogu u razvoju patoloških stanja. Antioksidansi su nužni u mrežnici i mozgu posebno zbog velike brzine metabolizma tih organa. Budući da u mozgu novorođenčeta nedostaju urođeni antioksidativni enzimi (**Buonocore i sur., 2001.**) i da su membrane neurona bogate polinezasićenim masnim kiselinama, koje su jako podložne oksidaciji, prisutnost antioksidansa, poput luteina, u takvim uvjetima je od velikog značaja. Nadalje, podatak o dvostruko većem sadržaju luteina u mozgu djece u odnosu na odrasle (59% : 31%), te o najvećoj koncentraciji u odnosu na druge karotenoide prisutne u mozgu djece (**Vishwanathan i sur., 2014.**) upućuje na potrebu za luteinom tijekom razvoja živčanog sustava.

Utjecaj luteina na zdravlje kože tema je brojnih istraživanja. Koža i oči jedini su organi ljudskog tijela stalno podložni utjecajima okoliša, prije svega sunčevom zračenju. Poznato je da UV zračenje uzrokuje oštećenje kože, ali istraživanja su pokazala da i vidljiva svjetlost utječe na stvaranje slobodnih radikala u koži (**Jurkiewicz-Lange i Buettner, 2001.**). Budući da vidljiva svjetlost može prodrijeti kroz sve slojeve kože (**Moan, 2001.**) i uzrokovati štetu u njima stvarajući slobodne radikale, potrebno je osigurati zaštitu kože i od valnih duljina vidljive svjetlosti, posebno visokoenergetske plave svjetlosti (400-500 nm). Potvrđena je prisutnost luteina u ljudskoj koži kao rezultat unosa hranom (**Hata i sur., 2000.**), kao i povezanost sadržaja luteina u krvnoj plazmi i koži (**Peng i sur., 1995.**). Pretpostavlja se da lutein u koži djeluje na isti način kao i u očima, apsorbirajući valne duljine plave svjetlosti (**Landrum i Bone, 2001.**). Istraživanja na životinjama pokazala su zaštitnu ulogu luteina od štetnog djelovanja UV svjetlosti na kožu (smanjen otok i zadebljanje kože) (**González i sur., 2003.**), kao i utjecaj na smanjenje upale i

imunosupresije u koži uzrokovanih UV zračenjem (**Lee i sur., 2004.**). Prvo istraživanje koje se bavilo učinkovitošću luteina i zeaksantina u zaštiti kože ljudi objavljeno je 2002. godine (**Morganti i sur., 2002.**). U istraživanju je sudjelovalo 30 žena (48-59 godina) koje su tijekom 8 tjedana konzumirale antioksidativni kompleks u obliku kapsula koje su osiguravale 6 mg luteina i 0,18 mg zeaksantina dnevno. Rezultati su pokazali značajno smanjenje lipidne peroksidacije u koži već nakon 2 tjedna istraživanja te dodatno smanjenje tijekom cijelog razdoblja istraživanja, što je vjerojatno rezultat antioksidativnog djelovanja karotenoida. Osim toga, sadržaj vlage u koži je porastao također već nakon 2 tjedna i nastavio rasti do kraja istraživanja. U drugom istraživanju proučavan je utjecaj samo luteina i zeaksantina u koži u obliku oralnih pripravaka (**Palombo i sur., 2007.**). U istraživanju je sudjelovalo 40 žena, dobi 25-50 godina, sa znakovima prijevremenog starenja kože. Jednoj skupini ispitanica dva puta dnevno davane su kapsule s po 5 mg luteina i 0,3 mg zeaksantina, dok je druga skupina dobivala placebo kapsule, tijekom 12 tjedana. Nakon provedenog istraživanja rezultati su pokazali smanjenje lipidne peroksidacije za 56%, poboljšanje hidracije kože za više od 2 puta, sadržaja lipida u koži za 4 puta, elastičnosti kože za 17% i poboljšanje fotozaštitne aktivnosti 3 puta, u usporedbi s ispitanicama iz placebo skupine. Navedeni rezultati u skladu su s istraživanjima provedenima na životinjama i kulturama stanica te pokazuju da oralna primjena luteina i zeaksantina poboljšava zdravlje kože i može pomoći u smanjenju štetnih učinaka izloženosti sunčevoj svjetlosti.

Brojna istraživanja pokazuju da karotenoidi, između ostalih posebno lutein, mogu imati ključne fiziološke uloge i usporiti razvoj ateroskleroze. Tako su **Martin i sur. (2000.)** otkrili da se djelovanjem luteina na endotelne stanice učinkovito smanjuje ekspresija adhezijskih molekula, poznatih biomarkera u patogenezi ateroskleroze. **Dwyer i sur. (2001.)** istraživali su povezanost između razina luteina u serumu i razvoja debljine intime-medije (IMT - Intima-Media Thickness) karotidnih arterija kod 480 muškaraca i žena srednje dobi tijekom 18 mjeseci. Mjerenje debljine intime-medije koristi se kako bi se dijagnosticirale rane promjene na stijenkama karotida (zadebljanja, aterosklerotske naslage), čime se može utjecati na faktore rizika od razvoja bolesti srca i moždanog udara. Rezultati su pokazali da se povećanje debljine intime-medije odvija znatno brže kod ispitanika s najnižom razinom luteina u serumu, dok kod onih s najvišom razinom luteina nije došlo do povećanja debljine stijenke karotida. **Zou i sur. (2011.)** također su utvrdili obrnutu povezanost između razine luteina u serumu i debljine intime-medije karotidne

arterije. Kod ispitanika sa znakovima rane ateroskleroze razina luteina u serumu bila je značajno manja nego u kontrolnih ispitanika. Autori zaključuju da bi visoke razine luteina u serumu mogle pozitivno djelovati na odgodu pojave ranih simptoma ateroskleroze. U istraživanju koje su proveli **Koh i sur. (2011.)** utvrđeno je da je visoka razina luteina u serumu povezana sa smanjenim rizikom od akutnog infarkta miokarda kod kineskog stanovništva. Utjecaj dodatka luteina u koncentracijama od 10 i 20 mg/dan na pokazatelje povezane s bolestima srca i krvnih žila kod zdravih nepušača istraživali su **Wang i sur. (2013.)**. Istraživanje je provedeno na ukupno 117 ispitanika (20-80 godina), podijeljenih u kontrolnu i dvije pokusne skupine, u trajanju od 12 tjedana. Određivani su sljedeći pokazatelji: koncentracija luteina u plazmi, ukupni antioksidativni kapacitet (TAOC), profil lipoproteina, aktivnost antioksidativnih enzima, koncentracije malondialdehida (oksidacija lipida) i karbonila (oksidacija proteina) u plazmi te koncentracija C reaktivnog proteina (CRP), koji je izravni pokazatelj povećanog rizika od nastanka bolesti srca i krvnih žila. Zabilježeno je značajno povećanje koncentracije luteina u plazmi te ukupnog antioksidativnog kapaciteta u obje pokusne skupine te značajno smanjenje koncentracije MDA u pokusnoj skupini s 20 mg luteina u odnosu na početak istraživanja. Koncentracija CRP-a smanjivala se s porastom primijenjene doze luteina te je utvrđena značajna korelacija između smanjenja koncentracije CRP-a i povećanja koncentracije luteina u plazmi i ukupnog antioksidativnog kapaciteta. Iz svega navedenog autori zaključuju da povećani antioksidativni kapacitet, kao rezultat suplementacije luteinom, može ublažiti upalne procese te naposljetku smanjiti rizik od bolesti srca i krvnih žila.

2.5. Obogaćivanje jaja luteinom

Jaje je moguće obogatiti luteinom dodatkom izvora luteina u hranu nesilica. Dva istraživanja o učinkovitosti transfera luteina iz hrane nesilica u jaje proveli su **Leeson i Caston (2004.)**. U prvom istraživanju nesilice su hranjene smjesom na bazi kukuruza i soje u koju je dodan lutein u udjelima od 0, 125, 250, 375, 500, 625, 750 i 1000 mg/kg. U drugom istraživanju nesilice su hranjene s tri različite smjese. Prva smjesa bila je na bazi kukuruza i soje, usporediva sa smjesom u prvom istraživanju. U drugu smjesu uključen je kukuruzni gluten i lucerna te dodano kukuruzno ulje umjesto životinjske/biljne masti. Treća smjesa sadržavala je mljeveno laneno sjeme. U smjese je dodan lutein u udjelima od 0, 125, 250 i 500 mg/kg. Rezultati istraživanja pokazali su da smjese nisu utjecale na

proizvodnju jaja, masu jaja, konzumaciju hrane ili kvalitetu ljuske ($P>0,05$). U sklopu prvog istraživanja, s porastom sadržaja luteina u smjesi rastao je i sadržaj luteina u jajima ($P<0,01$), iako se efikasnost prijenosa luteina iz smjese u jaja naglo smanjivala s porastom sadržaja luteina u hrani. Najprimjetniji porast sadržaja luteina u jajima javio se već kod početnog dodatka 125 mg/kg luteina u smjesu, dok je najveća razina obogaćenja postignuta dodatkom 500 mg/kg luteina. Autori su primijetili da nije bilo razlike u sadržaju luteina u jajima pri dodatku luteina u udjelima od 375 do 1000 mg/kg u smjese ($P>0,05$). Sadržaj luteina u žumanjku povećan je s 0,16 mg/60 g jajeta (0 mg/kg) na 1,17 mg/60 g jajeta pri 125 mg/kg luteina u hrani, odnosno na 1,49 mg/60 g jajeta pri dodatku 500 mg/kg luteina u hranu. Vrijednosti boje žumanjka značajno su povećane već nakon sedam dana hranidbe nesilica obogaćenom smjesom, a dodatak luteina u udjelu višem od 250 mg/kg nije utjecao na daljnje povećanje vrijednosti boje. Rezultati drugog istraživanja pokazali su da je dodatak kukuruznog glutena i lucerne pogodovao odlaganju luteina u jajima, dok je uključivanje lanenog sjemena u smjese djelomično smanjilo odlaganje luteina, što autori smatraju zabrinjavajućim, jer je sve veći naglasak na proizvodnji jaja istovremeno obogaćenih različitim funkcionalnim sastojcima. Analiza jaja pokazala je povećanje sadržaja luteina s 0,18 mg/60 g jajeta (0 mg/kg) na 1,65 mg/60 g jajeta dodatkom 500 mg/kg luteina u skupini sa smjesom na bazi kukuruza i soje. Uključivanje kukuruznog glutena i lucerne u smjesu razina luteina povećala se s 0,29 mg/60 g jajeta na 2,04 mg/60 g jajeta (500 mg/kg). U skupini nesilica kojima je u smjesu dodano i laneno sjeme također je primijećen porast sadržaja luteina s 0,24 mg/60 g jajeta (0 mg/kg) na 1,39 mg/60 g jajeta (500 mg/kg), iako je obogaćivanje bilo manje u odnosu na prethodne dvije skupine. Najveće obogaćivanje žumanjka zabilježeno je u skupini nesilica hranjenih smjesom s kukuruznim glutenom i lucernom i dodatkom 500 mg/kg luteina. Međutim, efikasnost transfera luteina u žumanjak također je bila vrlo niska pri dodatku viših razina luteina u hranu. Autori zaključuju da je moguće povećati sadržaj luteina u jajima 5 do 8 puta iznad uobičajenih vrijednosti i da takva obogaćena jaja mogu značajno doprinijeti ljudskoj prehrani.

Leeson i sur. (2007.) istraživali su utjecaj dugotrajnog dodatka luteina u kombinaciji s mljevenim sjemenkama lana u hranu na performanse nesilica, pokazatelje kvalitete jaja i odlaganje luteina u jajima i tkivima. Nesilice su hranjene smjesama s 0 ili 10% mljevenih lanenih sjemenki i tri razine luteina (0, 125 i 250 mg/kg) tijekom 11 uzastopnih 28-dnevnih razdoblja. Lutein dodan u smjesu nije utjecao na konzumaciju hrane, proizvodnju jaja,

masu jaja ili deformaciju ljuske. Dodatkom luteina u smjese značajno su porasle vrijednosti boje žumanjka ($P < 0,01$) kao i sadržaj luteina u jajima ($P < 0,01$). Vrijednosti boje maksimalno su porasle s dodatkom 125 mg/kg luteina, dok se sadržaj luteina u jajima povećao i pri dodatku 250 mg/kg luteina. Zanimljiv je podatak da se sadržaj luteina u jajima linearno povećavao u skupini nesilica hranjenih s 10% lanenog sjemena (sa 114, 1385 na 1727 μg /jajetu za 0, 125 i 250 mg/kg luteina u hrani), dok je u skupini bez lanenog sjemena maksimum zabilježen pri dodatku 125 mg/kg luteina u hranu (90, 1671 i 1610 μg /jajetu za 0, 125 i 250 mg/kg luteina u hrani), bez daljnjeg povećanja sadržaja luteina u jajima. Autori su uspjeli povećati sadržaj luteina u jajima s 0,10 mg na 1,60 mg/60 g jajeta što je predstavljalo gotovo dvostruko povećanje u odnosu na tadašnji unos luteina kod stanovnika Sjeverne Amerike. **Golzar Adabi i sur. (2010.)** također su istraživali utjecaj luteina u hrani nesilica na sadržaj luteina u jajima. U smjese na bazi kukuruza i soje dodavali su 0, 250, 500 i 750 mg/kg luteina. Sadržaj luteina u žumanjcima jaja značajno je porastao već nakon 7 dana hranidbe ($P < 0,01$). Najznačajniji porast zabilježen je pri dodatku 250 mg/kg luteina (s 0,12 mg/57 g jajeta na 1,35 mg/57 g jajeta), dok je najveći sadržaj luteina u žumanjcima zabilježen pri dodatku 750 mg/kg luteina (1,43 mg/57 g jajeta) u hranu. Zabilježen je i značajan porast vrijednosti boje žumanjka, također već nakon 7 dana hranidbe. Rezultati svih navedenih autora pokazuju da je hranidbom nesilica smjesama obogaćenim luteinom moguće povećati sadržaj luteina u žumanjku jaja, iako je odlaganje usporeno uz dodatak više od 250-375 mg/kg luteina u hrani te da je potrebno voditi računa o izvorima ulja/masti u hrani nesilica.

Hammershøj i sur. (2010.) istraživali su utjecaj dodatka tri obojene (narančasta, žuta i ljubičasta) sorte mrkve u količini od 70 g/danu/nesilici standardnoj hrani na odlaganje karotenoida u žumanjku i neke pokazatelje kvalitete jaja. Hranidba je trajala 28 dana. Dodatkom mrkve smanjen je unos hrane za 8-11 g u svim skupinama s mrkvom, što je također uzrokovalo značajno nižu masu jaja u tim skupinama u odnosu na kontrolnu. Najveći sadržaj luteina zabilježen je u ljubičastoj sorti mrkve ($6,5 \pm 0,2$ mg/kg), zatim u standardnoj hrani ($2,9 \pm 0,4$ mg/kg), žutoj ($1,9 \pm 0,1$ mg/kg) te narančastoj ($1,7 \pm 0,1$ mg/kg) sorti mrkve. Unos luteina bio je najveći uz dodatak ljubičaste mrkve, dostižući razinu od 0,8 mg/danu/nesilici. Autori zaključuju da uporaba obojenih sorti mrkvi kao krmnog materijala u hranidbi nesilica povećava koncentraciju ukupnih karotenoida u žumanjcima jaja za 25-75%, u odnosu na jaja nesilica koje nisu hranjene mrkvom. Promatrajući pojedine karotenoide u žumanjku, sadržaj luteina porastao je za 64%, a sadržaj β -karotena

100 puta. Ljubičasta sorta mrkvi sadržavala je najviše koncentracije i luteina i β -karotena pa je zbog toga imala značajno najveći utjecaj na sadržaj karotenoida u žumanjcima jaja.

Jeon i sur. (2012.) proveli su pokus u kojem su nesilicama u hranu dodali prah zelene alge *Chlorella* u udjelima od 0, 0,5, 1 ili 2%. Hranidba pokusnim smjesama trajala je 4 tjedna, nakon čega je slijedilo razdoblje od 2 tjedna u kojem nesilice nisu dobivale *Chlorella* prah u hrani. Već nakon prvog tjedna hranidbe primijećeno je povećanje sadržaja luteina u žumanjcima jaja svih pokusnih skupina u odnosu na kontrolnu. Nakon četiri tjedna hranidbe u skupini s 2% *Chlorella* praha zabilježen je najveći sadržaj luteina, a iznosio je 27,04 $\mu\text{g/g}$ žumanjka u odnosu na 13,88 $\mu\text{g/g}$ u kontrolnoj skupini. Autori zaključuju da je za proizvodnju jajeta obogaćenog luteinom potrebno najmanje dva do tri tjedna hranidbe s *Chlorella* prahom kako bi se osigurala najveća moguća ugradnja luteina u žumanjak jajeta.

Jang i sur. (2014.) hranili su nesilice tijekom pet tjedana kontrolnom smjesom i smjesama u koje su dodali komercijalni lutein (40 mg/kg) te sirovi ekstrakt špinata otopljen u uljima s lecitinom, u kojem je koncentracija luteina također bila 40 mg/kg hrane. Sadržaj luteina porastao je u obje pokusne skupine. U skupini s komercijalnim luteinom zabilježeno je otprilike četiri puta više luteina nego u kontrolnoj skupini. Iako nisu utvrđene statistički značajne razlike između pokusnih skupina, u skupini s komercijalnim luteinom zabilježen je veći sadržaj luteina te manja varijabilnost prosječnog sadržaja luteina u žumanjcima nego u skupini s ekstraktom špinata. Takvi rezultati sugeriraju da komercijalni lutein omogućuje učinkovitiji i ravnomjerniji prijenos luteina u žumanjak od ekstrakta špinata kod kokoši nesilica.

Wu i sur. (2009.) istraživali su bioiskoristivost slobodnog i esterificiranog oblika luteina u hranidbi nesilica. Nesilice su hranjene smjesama koje su sadržavale 15 mg slobodnog ili esterificiranog luteina/kg smjese kroz 14 dana. Istraživanje je pokazalo da se koncentracija luteina u plazmi nesilica značajno povećala ($P < 0,05$) u obje skupine već nakon tri dana hranidbe pri čemu su koncentracije luteina u plazmi nesilica bile veće u skupini sa slobodnim luteinom (1,90 $\mu\text{g/ml}$) u odnosu na esterificirani lutein (1,47 $\mu\text{g/ml}$). Objašnjenje ovih rezultata moglo bi biti u činjenici da se slobodni lutein iz hrane lakše apsorbira u crijevima u odnosu na esterificirani lutein, koji se prvo treba hidrolizirati prije apsorpcije u krvotok. Sedmog dana istraživanja nije bilo razlike u razinama luteina u plazmi kod nesilica koje su u hrani dobivale slobodni lutein u odnosu na treći dan. Međutim u skupini s esterificiranim luteinom razina luteina u plazmi nesilica bila je različita ($P < 0,05$) sedmi u odnosu na treći dan (1,77 $\mu\text{g/ml}$ 7. dan u odnosu na 1,47 $\mu\text{g/ml}$

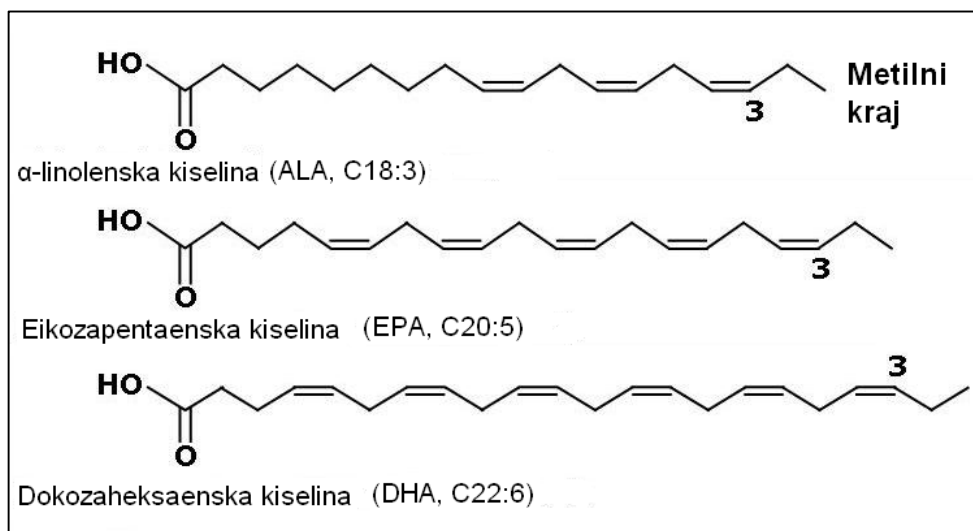
3. dan). 14. dana nisu zabilježene razlike ($P>0,05$) između vrijednosti luteina u plazmi u odnosu na sedmi dan u oba tretmana. Autori zaključuju da oba oblika luteina dodanog u hranu nesilica povećavaju razinu luteina u plazmi na usporedivu razinu, ali predlažu uporabu esterificiranog oblika luteina u proizvodnji jaja obogaćenih luteinom zbog njegove bolje stabilnosti u odnosu na slobodni lutein.

Jaje je moguće, pored luteina, istovremeno obogatiti i s drugim funkcionalnim sastojcima, kako su pokazali **Surai i sur. (2000.)** te **Bourre i Galea (2006.)**. U istraživanju **Suraia i sur. (2000.)** nesilice su hranjene smjesama s povećanim udjelima vitamina E, luteina, selena i DHA (dokozaheksaenske kiseline), pri čemu su proizvedena jaja koja su sadržavala prosječno 19 mg vitamina E, 209 mg DHA, 32 mg Se i 1,9 mg luteina u odnosu na standardna jaja s 0,72 mg vitamina E, 32 mg DHA, 4 mg Se i 0,12 mg luteina. Kuhanje jaja nije utjecalo na stabilnost luteina i vitamina E, a ta kombinacija antioksidanasa povećala je stabilnost lipida na oksidaciju, unatoč visokim razinama DHA u jajima, pri čemu je produžena i održivost dizajniranih jaja. Autori su zaključili da konzumacijom obogaćenih jaja tijekom 8 tjedana dolazi do učinkovitog povećanja razina navedenih funkcionalnih sastojaka u plazmi ljudi. **Bourre i Galea (2006.)** hranidbom nesilica smjesama s autoklaviranim lanenim sjemenom i pšenicom te mineralnim tvarima, vitaminima i luteinom proizveli su višestruko obogaćena Benefic® jaja. Takva jaja sadržavala su 2,5 puta više joda, 3 puta više vitamina D, 4 puta više selena i folne kiseline, 6 puta više vitamina E, luteina i zeaksantina te α -linolenske kiseline (omega-3), i 3 puta više dokozaheksaenske kiseline (omega-3) u odnosu na standardna jaja. Autori preporučuju konzumaciju ovih jaja svima, posebno starijim osobama kod kojih postoji opasnost od nedovoljnog unosa hranjivih tvari.

2.6. Jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama

Omega-3 masne kiseline su polinezasićene masne kiseline koje imaju dvostruku vezu na trećem C atomu brojeći od metilnog ($-\text{CH}_3$) kraja molekule masne kiseline. U prehrani ljudi najvažnije n-3 masne kiseline su α -linolenska (LNA, C18:3), eikozapentaenska (EPA, C20:5) i dokozaheksaenska (DHA, C22:6) (Slika 8.). Izvor LNA u prehrani ljudi su biljna ulja i sjemenke (repica, lan, orasi) te zeleno lisnato povrće, dok su EPA i DHA najzastupljenije u ribama i uljima morskih organizama. Najbolji izvor omega-3 masnih kiselina u životinjskom svijetu su inćuni, haringe, skuše, losos, sardine, jesetre, pastrve i

tuna. Unos n-3 polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) kod ljudi u razvijenim zemljama je nedovoljan uglavnom zbog slabe konzumacije ribe.



Slika 8. Strukturna formula omega-3 masnih kiselina (EUFIC, 2008.)

Situaciju dodatno pogoršava hranidba životinja krmivima bogatima n-6 PUFA jer to dovodi do proizvodnje mesa bogatog s n-6 PUFA, a siromašnog s n-3 PUFA. Slična je situacija i u industrijskoj proizvodnji svinja, riba i kokošjih jaja (Lugasi i sur., 2006.). Sadržaj n-3 PUFA u mesu i jajima peradi može se povećati uporabom krmiva podrijetlom od biljaka ili morskih organizama (alge, ribe). Dodaci hrani koji potječu od biljaka (sjemenke lana, laneno ili repičino ulje) uzrokuju povećanje sadržaja LNA (Kovács i sur., 2000.), dok dodaci podrijetlom od morskih organizama utječu na porast sadržaja EPA i DHA (Meluzzi i sur., 2000.). LNA je najzastupljenija n-3 masna kiselina u prehrani ljudi a ujedno je i prekursor dugolančanih PUFA. Kod ljudi je učinkovitost konverzije LNA u EPA i DHA manja od 5% i ovisi o koncentracijama n-6 masnih kiselina i dugolančanih PUFA u hrani (Brenna, 2002.). Prema tome, da bi se zadovoljile potrebe organizma za EPA i DHA, koje su važne za održavanje zdravlja srca i krvnih žila, probavnog i imunološkog sustava te mozga (Marik i Varon, 2009.) potrebno je koristiti dodatne izvore navedenih masnih kiselina u hrani.

Poznato je da konzumna jaja imaju visok sadržaj n-6 PUFA, a nizak sadržaj n-3 PUFA, zbog čega je omjer ukupnih n-6/n-3 masnih kiselina visok, odnosno nepovoljan za ljudsko zdravlje. Stoga je u smjese za nesilice potrebno dodati izvore n-3 PUFA. Dodatak sjemenki lana ili lanenog ulja uzrokuje povećanje sadržaja LNA u žumanjcima jaja. Sari i sur. (2001.) istraživali su utjecaj dodatka sjemenki lana u različitim udjelima (0, 5, 10 i 15%) u

smjese za nesilice na sadržaj LNA u žumanjcima jaja. Utvrdili su povećanje sadržaja LNA s 1,80% u skupini bez dodatka sjemenki na 7,07%, 8,35% te 12,20% u skupini s najvećim sadržajem sjemenki lana u hrani. **Ezhil Valavan i sur. (2006.)** zabilježili su porast sadržaja LNA u žumanjcima jaja s 0,62% u kontrolnoj skupini na 0,83%, 0,93% i 1,00% u pokusnim skupinama uz dodatak lanenog ulje u hranu u udjelima od 1%, 2% i 3%. Također su utvrdili i povećanje sadržaja EPA i DHA. Dodatak lanenog ulja u udjelu od 5% i 10% u hranu nesilica uzrokovao je porast udjela LNA s 0,37% na visokih 10,3% i 14,9% (**Grobas i sur., 2001.**). Navedeni rezultati povećanja sadržaja LNA u žumanjku u skladu su s činjenicom da su lanene sjemenke i ulje bogati s LNA.

Međutim, zbog već spomenute ograničene učinkovitosti konverzije LNA u EPA i DHA u organizmu čovjeka, konzumacijom jaja bogatih samo LNA vjerojatno se ne može očekivati pozitivan zdravstveni učinak kojeg omogućuju ukupne n-3 PUFA. Stoga je važno povećati i sadržaj EPA i DHA u žumanjcima jaja. To je moguće ostvariti dodatkom ribljeg ulja u smjesu za nesilice. Uz dodatak 3% ribljeg ulja u hranu za nesilice sadržaj EPA bio je 19,53 mg/jajetu, a DHA 143,70 mg/jajetu (**Meluzzi i sur., 2000.**), dok je dodatak 6% ribljeg ulja uzrokovao povećanje sadržaja ukupnih n-3 PUFA na 246 mg/jajetu, kao i povećanje sadržaja EPA i DHA (**Gonzales-Esquerra i Leeson, 2000.**). **Škrtić i sur. (2007.)** pokazali su da kombinacija ribljeg (2%) i repičinog (4%) ulja u hrani za nesilice utječe na značajno povećanje udjela ukupnih n-3 PUFA (s 0,38% na 3,20%) i smanjenje udjela ukupnih n-6 PUFA (s 23,8% na 17,40%) u žumanjku jajeta, što ujedno dovodi i do smanjenja omjera ukupnih n-6/n-3 PUFA u jajetu. Nadalje, **Škrtić i sur. (2008.)** istraživali su utjecaj različitih izvora ulja na profil masnih kiselina u žumanjku. Nesilice su hranjene hranom s 5% sojinog ulja (kontrola), 2,5% ribljeg i 2,5% lanenog ulja (E1) te 2,5% ribljeg i 2,5% repičinog ulja (E2). Rezultati su pokazali da su žumanjci jaja E2 skupine imali najveći sadržaj n-3 PUFA (7,22%), što je bilo dvostruko više u odnosu na E1 skupinu te tri puta više u odnosu na kontrolu. Osim toga, u žumanjcima jaja E2 skupine zabilježen je najniži omjer n-6/n-3 PUFA (2,93:1), što je povoljno za ljudsko zdravlje. **Kralik i sur. (2008.b)** davali su nesilicama u hranu riblje i laneno ulje u sljedećim omjerima: E1 – 1,5% laneno i 3,5% riblje ulje, E2 – 2,5% laneno i 2,5% riblje ulje, E3 – 3,5% laneno i 1,5% riblje ulje. Povećanje udjela lanenog ulja u hrani dovelo je do povećanja sadržaja α -LNA u žumanjcima. Sadržaj EPA bio je najveći u skupini E1 zbog većeg udjela ribljeg ulja u odnosu na skupine E2 i E3. Sadržaj DHA nije se značajno razlikovao između skupina, dok je povoljan n-6/n-3 PUFA omjer (manji od 4:1) zabilježen u svim skupinama. Rezultati su

pokazali da se povećanjem sadržaja lanenog ulja i smanjenjem sadržaja ribljeg ulja značajno smanjuje sadržaj zasićenih masnih kiselina (SFA), a povećava sadržaj poželjnih n-3 PUFA. Iako dodatak lanenog ili ribljeg ulja utječe na poboljšanje profila masnih kiselina u žumanjku, ima i negativan utjecaj na organoleptička svojstva jaja. Dodatkom većeg postotka navedenih ulja u hranu za nesilice može doći do pojave ribljeg mirisa i okusa jaja (**Van Elswyk, 1997.**) kao posljedica oksidativnih promjena na dvostrukim vezama masnih kiselina. Zbog toga je poželjno u smjese za nesilice s povećanim sadržajem ulja podložnih oksidaciji dodati antioksidanse s ciljem sprječavanja nepoželjnih oksidativnih promjena, kako u smjesi, tako i u jajima. Dodatkom antioksidanasa (npr. vitamin E, selen, lutein) osigurava se produžena održivost i kvalitetniji nutritivni sastav jaja.

2.7. Funkcionalna hrana

Među različitim prehrambenim proizvodima na tržištu zastupljeni su i oni koji doprinose održavanju dobrog zdravlja ili sadrže sastojke koji pozitivno utječu na smanjenje rizika od razvoja određenih bolesti. Takvi proizvodi uključuju probiotičke jogurte, mlijeko obogaćeno vitaminima i kalcijem, cjelovite žitarice s povećanim sadržajem biljnih vlakana, ulja i margarini obogaćeni vitaminima i biljnim sterolima, kao i jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, selenom, vitaminima i karotenoidima. Konzumiraju se kao sastavni dio uobičajene prehrane, a pored osnovnih hranjivih tvari sadrže i sastojke za koje je dokazan pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Svi ti proizvodi po svom sastavu odgovaraju pojmu funkcionalne hrane. Na hranu se ne gleda više samo kao na izvor hranjivih tvari potrebnih za normalan razvoj i funkcioniranje organizma, već se nastoji otkriti i „ugraditi“ biološki aktivne tvari u hranu kako bi ona poslužila kao sredstvo poboljšanja zdravlja i smanjenja rizika od nastanka bolesti (**EUFIK, 2006.**). Termin funkcionalne hrane počeo se prvi puta koristiti u Japanu osamdesetih godina 20. stoljeća. Dizajnirana hrana mora proći određeni proces odobravanja Japanskog ministarstva zdravlja, rada i dobrobiti, kako bi se mogla označiti posebnom FOSHU oznakom (Foods for Specified Health Use) (**Rajasekaran i Kalaivani, 2013.**). Proizvodi s FOSHU oznakom moraju biti u obliku obične hrane, a ne u obliku tableta ili vrećica s prahom, te namijenjeni konzumaciji kao dio uobičajene prehrane. Europsko zakonodavstvo prije svega osigurava da je hrana na tržištu sigurna za konzumaciju i da informacije koje su navedene na proizvodu ne navode

potrošače na krive zaključke. Na temelju Europskog zakona o oglašavanju namirnicama se ne smiju pripisivati svojstva sprječavanja ili liječenja ljudske bolesti (**EUFIK, 2006.**). Stoga je oformljen FUFOSSE program (Functional Food Science in Europe), čiji je cilj znanstvenim pristupom osigurati dokaze potrebne za razvoj prehrambenih proizvoda koji po svom sastavu mogu imati pozitivan utjecaj na neke fiziološke funkcije organizma ili utjecati na smanjenje rizika od razvoja različitih bolesti.

Analizirajući literaturu i vlastita istraživanja, **Surai i Sparks (2001.b)** došli su do zaključka da jaja idealno odgovaraju zahtjevima funkcionalne hrane. Na primjer, razina određenih hranjivih tvari (vitamina E i DHA) može se povećati u jajetu do te mjere da konzumacija jednog jajeta osigurava ove hranjive tvari u količinama koje odgovaraju, ili su više od dnevnih potreba čovjeka (**Surai i sur., 2000.**). U zapadnim zemljama potrošači još uvijek imaju negativnu percepciju da konzumacija jaja utječe na porast razine kolesterola u krvi i učestalost razvoja bolesti srca i krvnih žila, iako su u posljednje vrijeme sve brojnija istraživanja koja navode da kolesterol iz jaja ne doprinosi značajno razvoju ateroskleroze i riziku od kardiovaskularnih bolesti kod zdravih pojedinaca (**Hu i sur. 1999.; Qureshi i sur., 2007.; Zazpe i sur., 2011.**). Komercijalno je moguće proizvesti jaja istovremeno obogaćena s različitim (n-3 masne kiseline, Se, vitamini D, E, B12 i folna kiselina) ili samo jednim funkcionalnim sastojkom, ovisno o zahtjevima potrošača. Dizajnirana jaja, s povećanim sadržajem funkcionalnih sastojaka, osiguravaju unos antioksidanasa (npr. 150% RDA vitamina E, 50% RDA selena i značajnu količinu luteina) i pozitivno utječu na razvoj mozga fetusa i kognitivnih sposobnosti djece (zbog sadržaja DHA, koja je nužna za razvoj mozga u djece). Prema tome, postoji mogućnost da se jaja koriste kao funkcionalna hrana, a potrebno je educirati potrošače o potencijalnim prednostima takvih jaja. Autori zaključuju da bi mnogi ljudi mogli imati koristi od konzumiranja dizajniranih jaja u sklopu svoje svakodnevne prehrane, da su potrebna daljnja istraživanja kako bi se poboljšala kvaliteta dizajniranih jaja i procijenili dugoročni učinci njihove potrošnje, te u konačnici uvjerali kupci o prednostima konzumacije tih jaja.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

Cilj istraživanja

Jaja se svakodnevno koriste u prehrani ljudi, kao pojedinačna namirnica ili sastavni dio prehrambenih proizvoda (tjestenina, kolači, gotova jela). Sadrže visokovrijedne nutrijente, a obogaćena funkcionalnim sastojcima postaju namirnica koja, pored nutritivnih prednosti, ima i povoljan utjecaj na zdravlje ljudi. Jaja obogaćena luteinom doprinose unosu luteina kod ljudi. Stoga je cilj istraživanja ispitati utjecaj luteina dodanog u hranu nesilica na proizvodne pokazatelje nesilica, povećanje sadržaja luteina u žumanjku standardnih jaja i jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama i njegovo djelovanje na fizikalna i kemijska svojstva kvalitete jaja, profil masnih kiselina i oksidaciju lipida u žumanjcima te biokemijske pokazatelje u krvi nesilica.

Hipoteza

Uloga luteina u zaštiti zdravlja očiju znanstveno je dokazana, a ispituje se i njegova uloga u zaštiti srčano-žilnog sustava i kože od razvoja bolesti. Budući da ga ljudski organizam ne može sintetizirati i da se mora unositi hranom, važno je osigurati dostupne i prihvatljive namirnice iz kojih je bioiskoristivost luteina veća u odnosu na postojeće dodatke prehrani koji su dostupni na tržištu. Pretpostavka je da će se istraživanjem proizvesti jaje obogaćeno luteinom u količini koja će predstavljati značajan doprinos unosu luteina kod ljudi, bez negativnih utjecaja na fizikalna i kemijska svojstva kvalitete jaja te zdravlje nesilica. Također očekujemo istovremeno obogaćivanje jaja s dva funkcionalna sastojka, omega-3 masnim kiselinama i luteinom te povoljan utjecaj luteina na intenzitet boje žumanjka, kao i produženu održivost jaja, s obzirom na njegova antioksidativna svojstva.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Plan i provedba istraživanja

Istraživanje je provedeno u dva usporedna pokusa (tretmani K i O) na peradarskoj farmi „Marijančanka“ na ukupno 600 kokoši nesilica Tetra SL hibrida. Svaki tretman obuhvaćao je po 300 kokoši podijeljenih u 3 skupine, kontrolnu i dvije pokusne. U svakoj skupini bilo je 100 nesilica.

Prije pokusa s dodatkom luteina u smjese provedeno je pripremno razdoblje navikavanja nesilica iz tretmana O na hranu s povećanim udjelom omega-3 masnih kiselina koje je trajalo 4 tjedna (24.7.-21.8.2013.). Na početku istraživanja s dodatkom luteina u smjese (21.8.2013.) nesilice su bile u 31. tjednu starosti, a istraživanje je trajalo 5 tjedana. U tretmanu K nesilice su hranjene standardnom smjesom, a u tretmanu O smjesom koja sadrži 5% mješavine ulja s povećanim udjelom omega-3 masnih kiselina. Nesilice su konzumirale *ad libitum* krmne smjese. Pokusne skupine unutar tretmana razlikovale su se po razinama luteina dodanog u smjesu prema sljedećoj shemi:

Tablica 4. Shema provedbe istraživanja

| | Tretman K | | | Tretman O | | |
|----------------------------------|----------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|
| | K ₀ | K ₂₀₀ | K ₄₀₀ | O ₀ | O ₂₀₀ | O ₄₀₀ |
| Lutein / mg/kg smjese | 0 | 200 | 400 | 0 | 200 | 400 |

Lutein dodan u smjese za nesilice bio je u obliku 20%-tnog ekstrakta (Marigold extract 20% lutein) cvijeta nevena (*Calendula officinalis*), a kupljen je od tvrtke Phyto Nutraceutical Inc., Changsha, Hunan, China.

Na početku i na kraju pokusa nesilice su izvagane, a svaki dan bilježena je proizvodnja jaja.

4.2. Hranidba

U pripremnom razdoblju koje je trajalo četiri tjedna formirano je 6 skupina s po sto nesilica. Prve tri skupine (K₀, K₂₀₀, K₄₀₀) konzumirale su standardnu smjesu dok su druge tri skupine (O₀, O₂₀₀, O₄₀₀) konzumirale smjesu s dodatkom 5% mješavine ulja bogatih omega-3 masnim kiselinama, pri čemu je sojino ulje bilo zastupljeno s 1,25%, repičino ulje 2,00%, laneno ulje 1,00% i riblje ulje 0,75%. Sastav smjesa prikazan je u Tablici 5.

Tablica 5. Sastav smjesa za nesilice

| Sastojak | Tretman K | Tretman O |
|--------------------------|---------------|---------------|
| Kukuruz | 40,81 | 47,09 |
| Sojina sačma | 18,50 | 21,66 |
| Tostirana soja | 8,30 | 4,04 |
| Tritikal | 15,00 | - |
| Suncokretova sačma | 1,65 | 6,00 |
| Lucerka | 1,00 | 2,50 |
| Stočni kvasac | 0,50 | 1,00 |
| Vapnenac | 9,36 | 10,24 |
| Monokalcijfosfat | 1,56 | 1,50 |
| Sol stočna | 0,32 | 0,32 |
| Sintetički metionin | 0,24 | 0,16 |
| Suncokretovo ulje | 2,26 | - |
| ¹ Smjesa ulja | - | 5,00 |
| ^{2,3} Premix | 0,50 | 0,50 |
| Ukupno | 100,00 | 100,00 |
| Sirovi proteini, % | 18,00 | 18,00 |
| ME, MJ/kg | 11,40 | 11,40 |

¹U hranu je dodano 5,00% mješavine ulja pri čemu je sojino ulje bilo zastupljeno s 1,25%, repičino ulje 2,00%, laneno ulje 1,00% i riblje ulje 0,75%

²Premix smjesa K, sadržaj u 1 kg: vitamin A 2.000.000 UI, vitamin D₃ 500.000 UI, vitamin E 10.000 mg, vitamin K₃ 600 mg, vitamin B₁ 400 mg, vitamin B₂ 1.000 mg, vitamin B₆ 1.000 mg, vitamin B₁₂ 3.000 µg, vitamin C 4.000 mg, vitamin H 12 mg, vitamin B₃ 8.000 mg, vitamin B₅ 2.400 mg, vitamin B₉ 150 mg, vitamin B₄ 100.000 mg, jod 200 mg, mangan 18.000 mg, cink 14.000 mg, kobalt 30 mg, željezo 12.000 mg, bakar 1.600 mg, selen anorganski 50 mg, kalcij 238 g, fitaza 100.000 FYT, kantaksantin 500 mg, beta-apo-beta-karotinska kiselina 300 mg, antioksidant (butilhidroksi toulen) 20.000 mg

³Premix smjesa O, sadržaj u 1 kg: vitamin A 2.000.000 UI, vitamin D₃ 500.000 UI, vitamin E 20.000 mg, vitamin K₃ 400 mg, vitamin B₁ 420 mg, vitamin B₂ 900 mg, vitamin B₆ 540 mg, vitamin B₁₂ 2.300 mg, B₉ 170 mg, Pantotenska kiselina 1.400 mg, B₃ 5.000 mg, vitamin H 17.000 µg, vitamin B₄ 80.000 mg, vitamin C 4.500 mg, jod 180 mg, mangan 14.000 mg, cink 12.500 mg, željezo 6.000 mg, bakar 1.000 mg, selen organski 80 mg, BHT 3.400 mg, propilgalat 1.400 mg, kantaksantin 600 mg, beta-apo-beta-karotinska kiselina 200 mg

Nakon pripremnog razdoblja započela je hranidba s dodatkom luteina (20%-tnog) u smjese u udjelima od 200 i 400 mg/kg, na sljedeći način:

- u skupine K₀ i O₀ nije dodan lutein (kontrolne skupine),
- u skupine K₂₀₀ i O₂₀₀ dodano je 200 mg/kg luteina (200 mg/kg),
- u skupine K₄₀₀ i O₄₀₀ dodano je 400 mg/kg luteina (400 mg/kg).

4.3. Kemijska analiza hrane

Kemijska analiza smjesa za nesilice provedena je u Laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Priprema uzoraka i analize provedene su prema akreditiranim metodama kako je navedeno u Tablici 6.

Tablica 6. Akreditirane metode ispitivanja kemijskog sastava smjesa za nesilice

| Skraćenica | Metode ispitivanja | Referencijski broj |
|-----------------------|---|---|
| | Stočna hrana – Priprema uzorka za ispitivanje | HRN ISO 6498:2001 |
| Vlaga / Suha tvar, ST | Stočna hrana – Određivanje udjela vode u udjela drugih hlapljivih tvari | HRN ISO 6496:2001 |
| Pepeo, PE | Stočna hrana – Određivanje pepela | HRN ISO 5984:2001 |
| Sirovi protein, SP | Hrana za životinje – Određivanje količine dušika i izračunavanje količine sirovih proteina – 2. dio: Razaranje u bloku i metoda destilacije parom (ISO 5983-2:2009) | HRN EN ISO 5983-2:2010 |
| Mast, SM | Stočna hrana – Određivanje udjela masti | HRN ISO 6492:2001 modificirana prema uputama sustava za ekstrakciju ANKOM XT 15 |
| Sirova vlakna, SV | Stočna hrana – Određivanje udjela sirovih vlakana – Metoda s intermedijarnom filtracijom | HRN EN ISO 6865:2001 modificirana prema uputama FOSS Fiber Cap manual |
| Ca* | Određivanje udjela kalcija kompleksometrijskom metodom | RU-5.4.2-11 (interna metoda) |

*neakreditirana metoda

Prosječni kemijski sastav smjesa za nesilice prikazan je u Tablici 7.

Tablica 7. Kemijski sastav smjesa za nesilice

| Sastojak | Tretman K | Tretman O |
|---------------------|-----------|-----------|
| Vlaga g/kg | 86 | 82 |
| Pepeo g/kg | 138 | 170 |
| Sirovi protein g/kg | 192,2 | 203,4 |
| Mast g/kg | 54 | 69 |
| Sirova vlakna g/kg | 41 | 52 |
| Kalcij g/kg | 39,9 | 49,5 |

Iz rezultata analize vidljivo je kako je u smjesi tretmana O sadržaj svih navedenih sastojaka, osim vlage, bio veći u odnosu na smjesu tretmana K.

4.4. Proizvodni pokazatelji nesilica

Prvog i posljednjeg dana pokusnog razdoblja nesilice su izvagane uporabom elektronske vage Viper SW (Mettler Toledo, Švicarska). Tijekom pokusnog razdoblja svakodnevno je bilježena proizvodnja jaja. Na kraju pokusnog razdoblja izvagana je preostala smjesa za nesilice kako bi se utvrdila potrošnja hrane.

4.5. Istraživanje kvalitete jaja

Po završetku pokusnog razdoblja hranidbe prikupljeno je po 60 jaja (ukupno 360) težinskog razreda M (53-63 g) iz svake skupine za određivanje pokazatelja kojima se opisuju kvaliteta i svježina jaja (indeks oblika, masa jaja i osnovnih dijelova, čvrstoća i debljina ljuske, pH bjelanjka i žumanjka, boja žumanjka, visina bjelanjka, Haugh-ove jedinice (HJ), indeks loma bjelanjka i žumanjka, vrijednosni broj (VB) te stupanj starenja (SS). Pokazatelji svježine jaja mjereni su u dva termina, na svježim jajima (1 dan nakon skupljanja jaja u objektu) i nakon 28 dana skladištenja jaja na +4°C. U oba termina iz svake je skupine analizirano po 30 jaja. Pomičnom mjerkom utvrđeni su dužina i širina jaja, a iz tih mjera izračunat je indeks oblika (IO) prema sljedećem obrascu:

$$\text{IO(\%)} = \text{širina jaja(mm)/dužina jaja(mm)} \times 100$$

Masa jaja i osnovnih dijelova utvrđeni su elektronskom vagom Mettler Toledo (model PB 150 2-S). Čvrstoća ljuske mjerena je automatskim uređajem Eggshell Force Gauge Model – II, a vrijednosti izražene u kg/cm². Debljina ljuske mjerena je na ekvatorijalnom dijelu jaja pomoću elektronskog mikrometra. Vrijednosti pH bjelanjka i žumanjka određene su pomoću digitalnog pH-metra marke Mettler Toledo, model SevenEasy. Visina bjelanjka, vrijednosti Haugh-ovih jedinica (HJ) te boja žumanjka (Roche, 1-15) određene su uređajem Egg Multi-Tester EMT-5200. Boja žumanjka utvrđena je uređajem Minolta CR300 (Konica Minolta, Osaka, Japan) na 10 uzoraka žumanjka po skupini i iskazana pomoću tri pokazatelja: CIE L*, CIE a* i CIE b* (**Commission Internationale de l'Eclairage, 1976.**). CIE L* vrijednost označava stupanj svjetloće, a predstavlja tamno do svjetlo područje (0-100). Vrijednost CIE a* (crvenilo) označava stupanj crveno-zelene boje, pri čemu viša pozitivna vrijednost predstavlja crveniju boju. Vrijednost CIE b* (žutilo) označava stupanj žuto-plave boje, pri čemu viša pozitivna vrijednost predstavlja

žutiju boju. Za kalibraciju uređaja korištena je bijela kalibracijska pločica sa specifikacijama $Y=93,0$, $x=0,3159$ i $y=0,3324$. Promjer optičke leće je bio veličine 8 mm, osvjetljenje D65, a standardno opažanje 10° . Indeks loma bjelanjka i žumanjka određen je pomoću refraktometra Refracto 30PX (Mettler Toledo), a vrijednosni broj (VB) i stupanj starenja (SS) izračunati su prema sljedećim formulama (**Kralik i sur., 2008.a**):

$$\mathbf{VB = 1000 (/nD/\check{z} - /nD/b)}$$

gdje je $/nD/\check{z}$ = indeks loma žumanjka; $/nD/b$ = indeks loma bjelanjka

$$\mathbf{SS = 1000 (1,4184 - /nD/\check{z})}$$

gdje je $/nD/\check{z}$ = indeks loma žumanjka koji se ispituje; 1,4184 = indeks loma standardnog žumanjka, izmjeren na 20 uzoraka žumanjaka pri temperaturi od 25°C

4.6. Sadržaj luteina u hrani i žumanjcima jaja

Analiza sadržaja luteina u hrani nesilica provedena je nakon dodatka luteina u smjese, prije početka pokusa. Za analizu je korišteno po 6 uzoraka svake smjese (ukupno 36 uzoraka). Sadržaj luteina u žumanjcima analiziran je u dva termina, na jajima skupljenima na sredini pokusa (3. tjedan) i na kraju pokusa (5. tjedan). U svakom terminu iz svake skupine nasumično je odabrano po 10 jaja (ukupno 120) za analizu sadržaja luteina. Sadržaj luteina u hrani i jajima određen je nakon odgovarajuće pripreme uzoraka pomoću HPLC sustava Shimadzu (Slika 9.), u laboratoriju Katedre za analitičku kemiju Odjela za kemiju u Osijeku. HPLC sustav sastojao se od sljedećih komponenti:

- kontroler – System Controller SCL-10A VP,
- otplinjač – Degasser DGU-14A,
- pumpa – Pump LC 10AD VP,
- detektor – UV-VIS Detector SPD 10AV VP,
- automatski injektor – AutoInjector – SIL-10AD VP,
- pećnica – Column Oven CTO-10AS VP,
- kolona – RESTEK Viva C18 ($5\ \mu\text{m}$, $250\times 4,6\ \text{mm}$).



Slika 9. HPLC sustav Shimadzu (foto: M. Grčević, 2015.)

Uzorci hrane za analizu pripremljeni su prema metodi **Leesona i sur. (2007.)**. Uzorku hrane (1,0 g) u odmjerne tikvici (100 ml) doda se 30 ml ekstrakcijske otopine heksan/acetone/etanol/toluen (10:7:6:7, v/v/v/v) i lagano miješa 1 minutu, nakon čega se doda 2 ml destilirane vode i 2 ml 40% metanolne kalijeve lužine (KOH). Smjesa se uroni u vodenu kupelj na 56°C na 20 minuta, nakon čega se ostavi stajati u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon sat vremena doda se 30 ml heksana i lagano miješa 1 minutu. Nakon toga, doda se 10%-tna otopina natrijevog sulfata (Na_2SO_4), snažno izmiješa 1 minutu i ostavi stajati u mraku na sobnoj temperaturi 1 sat dok se slojevi ne odvoje. Gornji heksanski sloj koristi se za mjerenje sadržaja luteina pomoću HPLC-a.

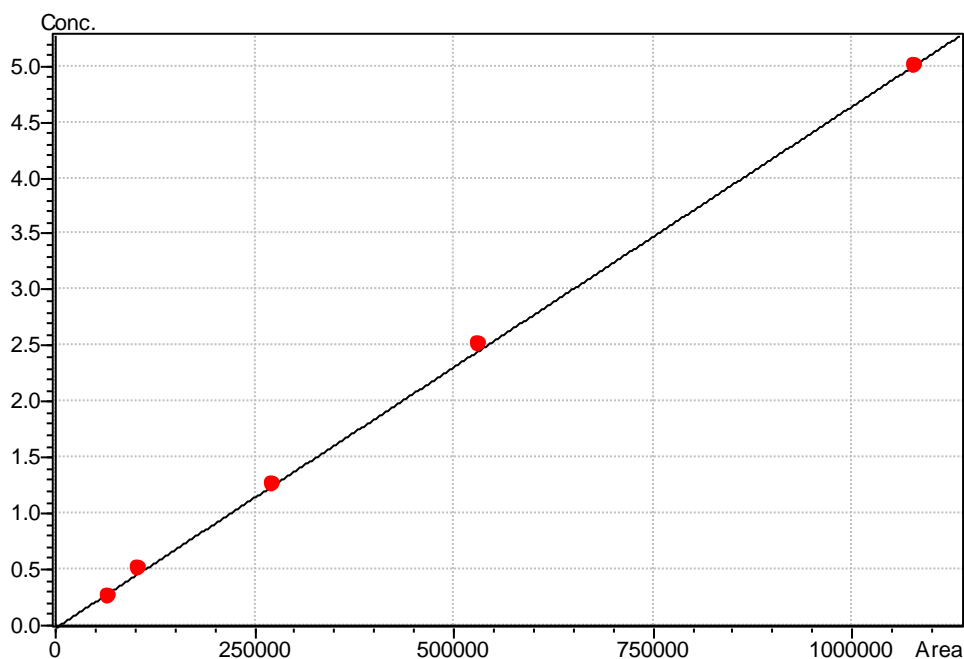
Tablica 8. Sadržaj luteina u pokusnim smjesama ($\bar{x} \pm s$)

| Sadržaj luteina u smjesama (mg/kg) – analizirano | | | | | |
|--|--------------------|--------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| K_0 | K_{200} | K_{400} | O_0 | O_{200} | O_{400} |
| $8,87 \pm 0,64$ | $178,43 \pm 19,55$ | $378,42 \pm 26,68$ | $18,77 \pm 2,29$ | $191,33 \pm 14,50$ | $388,70 \pm 25,87$ |

K_0 = bez dodatka luteina u smjesu, K_{200} = dodano 200 mg/kg luteina u smjesu, K_{400} = dodano 400 mg/kg luteina u smjesu; O_0 = bez dodatka luteina u smjesu, O_{200} = dodano 200 mg/kg luteina u smjesu, O_{400} = dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

Uzorci žumanjaka pripremljeni su za analizu prema metodi **Leesona i Castona (2004.)** na sljedeći način: izvaže se 0,5 g žumanjka u epruvetu, prelije s 5 ml acetona i snažno izmiješa na vorteks mikseru 30 sekundi. Uzorci se ostave stajati u mraku 1 sat. Nakon mirovanja i filtriranja kroz 0,45 μm membranski filter CHROMAFIL[®] Xtra CA-45/25 (MACHEREY-NAGEL GmbH&Co. KG, Düren, Germany), 1 ml acetonskog ekstrakta se prenese u HPLC vijalice i lagano ispari zagrijavanjem. Ostatak u vijalici otopi se dodatkom 1 ml otopine heksan/etil-acetat (65:35, v/v) i izmiješa na vorteksu. Tako pripremljeni uzorci korišteni su za HPLC analizu. Sve upotrebljavane kemikalije bile su HPLC kvalitete.

Analiza sadržaja luteina provedena je propuštanjem pripremljenih uzoraka kroz Viva C18 kolonu (5 μm , 250x4,6 mm; RESTEK Corporation, Bellefonte, PA, USA). Mobilna faza sastojala se od smjese metanola i tetrahidrofurana (THF) 9:1 (v/v). Brzina protoka bila je 1 ml/min, vrijeme trajanja analize 20 minuta a valna duljina mjerenja 450 nm. Volumen injektiranog uzorka bio je 20 μl . Standardna krivulja luteina (slika10) pripremljena je koristeći standard luteina kupljen od tvrtke ChromaDex (Irvine, CA, USA).



Slika 10. Standardna krivulja luteina korištena u određivanju sadržaja luteina u hrani i žumanjcima (izvor: M. Grčević, 2015.)

4.7. Masne kiseline u hrani i žumanjcima jaja

Zadnjeg dana pokusa nasumično je skupljeno po 6 jaja (ukupno 36) iz svake skupine za analizu sadržaja masnih kiselina u žumanjcima. Sadržaj masnih kiselina određen je i u uzorcima hrane (6 uzoraka smjesa po tretmanu, ukupno 12). Analiza uzoraka je provedena u Analitičkom laboratoriju Zavoda za kemiju i biokemiju Sveučilišta u Kapošvaru, prema metodi **Csapó i sur. (1987.)** na sljedeći način: 0,35 g osušenog uzorka izvagano je u tikvicu, dodano je 8 ml koncentrirane kloridne kiseline i uzorak je kuhan 60 minuta. Nakon hlađenja dodano je 7 ml etanola, zatim 15 ml dietil etera, nakon čega je uzorak mućkan jednu minutu. Sljedeća ekstrakcija napravljena je s 15 ml benzena. Nakon odvajanja faza, organska faza, koja je sadržavala oko 150-200 mg masti, odvojena je i uparena pod vakuumom na rotacijskom isparivaču. Zatim je dodano 4 ml 0,5 M natrijevog hidroksida u metanolu, i kuhano u vodenoj kupelji 5 minuta. Nakon toga dodano je 4 ml 14%-tnog borovog trifluorida u metanolu i kuhano 3 minute te dodano 4 ml n-heksana. Uzorak je kuhan 1 minutu te je organska faza dovedena do vrata tikvice sa zasićenom otopinom natrijevog klorida. Kada su se faze odvojile, uzorci su uzeti iz organske faze, osušeni pomoću natrijevog sulfata i korišteni za daljnju analizu. Metilni esteri masnih kiselina odvojeni su na WCOT (Wall Coated Open Tubular) koloni koja je sadržavala CP-SIL 88 (FAME) stacionarnu fazu, a sadržaj određen korištenjem plamenog ionizacijskog detektora (FID - Flame Ionization Detector) na 270°C. Temperatura split injektora bila je 270°C, a plin nositelj helij s tlakom od 235 kPa. Temperatura pećnice programirana je od 140°C (10 minuta) s porastom od 10°C/min do 235°C (26 min). Volumen injektiranog uzorka mijenjao se između 0,5 i 2 µl. Za analizu je korišten uređaj Chrompack CP 9000 plinski kromatograf (Chrompack B.V., The Netherlands, Middleburg). Pojedine masne kiseline u hrani i žumanjcima izražene su kao postotak ukupnih masnih kiselina.

Profil masnih kiselina u smjesama za nesilice pokusnih skupina prikazan je u Tablici 9.

Tablica 9. Sadržaj masnih kiselina u smjesama za nesilice (% od ukupnih masnih kiselina)

| Masna kiselina | Smjesa | |
|---|--------------|--------------|
| | Tretman K | Tretman O |
| Laurinska kiselina 12:0 | 0,03 | 0,03 |
| Miristinska kiselina 14:0 | 0,18 | 0,63 |
| Pentadekanska kiselina 15:0 | 0,06 | 0,10 |
| Palmitinska kiselina 16:0 | 15,01 | 11,60 |
| Heptadekanska kiselina 17:0 | 0,10 | 0,14 |
| Stearinska kiselina 18:0 | 4,86 | 3,92 |
| Arahidska kiselina 20:0 | 0,39 | 0,38 |
| Behenska kiselina 22:0 | 0,24 | 0,23 |
| Trikozanska kiselina 23:0 | - | 0,03 |
| Lignocerinska kiselina 24:0 | 0,16 | 0,11 |
| SFA | 21,03 | 17,17 |
| Palmitoleinska kiselina 16:1 | 0,12 | 0,56 |
| Elaidinska kiselina 18:1n9t | 0,40 | 0,23 |
| Oleinska kiselina 18:1n9c | 22,51 | 29,92 |
| Oktedekenska kiselina izomer 18:1 (cis) | 1,12 | 1,75 |
| Oktedekenska kiselina izomer 18:1 (trans) | 2,58 | 1,43 |
| Eikozenska kiselina 20:1n9 | 0,22 | 0,46 |
| Eruka kiselina 22:1n9 | - | 0,03 |
| MUFA | 26,95 | 34,39 |
| Linolna kiselina 18:2n6 | 42,02 | 35,46 |
| γ -linolenska kiselina 18:3n6 | - | 0,07 |
| Eikozadienska kiselina 20:2 | - | 0,06 |
| Arahidonska kiselina 20:4n6 | - | 0,09 |
| Oktadekadienska kiselina izomer (A) 18:2 | 2,40 | 0,98 |
| Oktadekadienska kiselina izomer (B) 18:2 | 1,47 | 0,72 |
| Oktadekadienska kiselina izomer (C) 18:2 | 1,53 | 0,62 |
| Oktadekadienska kiselina izomer (D) 18:2 | 1,42 | 0,58 |
| n-6 PUFA | 48,83 | 38,57 |
| α -linolenska kiselina 18:3n3 | 3,33 | 7,97 |
| Eikozatrienska kiselina 20:3n3 | - | 0,03 |
| Eikozapentaenska kiselina 20:5n3 | - | 0,83 |
| Dokozapentaenska kiselina 22:5n3 | - | 0,19 |
| Dokozahexaenska kiselina 22:6n3 | 0,40 | 1,43 |
| n-3 PUFA | 3,73 | 10,45 |
| n-6/n-3 PUFA | 13,08 | 3,69 |

Smjesa koju su konzumirale nesilice tretmana K sadržavala je više ukupnih zasićenih masnih kiselina (SFA) te pojedinačno više palmitinske, stearinske i lignocerinske kiseline,

dok je u smjesi tretmana O zabilježen veći sadržaj miristinske, pentadekanske i heptadekanske kiseline. Kod smjesa tretmana O utvrđen je veći sadržaj palmitoleinske i oleinske kiseline, kao i ukupnih mononezasićenih masnih kiselina (MUFA). Sadržaj n-6 polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) bio je veći u smjesama tretmana K, dok je sadržaj ukupnih n-3 PUFA bio veći u smjesama tretmana O za 2,8 puta. Sadržaj α -linolenske masne kiseline u smjesi tretmana O bio je 2,4 puta veći (7,97% : 3,33%), a dokozaheksaenske kiseline 3,6 puta veći (1,43% : 0,40%) u odnosu na smjesu tretmana K. Smjesa tretmana K nije sadržavala poželjnu eikozapentaensku kiselinu, dok je njen sadržaj u smjesi tretmana O bio 0,83% od ukupnih masnih kiselina. Zbog većeg sadržaja poželjnih n-3 PUFA i smanjenog sadržaja n-6 PUFA u smjesama tretmana O i sam omjer n-6/n-3 masnih kiselina bio je povoljniji u smjesi tretmana O (3,69 : 13,08).

4.8. Oksidacija lipida u žumanjcima

Za potrebe određivanja oksidacije lipida u žumanjcima jaja posljednjeg dana pokusa iz svake je skupine nasumično prikupljeno po 20 jaja (ukupno 120). Oksidacija lipida u žumanjku određena je na svježim jajima (n=10 po skupini) i jajima čuvanim 28 dana u hladnjaku na +4°C (n=10 po skupini) na sljedeći način: 4 g žumanjka odvažuje se u epruvetu i doda se 12 ml 10%-tne trikloroctene kiseline, smjesa se homogenizira i centrifugira na 10000 rpm 10 minuta na 4°C. Nakon centrifugiranja otpipetira se 2,5 ml supernatanta kojemu se doda 1,5 ml otopine tiobarbiturne kiseline pH 2,5, epruvete se zatvore i urone u vodenu kupelj na 90°C 30 minuta. Nakon hlađenja doda se 1 ml destilirane vode i smjesa centrifugira na 6000 rpm 5 minuta na 4°C. Sadržaj obojenog produkta koji nastaje reakcijom produkata lipidne peroksidacije s tiobarbiturnom kiselinom mjeri se spektrofotometrijski na 534 nm. Dobivene vrijednosti uspoređene su sa standardnom krivuljom priređenom pomoću standarda malondialdehid tetrabutilamonijeve soli (Sigma-Aldrich, Švicarska), a iskazane u $\mu\text{g MDA/g}$ žumanjka.

4.9. Biokemijska analiza krvi

Posljednjeg dana pokusnog razdoblja hranidbe nasumično je odabrano po 7 nesilica iz svake skupine kojima je izvađena krv iz krilne vene zbog utvrđivanja biokemijskih pokazatelja te enzima superoksid dismutaze (SOD). Analiza je provedena na Zavodu za stočarstvo Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku. Krv je vađena u vakumske epruvete BD Microtainer® SST™ (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA). Od biokemijskih pokazatelja analizirane su vrijednosti gama glutamil transferaze (GTT, U/L), glukoze (GUK, mmol/L), uree (mmol/L), kreatinina (CRE, μ mol/L), ukupnih bjelančevina (PROT, g/L), albumina (ALB, g/L), ukupnog kolesterola (KOL, mmol/L), HDL-kolesterola (HDL, mmol/L) i triacilglicerola (TGC, mmol/L) automatskim analizatorom "Olympus AU 400". Vrijednosti SOD-e (puna krv) određene su pomoću komercijalnog kita Ransod SD 125 proizvođača Randox (Randox Laboratories Ltd, London, UK).

4.10. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja obrađeni su pomoću statističkog programa Statistica for Windows v.12.0. (StatSoft Inc, 2014.). Od statističkih parametara prikazana je aritmetička sredina (\bar{x}), standardna greška aritmetičke sredine (SEM) te standardna devijacija (s). Ispitivanje značajnosti razlika između i unutar skupina utvrđeno je korištenjem GLM procedure pomoću jednostruke (ANOVA) te višefaktorijske (MANOVA, 3x2) analize varijance. Izračunata F vrijednost uspoređena je s kritičnom teoretskom F vrijednošću na razini značajnosti 5%. Značajnost razlika između srednjih vrijednosti određena je pomoću Fisherovog LSD-testa.

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Proizvodni pokazatelji nesilica tijekom pripremnog razdoblja

Proizvodni pokazatelji, koji uključuju broj i masu nesilica, utrošak i konzumaciju hrane te uginuća tijekom 4 tjedna pripremnog razdoblja (24.7.2013. - 21.8.2013.) prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Proizvodni pokazatelji bilježeni tijekom pripremnog razdoblja

| Pokazatelj | K ₀ | K ₂₀₀ | K ₄₀₀ | O ₀ | O ₂₀₀ | O ₄₀₀ |
|---|----------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|
| Broj nesilica na početku pripremnog razdoblja | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Broj nesilica na kraju pripremnog razdoblja | 100 | 99 | 99 | 93 | 98 | 100 |
| Uginuće | 0 | 1 | 1 | 7 | 2 | 0 |
| Utrošak hrane (kg) | 1078 | | | 1086 | | |
| Prosječni utrošak hrane (kg/nesilici) | 3,62 | | | 3,73 | | |
| Prosječna konzumacija (g/nesilici) | 129,29 | | | 133,21 | | |

Tijekom pripremnog razdoblja uginula je po 1 nesilica iz skupina K₂₀₀ i K₄₀₀, 7 nesilica iz O₀ i 2 nesilice iz O₂₀₀, a utrošeno je ukupno 1078 kg standardne smjese i 1086 kg omega smjese. U skupini nesilica koje su konzumirale omega smjesu primijećeno je veće uginuće, veći utrošak i konzumacija hrane. Tijekom kolovoza 2013. godine zabilježene su visoke temperature okoliša, što je, pored malo lošijeg položaja kaveza s nesilicama O₀ skupine (blizina ventilatora), možda razlog većeg uginuća nesilica u navedenoj skupini.

5.2. Tretman K

5.2.1. Proizvodni pokazatelji nesilica

Na početku i na kraju pokusa nesilice su izvagane, a njihova masa prikazana je u Tablici 11.

Tablica 11. Masa nesilica na početku i na kraju istraživanja ($\bar{x} \pm s$)

| Obilježje | K ₀ | K ₂₀₀ | K ₄₀₀ | P vrijednost |
|---|----------------|------------------|------------------|--------------|
| Masa nesilica na početku istraživanja (g) | 1933 ± 118 | 1925 ± 123 | 1938 ± 127 | 0,760 |
| Masa nesilica na kraju istraživanja (g) | 2034 ± 137 | 2031 ± 136 | 2066 ± 141 | 0,144 |

\bar{x} =aritmetička sredina; s=standardna devijacija; K₀= bez dodatka luteina u smjesu, K₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu, K₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

Dodatak luteina u smjese nije utjecao ($P > 0,05$) na mase nesilica u K skupinama tijekom pokusnog razdoblja. Najveća početna prosječna masa nesilica zabilježena je u K₄₀₀ skupini (1938 g), zatim K₀ (1933 g) te K₂₀₀ (1925 g) skupini, a isti trend vidljiv je i kod vrijednosti završnih masa (K₄₀₀ - 2066 g > K₀ - 2034 g > K₂₀₀ - 2031 g).

Proizvodni pokazatelji nesilica u K skupinama bilježeni tijekom 5 tjedana pokusnog razdoblja prikazani su u Tablici 12.

Tablica 12. Proizvodni pokazatelji nesilica tretmana K bilježeni tijekom 5 tjedana pokusnog razdoblja

| Pokazatelj | K ₀ | K ₂₀₀ | K ₄₀₀ |
|---------------------------------------|----------------|------------------|------------------|
| Broj nesilica na početku istraživanja | 100 | 99 | 99 |
| Broj nesilica na kraju istraživanja | 100 | 99 | 99 |
| Uginuće | 0 | 0 | 0 |
| Ukupno jaja | 3392 | 3355 | 3312 |
| Broj jaja po nesilici | 33,92 | 33,89 | 33,45 |
| Intenzitet nesivosti (%) | 96,91 | 96,83 | 95,58 |
| Konzumacija hrane (g/dan) | 126,00 | 126,41 | 126,70 |
| Utrošak hrane (g/jajetu) | 130,01 | 130,55 | 132,57 |

K₀= bez dodatka luteina u smjesu, K₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu, K₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

Tijekom pokusnog razdoblja nije zabilježeno niti jedno uginuće. U K₀ skupini zabilježena je najveća proizvodnja jaja (3392 kom.) i intenzitet nesivosti (96,91%) te najpovoljnija konzumacija (126,00 g/dan) i utrošak hrane (130,01 g) po jajetu. U skupinama s luteinom dodanim u smjese, K₂₀₀ i K₄₀₀, zabilježeni su nešto manja proizvodnja jaja i intenzitet nesivosti te veća konzumacija i utrošak hrane, u odnosu na kontrolnu skupinu.

Leeson i Caston (2004.) nisu utvrdili utjecaj luteina dodanog u udjelima od 125 do 1000 mg/kg na proizvodnju jaja, masu jaja, konzumaciju hrane ili kvalitetu ljuske. Nadalje, pri dodatku 125 ili 250 mg/kg luteina nije primijećen utjecaj na konzumaciju hrane, masu jaja ili deformaciju ljuske (**Leeson i sur., 2007.**). **Englmaierová i Skřivan (2013.)**, kao i **Englmaierová i sur. (2013.)**, također nisu utvrdili utjecaj dodatka luteina (100 mg/kg odnosno 250 mg/kg) na proizvodne pokazatelje nesilica. Dodatak cvijeta kadifice u udjelima od 10 g/kg i 20 g/kg nije utjecao na završnu masu nesilica, konzumaciju hrane ili proizvodnju jaja u usporedbi s kontrolnom skupinom (**Altuntaş i Aydin, 2014.**). Naši rezultati u skladu su s rezultatima navedenih autora.

5.2.2. Pokazatelji kvalitete jaja

Iz prikazanih rezultata analize pokazatelja vanjske kvalitete jaja K tretmana (Tablica 13.) vidljivo je da su vrijednosti dužine i širine jaja kod svih pokusnih skupina bile ujednačene. Najmanja vrijednost dužine jaja utvrđena je u K₀ skupini, i to na svježe analiziranim jajima (56,40 mm), dok je najveća dužina jaja (56,93 mm) zabilježena u K₄₀₀ skupini kod jaja skladištenih 28 dana. Najmanja vrijednost za širinu jaja iznosila je 43,27 mm, dok je najveća vrijednost bila 43,63 mm. S obzirom da se iz mjera dužine i širine jaja računa indeks oblika, ove vrijednosti utjecale su na to da su i vrijednosti indeksa oblika također bile ujednačene te su se kretale u rasponu od 76,27% do 76,96%. Na opisane pokazatelje tretman, vrijeme skladištenja i njihova interakcija nisu imali statistički značajan utjecaj ($P > 0,05$). **Altuntaş i Şekeroğlu (2008.)** navode da se jaja, s obzirom na vrijednost indeksa oblika, mogu opisati kao duguljasta, ovalna i okrugla. Kod duguljastih jaja indeks oblika je manji od 72%, kod ovalnih jaja kreće se u rasponu od 72% do 76%, dok su okrugla jaja ona čiji je indeks oblika veći od 76%. Indeks oblika jaja važan je prilikom klasiranja, pakiranja i transport, jer su jaja nepravilnog oblika sklonija oštećenju ljuske, izlijevanju sadržaja i na koncu uzrok ekonomskim gubicima. Jaja s indeksom oblika 74% imaju najoptimalniji oblik i kod njih je napuknuće ljuske tijekom navedenih operacija svedeno na minimum (**Kralik i sur., 2012.**).

Tablica 13. Pokazatelji vanjske kvalitete jaja tretmana K (\bar{x} ; n=30 po tretmanu)

| Tretman | Vrijeme skladištenja (dani) | Dužina jaja (mm) | Širina jaja (mm) | Indeks oblika (%) | Masa jaja (g) | Čvrstoća ljuske (kg/cm ²) | Debljina ljuske (mm) |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------|---------------------------------------|----------------------|
| K ₀ | 1 | 56,40 | 43,30 | 76,79 | 59,56 ^{ab} | 3,205 ^{ab} | 0,365 ^c |
| | 28 | 56,73 | 43,47 | 76,65 | 58,43 ^c | 3,343 ^a | 0,380 ^{ab} |
| K ₂₀₀ | 1 | 56,53 | 43,43 | 76,85 | 60,35 ^a | 3,239 ^{ab} | 0,362 ^c |
| | 28 | 56,70 | 43,63 | 76,96 | 59,58 ^{ab} | 3,001 ^b | 0,369 ^c |
| K ₄₀₀ | 1 | 56,77 | 43,27 | 76,27 | 60,05 ^a | 3,119 ^{ab} | 0,371 ^{bc} |
| | 28 | 56,93 | 43,50 | 76,44 | 59,02 ^{bc} | 3,343 ^a | 0,387 ^a |
| SEM | | 0,219 | 0,143 | 0,351 | 0,360 | 0,090 | 0,004 |
| Izvori varijacije | | | | | | | |
| Tretman (T) | | 0,387 | 0,484 | 0,284 | 0,028 | 0,211 | 0,001 |
| Vrijeme skladištenja (VS) | | 0,215 | 0,090 | 0,856 | 0,001 | 0,569 | <0,001 |
| T x VS | | 0,908 | 0,973 | 0,896 | 0,875 | 0,025 | 0,425 |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; a,b,c P<0,05; Tretman K₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman K₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu, Tretman K₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

S obzirom da je indeks oblika jaja u našem istraživanju u svim pokusnim skupinama bio veći od 76%, može se zaključiti da su ispitivana jaja bila okruglasta. **Škrbić i sur. (2011.)** navode da su jaja nesilica iz konvencionalnog načina proizvodnje, u dobi od 32 tjedna, imala indeks oblika 78,17%, a u dobi od 40 tjedana indeks oblika jaja iznosio je 78,63%, što je veće od naših rezultata. U našem istraživanju, u trenutku skupljanja jaja za analizu, nesilice su bile u 36. tjednu starosti. **Nikolova i Kocevski (2006.)** navode da jaja mlađih nesilica (manje od 45 tjedana starosti) imaju indeks oblika 76,27%. Naši rezultati u skladu su s rezultatima spomenutih autora.

Prosječne vrijednosti mase jaja kretale su se u rasponu od 58,43 g do 60,35 g. Masa jaja bila je manja kod skladištenih u odnosu na svježa jaja kod sva tri korištena tretmana ($K_0=59,56$ g odnosno 58,43 g; $K_{200}=60,35$ g odnosno 59,58 g i $K_{400}=60,05$ g odnosno 59,02 g). Također je uočeno da je masa jaja, kako svježih tako i skladištenih, bila statistički značajno veća K_{200} skupini u odnosu na jaja ostalih skupina. Na dobivene razlike u vrijednostima za masu jaja utjecaj je imao korišteni tretman ($P=0,028$), kao i vrijeme skladištenja jaja ($P<0,001$), dok njihova interakcija nije imala utjecaja na promatrani pokazatelj ($P=0,875$). Najveće smanjenje mase jaja skladištenjem zabilježeno je u K_0 skupini (1,90%), zatim u K_{400} skupini (1,72%) te K_{200} skupini (1,28%). S obzirom na duljinu i uvjete skladištenja, dolazi do smanjenja mase jaja zbog gubitka vode kroz pore ljuske. Gubitak mase jaja izraženiji je na višoj temperaturi skladištenja. Rezultati različitih autora potvrđuju smanjenje mase jaja skladištenjem. Tako **Kralik i sur. (2014.)** navode značajno smanjenje mase standardnih jaja s 67,46 g na 65,85 g ($P<0,05$) tijekom skladištenja jaja 28 dana u hladnjaku. **Akter i sur. (2014.)** te **Jin i sur. (2011.)** potvrđuju značajan utjecaj vremena skladištenja na smanjenje mase jaja.

Čvrstoća ljuske kretala se u rasponu od 3,001 kg/cm² do 3,343 kg/cm². Na razlike dobivene između srednjih vrijednosti promatranih skupina utjecaj je imala interakcija korištenih tretmana i vremena skladištenja jaja ($P=0,025$). Statistički značajno čvršća ljuska jaja bila je kod skladištenih jaja, i to kod tretmana K_0 i K_{400} u odnosu na tretman K_{200} . **Kralik i sur. (2014.)** nisu utvrdili utjecaj ($P>0,05$) vremena skladištenja (28 dana) na čvrstoću ljuske standardnih jaja. Kod svježih jaja čvrstoća ljuske iznosila je 3,100 kg/cm², a kod skladištenih 3,160 kg/cm². U istraživanju **Batkowske i sur. (2014.)** izmjerena je veća čvrstoća ljuske kod jaja skladištenih 28 dana u odnosu na svježa jaja, ali razlika nije bila značajna ($P>0,05$).

Na debljinu ljuske jaja utjecaj je imao tretman ($P=0,001$), kao i vrijeme skladištenja jaja ($P<0,001$), dok interakcija navedenih čimbenika nije utjecala na promatrani pokazatelj ($P=0,425$). Iz rezultata je uočeno da povećanje sadržaja luteina na razinu od 400 mg/kg hrane utječe na debljinu ljuske jaja, odnosno kod navedene skupine utvrđena je statistički značajno deblja ljuska jaja u odnosu na skupinu K_{200} . **Lokaewmanee i sur. (2011.)** nisu utvrdili utjecaj dodatka luteina (40 mg/kg) na debljinu ljuske jajeta. Kod jaja skladištenih 28 dana utvrđena je statistički značajno deblja ljuska jaja, u odnosu na jaja koja su analizirana svježa ($K_0=0,380$ mm odnosno 0,365 mm; $K_{200}=0,369$ mm odnosno 0,362 mm i $K_{400}=0,387$ mm odnosno 0,371 mm). Naši rezultati u skladu su s rezultatima **Batkowske i sur. (2014.)**, koji su kod M razreda jaja proizvedenih na konvencionalan način tijekom 28 dana skladištenja primijetili značajan porast debljine ljuske (s 0,334 mm na 0,349 mm, $P<0,05$). S druge strane, **Tabidi (2011.)**, **Akter i sur. (2014.)**, kao i **Kralik i sur. (2014.)**, nisu utvrdili utjecaj vremena skladištenja na debljinu ljuske jajeta. Debljina ljuske kokošnjih jaja kreće se između 0,241 i 0,430 mm, a za neometano rukovanje i transport potrebna debljina iznosi 0,330-0,340 mm (**Kralik i sur., 2008.a**). Vrijednosti debljine ljuske izmjerene u našem istraživanju veće su od preporučenih vrijednosti.

U Tablici 14.a. prikazani su rezultati analize pokazatelja unutarnje kvalitete jaja tretmana K. Vidljiv je utjecaj vremena skladištenja ($P<0,001$) na razlike u vrijednostima mase bjelanjaka, dok tretman te interakcija tretmana i vremena skladištenja nisu utjecali na promatrani pokazatelj ($P=0,785$ i $P=0,634$). Masa bjelanjka bila je manja kod jaja skladištenih 28 dana na 4°C kod svih ispitivanih skupina ($K_0=36,84$ g odnosno 35,36 g; $K_{200}=36,95$ g odnosno 34,92 g; $K_{400}=36,73$ g odnosno 35,09 g). Vrijednosti mase žumanjka kretale su se u rasponu od 15,36 g do 15,74 g za svježa jaja, odnosno 16,03 g do 16,70 g za jaja čuvana 28 dana u hladnjaku. Iz rezultata je uočeno da vrijeme skladištenja jaja ima statistički značajan utjecaj ($P<0,001$) na vrijednosti mase žumanjka, odnosno kod skladištenih jaja masa žumanjaka bila je statistički značajno veća u usporedbi sa žumanjcima svježih jaja. Vrijednosti mase ljuske bile su ujednačene kod svih ispitivanih skupina te nije bilo utjecaja tretmana ($P=0,204$), vremena skladištenja ($P=0,501$) i njihove interakcije ($P=0,522$) na spomenuti pokazatelj. **Kralik i sur. (2014.)** navode značajno ($P<0,05$) smanjenje mase bjelanjka pri skladištenju konvencionalnih jaja 28 dana u hladnjaku, dok su vrijednosti mase žumanjka i ljuske bile ujednačene u oba termina.

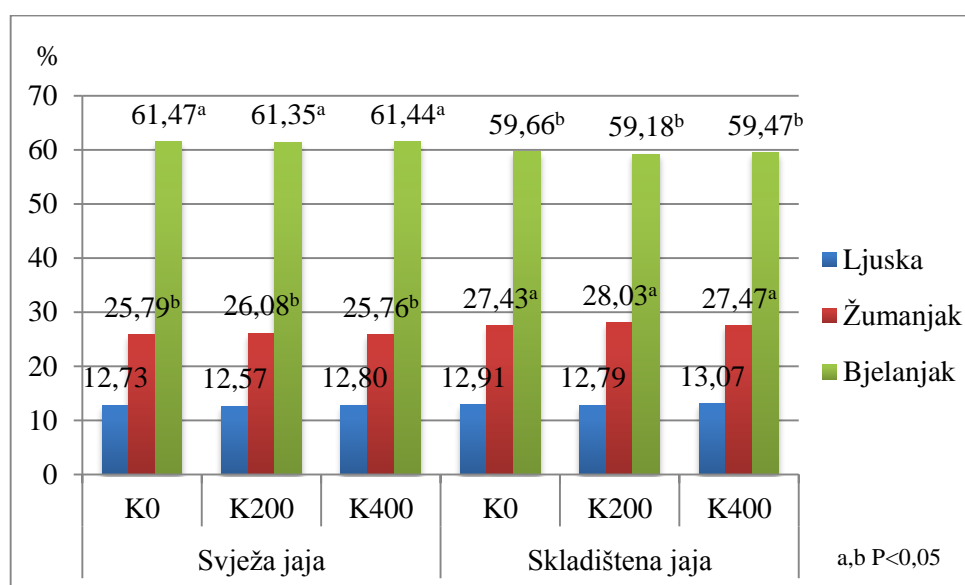
Tablica 14.a. Pokazatelji unutarnje kvalitete jaja tretmana K (\bar{x} ; n=30 po tretmanu)

| Tretman | Vrijeme skladištenja (dani) | Masa bjelanjka (g) | Masa žumanjka (g) | Masa ljuske (g) | Visina bjelanjka (mm) | Haugh-ove jedinice |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|--------------------|
| K ₀ | 1 | 36,84 ^a | 15,36 ^d | 7,58 | 6,87 ^a | 82,04 ^a |
| | 28 | 35,36 ^b | 16,03 ^{bc} | 7,54 | 5,88 ^b | 75,85 ^b |
| K ₂₀₀ | 1 | 36,95 ^a | 15,74 ^{bcd} | 7,45 | 6,87 ^a | 82,15 ^a |
| | 28 | 34,92 ^b | 16,70 ^a | 7,62 | 5,81 ^b | 74,88 ^b |
| K ₄₀₀ | 1 | 36,73 ^a | 15,47 ^{cd} | 7,68 | 7,11 ^a | 83,80 ^a |
| | 28 | 35,09 ^b | 16,22 ^{ab} | 7,71 | 5,95 ^b | 76,38 ^b |
| SEM | | 0,298 | 0,231 | 0,095 | 0,195 | 1,347 |
| Izvori varijacije | | | | | | |
| Tretman (T) | | 0,785 | 0,068 | 0,204 | 0,601 | 0,486 |
| Vrijeme skladištenja (VS) | | <0,001 | <0,001 | 0,501 | <0,001 | <0,001 |
| T x VS | | 0,634 | 0,807 | 0,522 | 0,909 | 0,883 |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; a,b,c,d P<0,05; Tretman K₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman K₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu, Tretman K₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

Slične rezultate navode i **Hosseini-Siyar i sur. (2007.)**, koji su utvrdili značajan ($P<0,001$) utjecaj vremena skladištenja na smanjenje mase bjelanjka, a mase žumanjka i ljuske nisu se mijenjale s vremenom skladištenja. S druge strane, **Jin i sur. (2011.)** utvrdili su značajan utjecaj ($P<0,001$) vremena skladištenja (10 dana) na 5°C na povećanje mase žumanjka i smanjenje mase ljuske, dok pri istim uvjetima vrijeme skladištenja nije utjecalo na masu bjelanjka. **Akter i sur. (2014.)** te **Batkowska i sur. (2014.)** navode značajno ($P<0,05$) manju masu bjelanjka te veću masu žumanjka kod jaja skladištenih 28 dana, dok vrijeme skladištenja nije utjecalo na masu ljuske, što je u skladu s našim rezultatima.

Udjeli bjelanjka, žumanjka i ljuske u masi jaja pokusnih skupina tretmana K prikazani su na Grafikonu 1. Primijećuju se značajno ($P<0,001$) manji udjeli bjelanjka te veći udjeli žumanjka kod skladištenih jaja svih pokusnih skupina. Udio ljuske bio je ujednačen tijekom skladištenja.



Grafikon 1. Udjeli osnovnih dijelova u jajima pokusnih skupina tretmana K

S obzirom na to da su visina bjelanjka i Haugh-ove jedinice dobri pokazatelji svježine jaja, uočeno je da na ove vrijednosti značajan utjecaj ima vrijeme skladištenja ($P<0,001$). Vrijednosti visine bjelanjka statistički se značajno smanjuju kod skladištenih u odnosu na svježa jaja ($K_0=6,87$ mm odnosno $5,88$ mm; $K_{200}=6,87$ mm odnosno $5,81$ mm i $K_{400}=7,11$ mm odnosno $5,95$ mm). Sukladno vrijednostima visine bjelanjka kretale su se i vrijednosti Haugh-ovih jedinica ($K_0=82,04$ odnosno $75,85$, $K_{200}=82,15$ odnosno $74,88$ i $K_{400}=83,80$ odnosno $76,38$). Iako nije utvrđen utjecaj dodatka luteina, primjećuje se da su najveće

vrijednosti visine bjelanjka i Haugh-ovih jedinica izmjerene u K_{400} skupini, kako kod svježih tako i kod skladištenih jaja. Haugh-ove jedinice proporcionalne su visini bjelanjka pa je stoga i razumljivo da sa smanjenjem visine bjelanjka dolazi i do smanjenja vrijednosti Haugh-ovih jedinica. Budući da je poznato da duljina i uvjeti skladištenja znatno utječu na pogoršanje unutarnje kvalitete jaja, očekivano je i smanjenje vrijednosti navedenih pokazatelja sa skladištenjem. **Samli i sur. (2005.)** navode značajno ($P < 0,001$) smanjenje visine bjelanjka i vrijednosti Haugh-ovih jedinica skladištenjem jaja na 5°C već nakon 10 dana. Tako je visina bjelanjka opala s 8,56 mm za svježa jaja na 6,18 mm, dok su vrijednosti Haugh-ovih jedinica bile 91,37 kod svježih te 76,27 kod skladištenih jaja. **Tabidi (2011.)** također navodi značajno ($P < 0,05$) smanjenje visine bjelanjka i Haugh-ovih jedinica nakon samo 15 dana skladištenja jaja u hladnjaku (5°C). Visina bjelanjka smanjila se s 8,54 mm na 6,41 mm, a vrijednosti Haugh-ovih jedinica s 92,26 na 79,41. U istraživanju **Hosseini Siyar i sur. (2007.)** vrijeme skladištenja (20 dana) je isto tako značajno utjecalo ($P < 0,001$) na smanjenje visine bjelanjka i Haugh-ovih jedinica. **Kralik i sur. (2014.)** primijetili su značajno ($P < 0,05$) smanjenje visine bjelanjka i Haugh-ovih jedinica nakon 28 dana skladištenja jaja u hladnjaku. Naši rezultati u skladu su s rezultatima navedenih autora. Svi potvrđuju značajan utjecaj vremena skladištenja na pokazatelje kvalitete jaja, odnosno opadanje vrijednosti pokazatelja svježine jaja, visine bjelanjka i Haugh-ovih jedinica, s povećanjem duljine skladištenja.

U Tablici 14.b. prikazani su također pokazatelji unutarnje kvalitete jaja tretmana K. Uočljivo je da je najveća vrijednost pH bjelanjaka izmjerena kod skladištenih jaja skupine K_{200} (pH=9,26), dok je najmanja vrijednost pH bjelanjaka zabilježena kod svježih jaja skupine K_0 (pH=8,68). Na dobivene razlike u vrijednostima pH bjelanjka utjecaj je imalo vrijeme skladištenja ($P < 0,001$), dok tretman i interakcija nisu imali utjecaja na opisani pokazatelj ($P=0,337$ i $P=0,101$). Utjecaj vremena skladištenja očitovao se tako da su vrijednosti pH bjelanjaka bile veće kod skladištenih jaja u odnosu na svježa jaja neovisno o korištenom tretmanu (K_0 =pH 8,68 odnosno pH 9,25; K_{200} = pH 8,73 odnosno pH 9,26 i K_{400} = pH 8,75 odnosno pH 9,22). Na vrijednosti pH žumanjka utjecaj su imala oba ispitivana čimbenika i njihova interakcija ($P < 0,001$). Svježa jaja imala su značajno manje vrijednosti pH žumanjaka u odnosu na skladištena jaja. Dodatak 200 mg luteina/kg smjese utjecao je da su pH vrijednosti žumanjaka kod skladištenih jaja statistički značajno manje u odnosu na ostale ispitivane skupine (pH 6,10 < 6,22 < 6,23), dok su kod svježih jaja vrijednosti pH bile ujednačene kod svih korištenih tretmana.

Tablica 14.b. Pokazatelji unutarnje kvalitete jaja tretmana K (\bar{x} ; n=30 po tretmanu)

| Tretman | Vrijeme skladištenja (dani) | pH bjelanjka | pH žumanjka | Indeks loma* bjelanjka | Indeks loma* žumanjka | Vrijednosni* broj VB | Stupanj* starenja SS |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| K ₀ | 1 | 8,68 ^c | 5,99 ^c | 1,3542 ^b | 1,4170 ^a | 62,86 ^a | 1,37 ^b |
| | 28 | 9,25 ^a | 6,23 ^a | 1,3562 ^a | 1,4162 ^b | 60,02 ^b | 2,17 ^a |
| K ₂₀₀ | 1 | 8,73 ^{bc} | 6,01 ^c | 1,3541 ^b | 1,4172 ^a | 63,09 ^a | 1,25 ^b |
| | 28 | 9,26 ^a | 6,10 ^b | 1,3559 ^a | 1,4158 ^b | 59,89 ^b | 2,65 ^a |
| K ₄₀₀ | 1 | 8,75 ^b | 6,01 ^c | 1,3538 ^b | 1,4173 ^a | 63,49 ^a | 1,08 ^b |
| | 28 | 9,22 ^a | 6,22 ^a | 1,3557 ^a | 1,4161 ^b | 60,46 ^b | 2,29 ^a |
| SEM | | 0,023 | 0,016 | 0,000 | 0,000 | 0,427 | 0,208 |
| Izvori varijacije | | | | | | | |
| Tretman (T) | | 0,337 | <0,001 | 0,453 | 0,421 | 0,390 | 0,421 |
| Vrijeme skladištenja (VS) | | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| T x VS | | 0,101 | <0,001 | 0,930 | 0,338 | 0,915 | 0,338 |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; a,b,c P<0,05; Tretman K₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman K₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu i Tretman K₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu; *n=20 po tretmanu

Cedro i sur. (2009.) navode da fizikalno-kemijske promjene u jajetu započinju ubrzo nakon nesenja, pri čemu dolazi do pogoršanja unutarnje kvalitete. Kad se jaja skladište na visokim temperaturama dolazi do kemijskih reakcija koje ubrzavaju proces pogoršanja kvalitete uslijed aktivnosti ugljične kiseline (H_2CO_3) prisutne u jajetu – mehanizam poznat kao puferski sustav. Visoke temperature ubrzavaju djelovanje enzima ugljične anhidraze koji disocira H_2CO_3 u H_2O i CO_2 , koji tada napušta jaje kroz pore ljuske uzrokujući porast pH vrijednosti bjelanjka i žumanjka. Autori spominju da porast lužnatosti uzrokuje niz fizikalno-kemijskih promjena u jajetu kao što su razrjeđivanje bjelanjka, kretanje tekućine između bjelanjka i žumanjka, rastezanje i slabljenje membrana žumanjka te puknuće žumanjka. Navedene promjene događaju se i prilikom skladištenja jaja u hladnjaku, samo manjom brzinom, pri čemu se dulje vrijeme održava poželjna kvaliteta jaja. **Cedro i sur. (2009.)** utvrdili su značajno ($P < 0,05$) povećanje pH vrijednosti bjelanjka i žumanjka tijekom skladištenja jaja 21 dan u hladnjaku ($5^\circ C$). Početna pH vrijednost bjelanjka iznosila je 8,62, a nakon skladištenja 9,07, dok je kod žumanjka izmjereno 5,09 na početku te 6,40 na kraju istraživanja. **Samli i sur. (2005.)** te **Jin i sur. (2011.)** bilježe značajan porast pH vrijednosti bjelanjka ($P < 0,001$) već nakon 10 dana skladištenja jaja na $5^\circ C$, dok je za žumanjak također zabilježen porast pH vrijednosti, ali nije bio tako izražen kao kod bjelanjka ($P = 0,023$ odnosno $P = 0,011$). **Samli i sur. (2005.)** navode da je vrijednost pH bjelanjka svježih jaja iznosila 7,47 a skladištenih 8,26, dok **Jin i sur. (2011.)** spominju vrijednosti pH od 8,09 za svježa jaja te 8,76 za jaja skladištena 10 dana na $5^\circ C$. U istraživanjima prethodno spomenutih autora pH vrijednosti žumanjka kretale su se od 5,75 do 5,86, odnosno 5,82 do 5,93. Navedene vrijednosti nešto su niže su od pH vrijednosti bjelanjka i žumanjka izmjerenih u našem istraživanju. **Kralik i sur. (2014.)** utvrdili su značajan porast ($P < 0,05$) pH vrijednosti bjelanjka i žumanjka konvencionalnih jaja nakon skladištenja u trajanju od 28 dana u hladnjaku. Izmjerena vrijednost pH bjelanjka svježih jaja bila je 8,66, a skladištenih 9,01. Kod žumanjka je početna pH vrijednost iznosila 5,99, a nakon skladištenja 6,06. Vidljiv je također značajniji porast pH vrijednosti kod bjelanjka u odnosu na žumanjak tijekom skladištenja. Slični rezultati utvrđeni su u istraživanju **Akter i sur. (2014.)**. Autori navode da skladištenjem jaja dolazi do značajnog ($P < 0,05$) porasta pH vrijednosti bjelanjka i žumanjka. Vrijednost pH bjelanjka porasla je s 8,1 na 8,9, a žumanjka sa 6,1 na 6,3 nakon 28 dana skladištenja u hladnjaku. Rezultati našeg istraživanja potvrđuju značajan utjecaj vremena skladištenja na porast pH vrijednosti bjelanjka i žumanjka te su sukladni rezultatima prethodno spomenutih autora. S druge

strane, **Walsh i sur. (1995.)** utvrdili su da na pH vrijednost bjelanjka ne utječu ni vrijeme niti temperatura skladištenja.

Na analiziranim uzorcima jaja mjereni su i indeksi loma svjetlosti bjelanjka i žumanjka (Tablica 14.b.), za koje je utvrđen statistički značajan utjecaj ($P < 0,001$) vremena skladištenja, dok tretmani i interakcija tretmana i vremena skladištenja nisu utjecali na vrijednosti indeksa loma. Vrijeme skladištenja utjecalo je na porast indeksa loma bjelanjka i smanjenje indeksa loma žumanjka skladištenih jaja u odnosu na svježja jaja kod svih ispitivanih tretmana. Indeks loma bjelanjka kretao se od 1,3538 do 1,3542 kod svježih jaja te od 1,3557 do 1,3562 kod skladištenih jaja. Vrijednosti indeksa loma žumanjka bile su u rasponu od 1,4170 do 1,4173 za svježja jaja te od 1,4158 do 1,4162 za skladištena jaja. Prema istraživanju **Kralik (1976.)**, indeks loma žumanjka jaja starih jedan dan iznosio je od 1,4183 do 1,4185, dok su vrijednosti indeksa loma bjelanjka bile nešto manje zbog većeg udjela vode u svom sastavu te su se kretale u rasponu od 1,3540 do 1,3550. Autorica je navela da između vrijednosti indeksa loma bjelanjka i žumanjka postoji linearna povezanost ($r=0,97$).

Koristeći vrijednosti indeksa loma bjelanjka i žumanjka izračunava se vrijednosni broj (VB), a predstavlja razliku vrijednosti indeksa loma žumanjka i bjelanjka pomnoženu s tisuću. U našem istraživanju utvrđen je značajan utjecaj ($P < 0,001$) vremena skladištenja na vrijednost VB. Kod svih ispitivanih tretmana VB je bio niži kod jaja skladištenih 28 dana u hladnjaku, u odnosu na svježja jaja. Vrijednosni broj kod svježih jaja kretao se od 62,86 do 63,49, dok je kod skladištenih jaja raspon bio od 59,89 do 60,46. Vidljivo je smanjenje VB sa skladištenjem jaja. **Janke i Jirak (1934.)** navode da se kod svježih jaja vrijednosni broj kreće od 62,9 do 65,5. Nadalje, **Burkhardt (1970.)** navodi da se u ovisnosti o dobi nesilica vrijednosni broj jaja kreće od 58,2 do 63,4. **Gajčević (2007.)** za svježja jaja kontrolne skupine nesilica navodi vrijednosni broj 60,20, odnosno 57,51 kod jaja skladištenih 28 dana na 4°C, dok su **Kralik i sur. (2014.)** kod svježih jaja zabilježili VB 63,26, a kod skladištenih jaja 60,50, pri čemu je utvrđen značajan utjecaj ($P < 0,05$) vremena skladištenja. Uzimajući u izračun vrijednosti indeksa loma ispitivanog i standardnog žumanjka dobiva se stupanj starenja. Rezultati prikazani u Tablici 14.b. pokazuju da je stupanj starenja jaja u uskoj vezi s vrijednosnim brojem, odnosno s opadanjem vrijednosnog broja rastao je stupanj starenja. Utvrđen je značajan utjecaj ($P < 0,001$) vremena skladištenja na porast vrijednosti stupnja starenja. Tako je najmanja vrijednost SS iznosila 1,08 kod svježih jaja K_{400} skupine, dok je najveća vrijednost od 2,65 zabilježena

kod skladištenih jaja K_{200} skupine. Prema **Janke i Jiraku (1934.)** tek sneseno jaje ima vrijednost SS od 0-0,4. U istraživanju **Kralik (1976.)** navodi prosječnu vrijednost starosnog broja svježih jaja od 0,92 do 0,94. **Gajčević (2007.)** navodi vrijednosti SS za svježa jaja kontrolne skupine 1,07, odnosno 1,24 kod jaja iz pokusne skupine. Nakon 28 dana skladištenja vrijednosti SS bile su 3,29 u kontrolnoj te 2,60 u pokusnoj skupini. U istraživanju **Kralik i sur. (2014.)** utvrđen je značajan utjecaj ($P < 0,05$) vremena skladištenja na porast vrijednosti SS konvencionalnih jaja. Tako je kod svježih jaja zabilježena vrijednost SS od 0,93, a kod jaja skladištenih 28 dana u hladnjaku SS iznosio je 1,90. Rezultati našeg istraživanja vrijednosti VB i SS u skladu su s trendovima kretanja i vrijednostima rezultata spomenutih autora.

U Tablici 15. prikazane su vrijednosti boje žumanjka određene pomoću uređaja EggMulti Tester (skala boja 1-15) te kolorimetra Minolta CR 300 (CIE Lab vrijednosti).

Tablica 15. Boja žumanjka jaja tretmana K u ovisnosti o dodanom luteinu i vremenu skladištenja (\bar{x} ; n=30 po tretmanu)

| Tretman | Vrijeme skladištenja (dani) | Boja žumanjka | | | |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | | EggMulti Tester | CIE ¹ | | |
| | | | L* | a* | b* |
| K ₀ | 1 | 9,63 ^e | 62,92 ^{ab} | 2,48 ^e | 46,63 ^c |
| | 28 | 10,30 ^d | 64,65 ^a | 4,08 ^d | 54,58 ^{ab} |
| K ₂₀₀ | 1 | 12,77 ^c | 59,71 ^{cd} | 9,51 ^c | 52,77 ^b |
| | 28 | 13,27 ^b | 61,06 ^{bc} | 11,61 ^b | 58,85 ^a |
| K ₄₀₀ | 1 | 13,50 ^b | 59,03 ^e | 11,18 ^b | 51,95 ^b |
| | 28 | 14,00 ^a | 60,82 ^{cd} | 13,54 ^a | 56,10 ^{ab} |
| SEM | | 0,102 | 0,686 | 0,407 | 1,701 |
| Izvori varijacije | | | | | |
| Tretman (T) | | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 0,012 |
| Vrijeme skladištenja (VS) | | <0,001 | 0,005 | <0,001 | <0,001 |
| T x VS | | 0,640 | 0,940 | 0,637 | 0,541 |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; a,b,c,d,e $P < 0,05$; Tretman K₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman K₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu i Tretman K₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu; ¹n=10 po tretmanu

Na dobivene razlike u boji žumanjka (EggMulti Tester) između ispitivanih skupina utjecaj je imao tretman ($P < 0,001$) i vrijeme skladištenja jaja ($P < 0,001$), dok njihova interakcija nije imala utjecaja na promatrani pokazatelj ($P = 0,640$). Uočeno je da povećanje koncentracije luteina u hrani statistički značajno utječe na povećanje vrijednosti boje žumanjka, kako kod svježih jaja $K_0 = 9,63 < K_{200} = 12,77 < K_{400} = 13,50$, tako i kod skladištenih

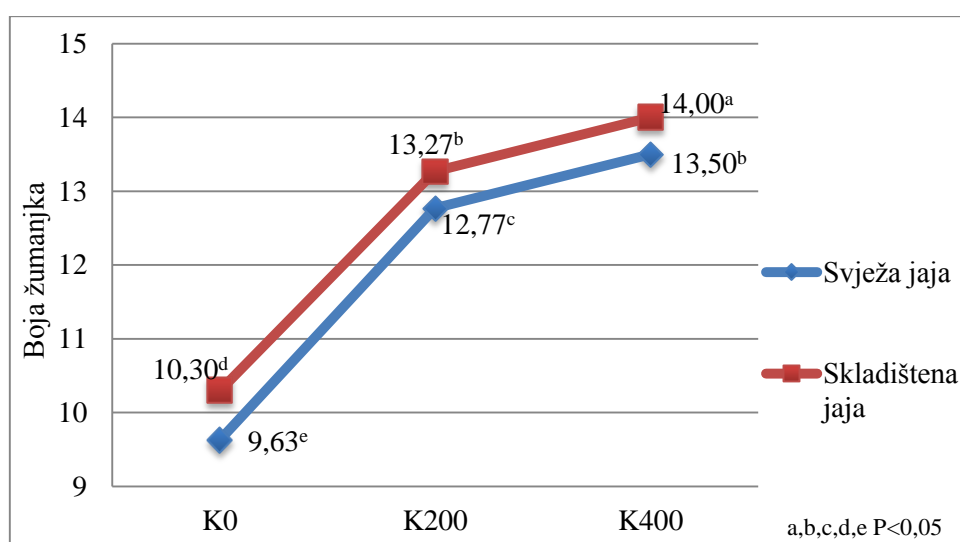
jaja $K_0=10,30 < K_{200}=13,27 < K_{400}=14,00$ (Grafikon 2.). Također je vidljiv značajno veći intenzitet boje žumanjka skladištenih jaja kod sve tri pokusne skupine.

Leeson i Caston (2004.) navode da boja žumanjka značajno ($P < 0,01$) raste s dodatkom luteina u hranu i to već nakon samo sedam dana hranidbe. Boja žumanjka ustalila se na 13/14 uz dodatak 250 mg/kg luteina u hranu, dok je u skupini bez dodatka luteina boja bila 6/7. Dodatak više od 250 mg/kg luteina nije utjecao na daljnje povećanje intenziteta boje žumanjka. Slične rezultate prikazuju **Leeson i sur. (2007.)** koji su uz dodatak 125 i 250 mg/kg luteina u hranu za nesilice ostvarili značajno povećanje boje žumanjka sa 6,6 (bez dodatka luteina) na 13,9 uz 125 mg/kg luteina, dok je uz dodatak 250 mg/kg luteina boja žumanjka iznosila 13,7. U našem istraživanju uz dodatak 200 mg/kg luteina ostvarena je prosječna boja žumanjka od 13,02. U istraživanju **Golzar Adabija i sur. (2010.)** nesilicama su u hranu dodavane tri razine luteina i to 250, 500 i 750 mg/kg, uz kontrolnu skupinu bez dodatka luteina. Autori su također primijetili značajno ($P < 0,05$) povećanje boje žumanjka s 5,5 na 13,7 nakon 7 dana hranidbe. Dodatak više od 500 mg/kg luteina nije značajno utjecao na daljnje povećanje intenziteta boje. **Jang i sur. (2014.)** uspjeli su uz dodatak samo 40 mg/kg luteina u hranu nesilica značajno ($P < 0,05$) povećati boju žumanjka sa 7,7 u kontrolnoj skupini na 9,45. **Karadas i sur. (2006.)** proveli su istraživanje u kojem su prepelicama u hranu davali različite izvore karotenoida, između ostalih i 2 g/kg ekstrakta cvijeta nevena, što je odgovaralo 10,5 mg/kg luteina. Kontrolna hrana bila je bazirana na pšenici i ječmu s niskim sadržajem karotenoida. Autori su primijetili da nakon 9 dana hranidbe dolazi do stabiliziranja boje žumanjka u skupini s ekstraktom nevena te da ona iznosi 8,84 u usporedbi s 1,58 u kontrolnoj skupini. Naši rezultati u skladu su s rezultatima navedenih autora koji potvrđuju porast intenziteta boje žumanjka s dodatkom luteina u hranu nesilica.

U našem istraživanju zabilježen je značajno veći ($P < 0,001$) intenzitet boje žumanjka kod skladištenih jaja, nego kod svježih jaja kod sva tri primijenjena tretmana. Slične rezultate dobili su **Jin i sur. (2011.)** za jaja skladištena na 5°C, gdje je boja značajno ($P < 0,001$) porasla sa 7,27 za svježja jaja na 7,85 za jaja skladištena 10 dana. Međutim, na višim temperaturama skladištenja (21°C i 29°C) bilježi se obrnut trend, odnosno smanjenje intenziteta boje žumanjka s vremenom skladištenja. U istraživanju **Akter i sur. (2014.)** također je zabilježen porast intenziteta boje žumanjka s vremenom skladištenja (28 dana) bez obzira na temperaturu (4°C ili 28-31°C), ali nisu utvrđene statistički značajne razlike ($P > 0,05$). **Carranco-Jáuregui i sur. (2006.)** spominju da skladištenje jaja na 4°C tijekom

30 dana ne utječe na intenzitet boje, dok je skladištenjem na 20°C utvrđeno značajno smanjenje intenziteta boje. **Batkowska i sur. (2014.)** također nisu utvrdili utjecaj vremena skladištenja na intenzitet boje žumanjka, pri čemu je vrijednost boje bila 13,9 za svježa odnosno 13,8 za jaja skladištena 28 dana na 15-18°C. S druge strane, **Hagan i sur. (2013.)** kao i **Kralik i sur. (2014.)** utvrdili su značajno ($P<0,05$) smanjenje intenziteta boje žumanjka skladištenjem jaja na sobnoj temperaturi odnosno u hladnjaku.

Može se pretpostaviti da povećani sadržaj luteina u žumanjcima jaja u našem istraživanju pozitivno utječe na održavanje stabilnosti, odnosno povećanja intenziteta boje, tijekom skladištenja jaja. U literaturi je vrlo malo podataka koji upućuju na porast intenziteta boje žumanjka ovisno o vremenu te temperaturi skladištenja.



Grafikon 2. Boja žumanjaka jaja pokusnih skupina tretmana K

Značajan utjecaj primjenjenih tretmana i vremena skladištenja utvrđen je i za CIE Lab pokazatelje boje. Iz podataka prikazanih u Tablici 15. vidljivo je smanjenje stupnja svjetloće žumanjka (CIE L*) s porastom sadržaja luteina u smjesama, te povećanje stupnja crvenila (CIE a*) i žutila (CIE b*) žumanjka. Skladištenje je, s druge strane, utjecalo na povećanje CIE L* vrijednosti ($P=0,005$), kao i na povećanje ($P<0,001$) CIE a* i CIE b* vrijednosti boje. CIE L* vrijednost kod svježih jaja kretala se od 62,92 (K₀) do 59,03 (K₄₀₀), a kod skladištenih jaja bio je isti trend s najvećom CIE L* vrijednosti u K₀ skupini od 64,65, a najmanjom u K₄₀₀ skupini koja je iznosila 60,82. **Englmaierová i sur. (2013.)** istraživali su utjecaj dodatka luteina (250 mg/kg) na CIE Lab pokazatelje boje žumanjka.

Utvdili su značajan utjecaj ($P < 0,001$) luteina na sve pokazatelje boje. CIE L* vrijednost smanjila se, dok su CIE a* i CIE b* vrijednosti porasle s dodatkom luteina. Tako je u skupini bez dodatka luteina izmjeren stupanj svjetloće od 64,2 (CIE L*), stupanj crvenila (CIE a*) 6,0 i stupanj žutila (CIE b*) 48,8. U skupini s luteinom navedeni pokazatelji bili su 57,5 (CIE L*), 17,7 (CIE a*) i 55,1 (CIE b*). Dodatak 100 mg/kg luteina u smjese za nesilice u istraživanju **Englmaierová i Skřivan (2013.)** uzrokovao je isti trend promjene pokazatelja boje ($P < 0,001$) sa smanjenjem CIE L* vrijednosti sa 63,1 na 61,7 i porastom CIE a* i CIE b* vrijednosti, sa 7,1 na 9,1 odnosno s 52,5 na 54,6. Navedene vrijednosti i trend smanjenja CIE L* i povećanja CIE a* i CIE b* vrijednosti u skladu su s rezultatima našeg istraživanja. **Lokaewmanee i sur. (2011.)**, kao i **Sirri i sur. (2007.)**, utvdili su značajan utjecaj dodatka luteina samo na CIE a* vrijednost boje. U njihovim istraživanjima dodavane su manje koncentracije luteina, odnosno ukupnih ksantofila nego u našem istraživanju, pa su i vrijednosti CIE L*, CIE a* i CIE b* pokazatelja niže nego u našim rezultatima.

5.2.3. Sadržaj luteina u žumanjcima jaja

Rezultati određivanja sadržaja luteina u žumanjcima jaja tretmana K prikazani su u Tablici 16. i na Grafikonu 3.

Tablica 16. Sadržaj luteina u žumanjcima jaja tretmana K (\bar{x} ; n=10 po tretmanu)

| Tretman | Vrijeme analize (tjedni) | Sadržaj luteina | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | $\mu\text{g/g}$ žumanjka | $\text{mg}/60$ g jajeta |
| K ₀ | 3. | 12,55 ^d | 0,19 ^d |
| | 5. | 12,90 ^d | 0,20 ^d |
| K ₂₀₀ | 3. | 91,32 ^{bc} | 1,42 ^{bc} |
| | 5. | 86,07 ^c | 1,34 ^c |
| K ₄₀₀ | 3. | 95,05 ^{ab} | 1,48 ^{ab} |
| | 5. | 101,81 ^a | 1,58 ^a |
| SEM | | 2,711 | 0,042 |
| Izvori varijacije | | | |
| Tretman (T) | | <0,001 | |
| Vrijeme analize (VA) | | 0,780 | |
| T x VA | | 0,096 | |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; a,b,c,d $P < 0,05$; Tretman K₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman K₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu i Tretman K₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

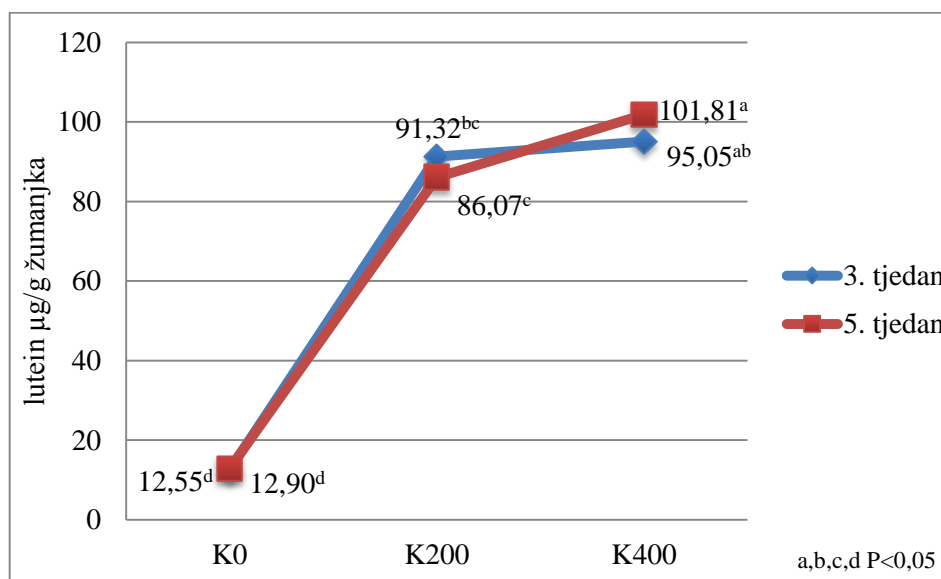
Primjećuje se visoko značajan utjecaj tretmana, odnosno razine luteina dodanog u smjese, na dobivene rezultate. Vrijeme analize nije utjecalo na razlike u sadržaju luteina između pokusnih skupina tretmana K. Rezultati analize pokazali su značajan porast sadržaja luteina u žumanjcima jaja pokusnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu. Tako je kod uzoraka jaja analiziranih 3. tjedna pokusa zabilježen porast s 12,55 µg/g u kontrolnoj skupini na 91,32 µg/g u skupini s 200 mg/kg luteina u hrani. Dodatkom 400 mg/kg luteina u hranu bilježi se daljnji porast sadržaja luteina (95,05 µg/g), međutim on se nije značajno razlikovao od vrijednosti dobivene u skupini s 200 mg/kg luteina. Kad se promatraju rezultati analize provedene 5. tjedna, odnosno na kraju pokusa, vidljivo je također značajno povećanje sadržaja luteina u žumanjcima jaja pokusnih skupina u odnosu na kontrolnu, s razlikom da je u K₄₀₀ skupini sadržaj luteina bio značajno veći (101,81 µg/g) u odnosu na K₂₀₀ skupinu (86,07 µg/g). Ako se promatraju srednje vrijednosti dobivenih rezultata, može se reći da je sadržaj luteina u pokusnim skupinama veći za 6,97 odnosno 7,73 puta u odnosu na jaja iz kontrolne skupine tj. standardna jaja prisutna na tržištu. Može se zaključiti da je značajno obogaćivanje jaja postignuto već nakon 3 tjedna hranidbe kokoši dodatkom 200 mg/kg luteina u smjese.

Poznato je da koncentracija karotenoida, pa tako i luteina, u žumanjku jajeta ovisi o njihovoj koncentraciji u hrani. Dosadašnja istraživanja potvrđuju navedeno. Tako su **Leeson i Caston (2004.)** u hranu za nesilice dodavali lutein u udjelu od 125, 250, 375, 500, 625, 750 i 1000 mg/kg. Sadržaj luteina povećan je s 0,16 mg/60 g jajeta na 1,17 mg/60 g jajeta pri 125 mg/kg luteina u hrani, odnosno na 1,49 mg/60 g jajeta pri dodatku 500 mg/kg luteina u hranu. **Golzar Adabi i sur. (2010.)** u smjese su dodavali 0, 250, 500 i 750 mg/kg luteina. Najznačajniji porast zabilježen je pri dodatku 250 mg/kg luteina, s 0,12 mg/57 g jajeta na 1,35 mg/57 g jajeta, dok je dodatak 500 mg/kg luteina povećao sadržaj lutein na 1,43 mg/57 g jajeta. Rezultati našeg istraživanja potvrđuju porast koncentracije luteina u žumanjcima s porastom sadržaja luteina u hrani i u skladu su s rezultatima navedenih autora. U našem istraživanju nesilice su dobivale 200 i 400 mg/kg luteina u hrani i za navedene vrijednosti prosječni sadržaj luteina u žumanjku bio je 1,38, odnosno 1,53 mg/60 g jajeta. Dodatkom 400 mg/kg luteina ostvarena je veća koncentracija luteina u jajetu nego u prethodno spomenutim istraživanjima pri dodatku 500 mg/kg luteina u hranu. U istraživanju **Leeson i sur. (2007.)** zabilježeno je povećanje sadržaja luteina s 0,09 mg/jajetu na 1,67 mg/jajetu već pri dodatku 125 mg/kg luteina u hranu, što je veća vrijednost nego u našem istraživanju pri dodatku 400 mg/kg luteina. Dodatak 250 mg/kg

luteina nije uzrokovao daljnje povećanje sadržaja luteina (1,61 mg/jajetu). **Nain (2011.)** je u hranu za nesilice na bazi pšenice dodao 500 mg/kg luteina i provodio hranidbeni pokus 56 dana. Sadržaj luteina analiziran je na početku pokusa te 14., 28. i 56. dana. Najveći sadržaj u pokusnoj skupini zabilježen je 28. dana pokusa i iznosio je 39,45 µg/g žumanjka, u usporedbi s 9,40 µg/g na početku pokusa. Navedena vrijednost puno je manja od naših, čak i pri dodatku 200 mg/kg luteina, iako je vidljiv trend obogaćivanja jaja. Razlog je sastav hrane za nesilice, odnosno pšenica kao osnova koja sadrži puno manje karotenoida od kukuruza (prosječno 5,7 µg/g, a kukuruz oko 35 µg/g). Također je dokazano da lutein iz hrane pokazuje sinergistički efekt kada se daje zajedno s drugim karotenoidima, primjerice iz kukuruza, što dovodi do značajnog porasta razine odlaganja karotenoida (**Scott i Eldridge, 2005.**). U istraživanju **Englmaierove i Skrivana (2013.)**, uz dodatak 100 mg/kg luteina u hranu sadržaja luteina je povećan sa 16,09 na 31,68 mg/kg suhe tvari žumanjka ($P < 0,001$), dok su **Englmaierová i sur. (2013.)** ostvarili porast sadržaja luteina s 12,80 na 133,90 mg/kg suhe tvari žumanjka ($P < 0,001$) uz dodatak 250 mg/kg luteina u hranu.

Povećanje sadržaja luteina u žumanjcima može se ostvariti i dodatkom drugih, prirodnih sastojaka bogatih luteinom. Tako su primjerice **Hammershøj i sur. (2010.)** nesilicama u hranu dodavali različite sorte mrkve, pri čemu se najboljom pokazala ljubičasta sorta koja je sadržavala prosječno 6,5 mg/kg luteina, dok je u osnovnoj smjesi bilo 2,9 mg/kg luteina. Sadržaj luteina u žumanjcima kokoši hranjenih s dodatkom ljubičaste sorte mrkve porastao je za 64% u odnosu na hranu bez dodataka mrkve, sa 7,46 µg/g na 12,23 µg/g žumanjka. **Jeon i sur. (2012.)** su dodatkom praha zelene alge *Chlorella* u udjelima od 0, 0,5, 1 ili 2% povećali sadržaj luteina u žumanjcima jaja svih pokusnih skupina u odnosu na kontrolnu. U skupini s 2% *Chlorella* praha ostvareni su najbolji rezultati a sadržaj luteina iznosio je 27,04 µg/g žumanjka u odnosu na 13,88 µg/g u kontrolnoj skupini. **Kotrbaček i sur. (2013.)** dodavali su suhu biomasu *Chlorelle* u hranu nesilica pri čemu je sadržaj luteina porastao sa 7,09 µg/g u skupini bez dodatka *Chlorelle* na 15,43 µg/g uz dodatak 2% *Chlorelle*. **Karadas i sur. (2006.)** su prepelicama u hranu dodavali 0,2% ekstrakta cvijeta kadifice bogatog luteinom i ostvarili porast sadržaja luteina s 1,65 µg/g u žumanjcima jaja kontrolne skupine hranjene hranom s niskim sadržajem karotenoida (pšenica/ječam) na 31,14 µg/g žumanjka u pokusnoj skupini. Svi ovi podaci pokazuju trend promjene sadržaja luteina u žumanjcima u ovisnosti o sadržaju luteina u hrani nesilica, odnosno dodatkom izvora luteina u hranu nesilica raste i njegov sadržaj u žumanjcima jaja, ali navedene vrijednosti puno su manje od ovih u našem istraživanju.

Na Grafikonu 3. prikazan je rast koncentracije luteina u žumanjcima jaja tretmana K u ovisnosti o sadržaju luteina u hrani i vremenu analize.



Grafikon 3. Sadržaj luteina u žumanjcima jaja tretmana K

5.2.4. Masne kiseline u žumanjcima jaja

Profil masnih kiselina u žumanjcima jaja tretmana K s 0, 200 i 400 mg/kg luteina dodanog u smjese za nesilice prikazan je u Tablici 17.

Dodatak luteina u smjese utjecao je na sadržaj masnih kiselina u žumanjcima jaja tretmana K. Kontrolna skupina (K_0) imala je značajno veći sadržaj miristinske (14:0) ($P=0,021$) i pentadekanske kiseline (15:0) ($P<0,001$) u odnosu na pokusne skupine, dok je sadržaj stearinske kiseline 18:0 ($P=0,011$) bio najmanji u navedenoj skupini. Na sadržaj ukupnih SFA lutein nije imao značajnog utjecaja ($P=0,617$). Dodatak luteina značajno je utjecao na sadržaj ukupnih MUFA ($P=0,007$) pri čemu je najveći sadržaj zabilježen u K_{200} pokusnoj skupini. I sadržaj najzastupljenije MUFA, oleinske kiseline (C18:1n9c), bio je najveći u K_{200} skupini (38,26% > 36,44% (K_0) > 35,93% (K_{400})), ali nije zabilježena statistički značajna razlika ($P=0,051$). Sadržaj ukupnih n-6 PUFA također je bio pod značajnim utjecajem luteina ($P=0,002$). Najveći sadržaj ukupnih n-6 PUFA zabilježen je u skupini s najvećim dodatkom luteina u smjesu (K_{400}) i iznosio je 22,93%. U navedenoj skupini zabilježen je i najveći sadržaj linolne (18:2n6) kiseline. Sadržaj konjugirane linolne kiseline bio je najmanji u K_{400} skupini ($P=0,041$) u usporedbi s ostale dvije skupine.

Tablica 17. Profil masnih kiselina u žumanjcima jaja tretmana K (% od ukupnih masnih kiselina; \bar{x} ; n=6 po tretmanu)

| Masna kiselina | K ₀ | K ₂₀₀ | K ₄₀₀ | P vrijednost |
|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|
| Miristinska C14:0 | 0,30 ^a ±0,06 | 0,24 ^b ±0,04 | 0,22 ^b ±0,03 | 0,021 |
| Pentadekanska C15:0 | 0,08 ^a ±0,01 | 0,05 ^c ±0,00 | 0,06 ^b ±0,01 | <0,001 |
| Palmitinska C16:0 | 27,13±2,26 | 26,01±1,60 | 26,53±0,74 | 0,514 |
| Heptadekanska C17:0 | 0,20 ^a ±0,00 | 0,16 ^b ±0,01 | 0,20 ^a ±0,02 | <0,001 |
| Stearinska C18:0 | 7,71 ^b ±0,36 | 8,29 ^{ab} ±0,19 | 8,66 ^a ±0,70 | 0,011 |
| Arahidska C20:0 | 0,02±0,00 | 0,02±0,00 | 0,02±0,01 | 0,659 |
| Heneikozanska C21:0 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,921 |
| Behenska C22:0 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,489 |
| Trikozanska C23:0 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,255 |
| Lignocerinska C24:0 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,255 |
| SFA | 35,49±2,27 | 34,80±1,61 | 35,74±0,92 | 0,617 |
| Miristoleinska C14:1 | 0,05 ^a ±0,01 | 0,04 ^{ab} ±0,01 | 0,03 ^b ±0,01 | 0,019 |
| Palmitoleinska C16:1 | 2,57 ^a ±0,38 | 2,41 ^a ±0,36 | 1,95 ^b ±0,23 | 0,014 |
| Elaidinska C18:1n9t | 0,13 ^b ±0,02 | 0,19 ^a ±0,02 | 0,17 ^a ±0,05 | 0,012 |
| Oleinska C18:1n9c | 36,44±1,36 | 38,26±1,86 | 35,93±1,46 | 0,051 |
| Oktedekanska izomer C18:1 (cis) | 1,08±0,13 | 1,20±0,11 | 1,06±0,11 | 0,103 |
| Oktedekanska izomer C18:1 (trans) | 0,17±0,04 | 0,35±0,12 | 0,41±0,28 | 0,080 |
| Eikozenska C20:1n9 | 0,13±0,04 | 0,14±0,02 | 0,12±0,02 | 0,392 |
| MUFA | 40,57^b±1,14 | 42,60^a±1,69 | 39,67^b±1,24 | 0,007 |
| Linolna C18:2n6 | 20,03 ^a ±0,77 | 18,29 ^b ±1,04 | 20,76 ^a ±1,02 | 0,001 |
| Oktadekadienska izomer (A) C18:2 | 0,04 ^b ±0,01 | 0,07 ^a ±0,03 | 0,07 ^a ±0,01 | 0,022 |
| Oktadekadienska izomer (B) C18:2 | 0,04±0,01 | 0,06±0,02 | 0,08±0,05 | 0,167 |
| Oktadekadienska izomer (C) C18:2 | 0,02 ^b ±0,00 | 0,04 ^a ±0,01 | 0,04 ^a ±0,00 | 0,005 |
| Oktadekadienska izomer (D) C18:2 | 0,02±0,00 | 0,04±0,02 | 0,03±0,01 | 0,017 |
| γ-linolenska C18:3n6 | 0,10±0,01 | 0,10±0,01 | 0,12±0,03 | 0,149 |
| c9,t11-CLA | 0,020 ^a ±0,00 | 0,020 ^a ±0,00 | 0,016 ^b ±0,00 | 0,041 |
| Eikozadienska C20:2 | 0,13±0,04 | 0,13±0,02 | 0,13±0,01 | 0,969 |
| Eikozatrienska C20:3n6 | 0,14±0,02 | 0,16±0,01 | 0,16±0,01 | 0,075 |
| Arahidonska C20:4n6 | 1,31±0,08 | 1,37±0,13 | 1,43±0,11 | 0,199 |
| Dokozatetraenska C22:4n6 | 0,09±0,03 | 0,11±0,01 | 0,11±0,04 | 0,261 |
| n-6 PUFA | 21,95^a±0,92 | 20,39^b±1,11 | 22,93^a±1,02 | 0,002 |
| α-linolenska C18:3n3 | 0,86 ^a ±0,09 | 0,73 ^b ±0,08 | 0,84 ^a ±0,06 | 0,024 |
| Eikozatrienska C20:3n3 | 0,01±0,01 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,255 |
| Eikozapentaenska C20:5n3 | 0,02 ^a ±0,00 | 0,01 ^b ±0,00 | 0,01 ^b ±0,00 | 0,003 |
| Dokozapentaenska C22:5n3 | 0,09±0,05 | 0,08±0,02 | 0,10±0,04 | 0,834 |
| Dokozaheksaenska C22:6n3 | 0,66±0,04 | 0,58±0,09 | 0,61±0,12 | 0,376 |
| n-3 PUFA | 1,64^a±0,10 | 1,42^b±0,17 | 1,57^{ab}±0,10 | 0,021 |
| n-6/n-3 PUFA | 13,45±1,17 | 14,50±1,16 | 14,69±1,23 | 0,183 |

\bar{x} =aritmetička sredina, s=standardna devijacija; a,b,c P<0,05; Tretman K₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman K₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu i Tretman K₄₀₀ dodano= 400 mg/kg luteina u smjesu

Najmanji sadržaj ukupnih n-6 PUFA bio je u K₂₀₀ skupini (20,39%), dok se onaj u kontrolnoj skupini (21,95%) nije značajno razlikovao od vrijednosti K₄₀₀ skupine (22,93%). Najpovoljniji sadržaj poželjnih n-3 PUFA bio je u kontrolnoj skupini (1,64%), na što je utjecao nešto veći sadržaj α -linolenske i dokozaheksaenske kiseline u odnosu na preostale dvije skupine. Skupine s dodatkom luteina u smjese imale su manji sadržaj kako α -linolenske kiseline tako i ostalih n-3 PUFA, što je u konačnici rezultiralo i manjim sadržajem ukupnih n-3 PUFA. Iz navedenih razloga je i omjer n-6/n-3, za kojeg je poželjno da bude što manji, bio najpovoljniji u kontrolnoj skupini (13,45), dok je u pokusnim skupinama bio nepovoljniji tj. veći i iznosio je 14,50 (K₂₀₀), odnosno 14,69 (K₄₀₀) (P=0,183).

U literaturi postoji vrlo malo podataka o utjecaju luteina iz hrane na sastav masnih kiselina žumanjka. **Nain (2011.)** proveo je pokus u kojem je nesilicama u hranu dodavano 500 mg/kg luteina i analiziran je profil masnih kiselina u žumanjku nakon 56 dana hranidbe, u usporedbi sa skupinom bez dodatka luteina u hranu (kontrola). Sadržaj ukupnih SFA, ukupnih n-3 i n-6 PUFA u žumanjcima jaja pokusne skupine nije se značajno razlikovao od vrijednosti u kontrolnoj skupini, iako se sadržaj SFA smanjio, a sadržaj n-3 PUFA povećao s dodatkom luteina. Autor napominje da je to i očekivano s obzirom da hrana s dodatkom luteina nije sadržavala dodatne izvore masnih kiselina. Sadržaj MUFA, kao i omjer n-6/n-3 u skupini s luteinom bio je značajno manji nego u kontrolnoj skupini. U našem slučaju dodatak 400 mg/kg luteina nije utjecao na sadržaj ukupnih SFA, MUFA, n-6 i n-3 PUFA, kao niti na omjer n-6/n-3 PUFA. Iako nije utvrđena statistička značajnost, omjer n-6/n-3 PUFA u našem istraživanju bio je veći nego u kontrolnoj skupini, što nije u skladu s rezultatima navedenog autora. U istraživanju **Yanar i sur. (2007.)** provedenom na kalifornijskoj pastri uz dodatak 1,8% brašna kadifice u hranu utvrđeno je značajno povećanje (P<0,05) sadržaja C14:0, C16:0 i C18:0 masnih kiselina. Ujedno je povećan i sadržaj ukupnih SFA. Sadržaj mononezasićenih masnih kiselina C16:1n7 i C18:1n9 značajno je smanjen (P<0,05) u odnosu na kontrolu, a isto je primijećeno i za sadržaj ukupnih MUFA. Kod polinezasićenih masnih kiselina primijećen je porast sadržaja C20:5n3 i C22:6n3 kao i ukupnih PUFA. U našem istraživanju sadržaj C14:0 i C16:0 masnih kiselina bio je manji u odnosu na kontrolu te stoga nije u skladu s rezultatima navedenih autora. Sadržaj C:18 je porastao (P=0,011) u obje pokusne skupine što odgovara rezultatima spomenutih autora, dok je sadržaj ukupnih SFA bio veći uz dodatak 400 mg/kg luteina u hranu, dok je u skupini s 200 mg/kg luteina bio manji u odnosu na kontrolu, ali

nije utvrđena statistička značajnost. Naši rezultati pokazali su smanjenje sadržaja C16:1 kod obje ($P=0,014$) razine dodatka luteina, što je u skladu s rezultatima prethodno spomenutih autora, dok je sadržaj C18:1 ($P=0,051$) i ukupnih MUFA ($P=0,007$) smanjen samo u skupini s dodatkom 400 mg/kg luteina. U skupini s dodatkom 200 mg/kg luteina došlo je do porasta sadržaja navedenih masnih kiselina. Sadržaj polinezasićenih masnih kiselina u našem istraživanju smanjio se u odnosu na kontrolu što nije sukladno rezultatima **Yanar i sur. (2007.)**.

Utjecaj dodatka cvijeta kadifice u udjelima od 10 i 20 g/kg u hranu za nesilice na sastav masnih kiselina žumanjka istraživali su **Altuntaş i Aydin (2014.)**. Autori su utvrdili značajno povećanje ($P<0,01$) sadržaja C16:0 i C18:0 te istovremeno smanjenje ($P<0,01$) sadržaja C16:1n7 i C18:1n9 za obje razine dodatka luteina. Sadržaj ukupnih SFA bio je veći a sadržaj ukupnih MUFA manji ($P<0,05$) u odnosu na kontrolu. Kako je već navedeno, u našem istraživanju sadržaj C16:0 bio je manji uz dodatak luteina u hranu, dok je sadržaj C18:0 porastao u odnosu na kontrolu samo u skupini s dodatkom 400 mg/kg luteina. Promatrajući navedenu skupinu, vidljivo je da je sadržaj i C16:1 i C18:1 manji u odnosu na kontrolu što je sukladno rezultatima spomenutih autora. Također, sadržaj ukupnih SFA i MUFA u skupini s 400 mg/kg luteina u skladu je s rezultatima **Altuntaş i Aydin (2014.)**, tj. sadržaj SFA je porastao (ali ne statistički značajno) a MUFA se smanjio u odnosu na kontrolnu skupinu. Autori pretpostavljaju da je dodatak kadifice u hranu nesilica povećao omjer SFA prema MUFA djelovanjem na snižavanje aktivnosti stearoil-CoA desaturaze (SCD), enzima koji pretvara C16:0 u C16:1n-7 i C18:0 u C18:1n9. Za određene masne kiseline, kao što su konjugirana linolna kiselina i konjugirane trienske (tri dvostruke veze) kiseline, pokazano je inhibitorno djelovanje na SCD. Kadifica prirodno sadrži konjugiranu triensku masnu kiselinu, kalendinsku kiselinu (C18:3n6), za koju se vjeruje da inhibira enzim stearoil-CoA desaturazu i na taj način utječe na smanjenje pretvorbe zasićenih u nezasićene masne kiseline, odnosno smanjenje sadržaja nezasićenih masnih kiselina (**Altuntaş i Aydin, 2014.**). Možda je razlog nedosljednim rezultatima koji se javljaju u našoj K₂₀₀ skupini posljedica dodatka luteina, a ne praha cvijeta kadifice koji sadrži kalendinsku kiselinu, te se stoga u našim rezultatima javljaju odstupanja od trenda porasta odnosno smanjenja sadržaja pojedinih masnih kiselina.

5.2.5. Oksidacija lipida u žumanjcima jaja

Rezultati određivanja oksidacije lipida u žumanjcima jaja K tretmana, iskazani u μg MDA/g žumanjka, prikazani su u Tablici 18. i na Grafikonu 4.

Iz rezultata prikazanih u Tablici 18. vidljiv je značajan utjecaj ($P=0,002$) vremena analize, odnosno trajanja skladištenja jaja, na vrijednosti oksidacije lipida u žumanjcima. Tretman nije utjecao na dobivene vrijednosti ($P=0,649$). U skupinama tretmana K vrijednosti oksidacije lipida kreću se od $0,545 \mu\text{g}$ MDA/g za svježja jaja K_{400} skupine do $0,665 \mu\text{g}$ MDA/g za jaja kontrolne skupine čuvana 28 dana u hladnjaku. Najpovoljnija (najmanja) vrijednost oksidacije, zabilježena u K_{400} skupini ($0,545 \mu\text{g}$ MDA/g), nije se značajno razlikovala od rezultata ostalih skupina ($0,560 \mu\text{g}$ MDA/g K_0 odnosno $0,565 \mu\text{g}$ MDA/g K_{200}), ali može biti naznaka zaštitnog antioksidativnog djelovanja luteina. Vidljiv je porast vrijednosti oksidacije s vremenom čuvanja jaja te nešto niže vrijednosti u žumanjcima jaja pokusnih skupina nakon 28 dana čuvanja u usporedbi s kontrolom, iako razlike nisu bile statistički značajne. Najpovoljnija vrijednost nakon čuvanja jaja zabilježena je u K_{200} skupini i iznosila je $0,615 \mu\text{g}$ MDA/g žumanjka.

Tablica 18. Vrijednosti lipidne oksidacije (TBARS) u žumanjcima jaja tretmana K (\bar{x} ; n=10 po tretmanu)

| Tretman | Vrijeme analize (dani) | TBARS (μg MDA/g žumanjka) |
|--------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| K_0 | 1. | $0,560^b$ |
| | 28. | $0,665^a$ |
| K_{200} | 1. | $0,565^b$ |
| | 28. | $0,615^{ab}$ |
| K_{400} | 1. | $0,545^b$ |
| | 28. | $0,629^{ab}$ |
| SEM | | 0,030 |
| Izvori varijacije | | |
| Tretman (T) | | 0,649 |
| Vrijeme analize (VA) | | 0,002 |
| T x VA | | 0,656 |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; ^{a,b} $P<0,05$; Tretman K_0 = bez dodatka luteina u smjesu, Tretman K_{200} = dodano 200 mg/kg luteina u smjesu i Tretman K_{400} = dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

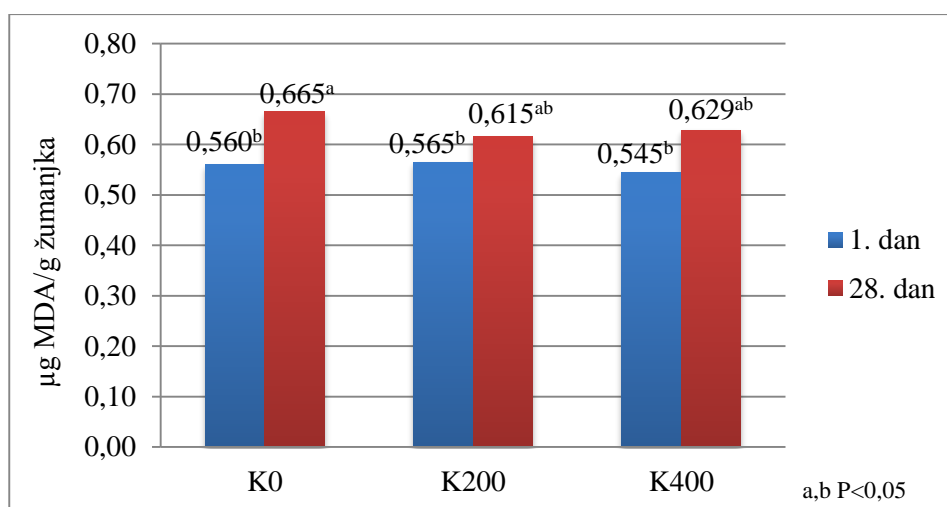
Akter i sur. (2014.) utvrdili su značajan utjecaj ($P<0,05$) vremena skladištenja (28 dana) na porast TBARS vrijednosti žumanjaka jaja čuvanih na 4°C , što je u skladu s našim

rezultatima. **Englmaierová i sur. (2013.)** utvrdili su značajan utjecaj ($P < 0,001$) dodatka luteina (250 mg/kg) na poboljšanje oksidativne stabilnosti lipida žumanjka tijekom čuvanja jaja 28 dana na 18°C. Tako je na svježim jajima zabilježeno 1,17 mg MDA/kg u kontrolnoj skupini i 0,87 mg MDA/kg u pokusnoj skupini. Vrijednosti analizirane nakon 28 dana skladištenja bile su 1,28, odnosno 1,04 mg MDA/kg. Vidljiv je pozitivan utjecaj luteina na smanjenje oksidacije lipida. Rezultati navedenih autora veći su od naših, ali u skladu su s trendom smanjenja oksidacije u žumanjcima pri dodatku luteina u hranu primijećenim u našem istraživanju, iako nije utvrđen statistički značajan utjecaj tretmana. Nadalje, vjerojatno je i temperatura čuvanja jaja (4°C u odnosu na 18°C) utjecala na manje rezultate dobivene u našem istraživanju. **Nain (2011.)** istraživao je utjecaj dodatka luteina (500 mg/kg) u smjese za nesilice na oksidaciju lipida u žumanjcima svježih jaja i jaja čuvanih 30 dana na 4°C. Njegovi rezultati pokazuju značajan utjecaj vremena čuvanja, ali i dodatka luteina, na TBARS vrijednosti. Tako je kod svježih jaja kontrolne skupine izmjereno 0,6142 mg MDA/kg žumanjka, a u pokusnoj skupini 0,4960 mg MDA/kg. Iako nije utvrđena statistički značajna razlika, vidljiv je izražen utjecaj luteina u smanjenju intenziteta oksidacije u žumanjcima jaja pokusne skupine. U našem istraživanju nije bilo znatnije razlike između vrijednosti oksidacije lipida žumanjaka svježih jaja, iako je u skupini s 400 mg/kg luteina zabilježena nešto niža vrijednost oksidacije nego kod kontrolne skupine. Kod jaja čuvanih 30 dana na 4°C **Nain (2011.)** utvrdio je TBARS vrijednosti od 0,7523 mg MDA/kg žumanjka u kontrolnoj skupini te 0,5632 mg MDA/kg žumanjka u skupini s dodatkom 500 mg/kg luteina. Utvrđena vrijednost oksidacije kod kontrolne skupine bila je značajno veća s obzirom na svježa jaja, dok se vrijednost oksidacije u pokusnoj skupini nije razlikovala od vrijednosti zabilježene kod svježih jaja, ali je bila značajno manja od vrijednosti izmjerene kod čuvanih jaja kontrolne skupine (zaštitno djelovanje luteina tijekom čuvanja jaja). U našem istraživanju nije utvrđen značajan utjecaj luteina na smanjenje oksidacije, kako kod svježih tako i kod čuvanih jaja, ali je vidljiv pozitivan utjecaj luteina budući da su vrijednosti oksidacije u pokusnim skupinama bile manje u usporedbi s kontrolnom skupinom (Grafikon 4.).

Budući da je jaje zatvoren sustav, pri čemu ljuska štiti unutarnji sadržaj od izloženosti kisiku i oksidirajućim tvarima, pojava oksidativnih reakcija je minimalna. Prisutnost prirodnih antioksidativnih tvari, kao što je lecitin, dodatno pojačava antioksidativnu zaštitu. Skladištenjem konzumnih jaja u hladnjaku razvoj oksidativnih produkata je neznatan, dok skladištenje na sobnoj temperaturi uzrokuje porast TBARS-a i smanjenje

sadržaja antioksidanasa (npr. vitamin E) u jajima koji se troše u oksidativnim procesima (Franchini i sur., 2002.).

Na Grafikonu 4. prikazane su navedene vrijednosti, pri čemu se bolje vidi utjecaj vremena analize jaja s većim vrijednostima oksidacije lipida kod jaja analiziranih nakon 28 dana čuvanja. Kod jaja K skupina navedene razlike bile su značajne samo u kontrolnoj skupini. Također je vidljiva smanjena oksidacija lipida kod pokusnih skupina nakon 28 dana čuvanja jaja u odnosu na kontrolnu, iako razlike nisu bili statistički značajne ($P=0,649$).



Grafikon 4. Oksidacija lipida u žumanjcima jaja tretmana K mjerena na svježim jajima (1. dan) i jajima čuvanima 28 dana u hladnjaku na 4°C

5.2.6. Biokemijski pokazatelji u krvi nesilica

Rezultati određivanja sadržaja biokemijskih pokazatelja u krvi nesilica K skupina prikazani su u Tablici 19. Dodatak luteina u smjese nije značajno utjecao na vrijednosti biokemijskih pokazatelja u krvi nesilica tretmana K ($P>0,05$). Vrijednosti kreatinina (CRE), proteina (PROT), triglicerida (TGC) te aktivnost superoksid dismutaze (SOD) bili su ujednačeni između pokusnih skupina. Najveća vrijednost gama glutamil transferaze (GGT) zabilježena je u K₂₀₀ skupini, slijedi K₄₀₀ te K₀ skupina. Vrijednosti sadržaja glukoze (GUK) rasle su s porastom sadržaja luteina u smjesama dok je kod uree (UREA) i albumina (ALB) situacija bila obrnuta. Sadržaj glukoze bio je najmanji u kontrolnoj skupini (9,56 mmol/L), a najveći u K₄₀₀ skupini (10,18 mmol/L), dok su najveće vrijednosti uree i albumina utvrđene u kontrolnoj skupini (0,69 mmol/L odnosno 19,1 g/L), a najmanje u K₄₀₀ skupini (0,53

mmol/L odnosno 17,9 g/L). Utvrđene vrijednosti nisu bile statistički različite. Sadržaj ukupnog kolesterola (KOL) i HDL kolesterola bio je najveći u kontrolnoj skupini, a najmanji u skupini s 200 mg/kg luteina, dok je sadržaj navedenih pokazatelja u K₄₀₀ bio između tih vrijednosti. Najveća koncentracija enzima SOD-e izmjerena je u K₄₀₀ skupini (0,684 U/L), zatim u kontrolnoj skupini (0,670 U/L), a najmanja u K₂₀₀ skupini (0,664 U/L).

Tablica 19. Prosječne vrijednosti biokemijskih pokazatelja u krvi nesilica tretmana K (\bar{x} ; n=7 po tretmanu)

| Pokazatelj | Tretman | | | SEM | P vrijednost |
|---------------|----------------|------------------|------------------|-------|--------------|
| | K ₀ | K ₂₀₀ | K ₄₀₀ | | |
| GGT (U/L) | 19,1 | 24,4 | 21,5 | 2,856 | 0,438 |
| GUK (mmol/L) | 9,56 | 10,12 | 10,18 | 0,452 | 0,582 |
| UREA (mmol/L) | 0,69 | 0,59 | 0,53 | 0,046 | 0,076 |
| CRE (μmol/L) | 24,2 | 24,5 | 23,8 | 0,681 | 0,777 |
| PROT (g/L) | 52,7 | 50,6 | 51,2 | 1,980 | 0,747 |
| ALB (g/L) | 19,1 | 18,2 | 17,9 | 0,533 | 0,277 |
| KOL (mmol/L) | 4,19 | 3,21 | 3,89 | 0,484 | 0,361 |
| HDL (mmol/L) | 1,40 | 0,86 | 1,11 | 0,326 | 0,517 |
| TGC (mmol/L) | 18,2 | 18,1 | 18,2 | 1,189 | 0,997 |
| SOD (U/L) | 0,670 | 0,664 | 0,684 | 0,036 | 0,926 |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; K₀= bez dodatka luteina u smjesu, K₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu i K₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

Istraživanja o utjecaju luteina dodanog u smjese za nesilice na biokemijske pokazatelje u krvi nisu dostupna u literaturi, stoga se rezultati biokemijskih pokazatelja uspoređuju s rezultatima istraživanja koja su koristila nesilice slične dobi.

Pavlik i sur. (2007.) istraživali su kretanje biokemijskih pokazatelja u krvi nesilica držanih u konvencionalnim kavezima tijekom 22. i 47. tjedna starosti nesilica. U našem istraživanju, u trenutku uzorkovanja krvi, nesilice su bile u 36. tjednu starosti. Stoga su srednje vrijednosti rezultata navedenih autora usporedive s našima. Autori su utvrdili koncentraciju ukupnih proteina od 55 g/L, glukoze oko 13,1 mmol/L te ukupnog

kolesterola 3,7 mmol/L. Navedene vrijednosti proteina i glukoze malo su više od utvrđenih u našem istraživanju dok razina kolesterola ne odstupa previše od naših rezultata. **Capcarova i sur. (2008.)** određivali su biokemijske pokazatelje u krvi nesilica tijekom devetog mjeseca proizvodnje. Utvrdili su nešto više vrijednosti za proteine (55,8 mmol/L), TGC (20,9 mmol/L) i GUK (13,38 mmol/L) nego što su vrijednosti u našem istraživanju. Razina kolesterola (4,32 mmol/L) bila je na razini naših vrijednosti kontrolne skupine. Utvrđivanje biokemijskih pokazatelja u krvi dva genotipa nesilica u dobi od 3 do 72 tjedna starosti proveli su **Gyenis i sur. (2006.)**. Između ostalih dobi, analiza je provedena i na nesilicama u dobi od 30 tjedana, što je usporedivo s nesilicama u našem istraživanju. Njihove prosječne vrijednosti proteina (~40 g/L), TGC (~4 mmol/L), KOL (~1,6 mmol/L) i HDL (~0,2 mmol/L) kolesterola znatno su niže nego u našem istraživanju. Prosječne vrijednosti sadržaja CRE (~18 µmol/L) za oba genotipa bile su nešto niže nego što je utvrđeno u našem istraživanju, dok je sadržaj ALB (~19,5 g/L) usporediv s našim vrijednostima. U istraživanju **Bhatti i sur. (2002.)** analiziran je utjecaj probiotika na biokemijske i hematološke pokazatelje krvi četiri različita genotipa kokoši nesilica (Cross, Desi, Fayoumi, Nick Chick; Pakistan). Za usporedbu s našim rezultatima korištene su srednje vrijednosti podataka kontrolnih skupina u kojima nesilice nisu tretirane probiotikom. Zabilježene su sljedeće vrijednosti: GUK 11,9 mmol/L, PROT 57,5 g/L, ALB 13,6 g/L te KOL 3,65 mmol/L. Sadržaj ALB nešto je niži, a sadržaj GLU i PROT nešto viši nego u našem istraživanju. Sadržaj KOL odgovara vrijednostima zabilježenima u našim pokusnim skupinama.

5.3. Tretman O

5.3.1. Proizvodni pokazatelji nesilica

Na početku i na kraju pokusa nesilice su izvagane, a njihova masa prikazana je u Tablici 20.

Tablica 20. Masa nesilica na početku i na kraju istraživanja ($\bar{x} \pm s$)

| Obilježje | O ₀ | O ₂₀₀ | O ₄₀₀ | P vrijednost |
|---|----------------|------------------|------------------|--------------|
| Masa nesilica na početku istraživanja (g) | 1907 ± 125 | 1900 ± 119 | 1892 ± 89 | 0,658 |
| Masa nesilica na kraju istraživanja (g) | 2027 ± 136 | 2023 ± 14 | 2013 ± 117 | 0,764 |

\bar{x} =aritmetička sredina; s=standardna devijacija; O₀= bez dodatka luteina u smjesu, O₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu, O₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

Lutein dodan u hranu, u kombinaciji s uljima bogatima omega-3 masnim kiselinama, nije utjecao na mase nesilica u tretmanu O ($P > 0,05$). Najveća početna i završna masa nesilica zabilježene su u O₀ skupini (1907 g i 2027 g), a slijede skupine O₂₀₀ (1900 g i 2023 g) te O₄₀₀ (1892 g i 2013 g).

Proizvodni pokazatelji nesilica tretmana O bilježeni tijekom 5 tjedana pokusnog razdoblja prikazani su u Tablici 21.

Tablica 21. Proizvodni pokazatelji nesilica tretmana O bilježeni tijekom 5 tjedana pokusnog razdoblja

| Pokazatelj | O ₀ | O ₂₀₀ | O ₄₀₀ |
|---------------------------------------|----------------|------------------|------------------|
| Broj nesilica na početku istraživanja | 93 | 98 | 100 |
| Broj nesilica na kraju istraživanja | 93 | 97 | 99 |
| Uginuće | 0 | 1 | 1 |
| Ukupno jaja | 3108 | 3316 | 3367 |
| Broj jaja po nesilici | 33,42 | 34,19 | 34,01 |
| Intenzitet nesivosti % | 95,48 | 97,67 | 97,17 |
| Konzumacija hrane (g/dan) | 127,8 | 129,01 | 124,96 |
| Utrošak hrane (g/jajetu) | 133,84 | 132,07 | 128,60 |

O₀= bez dodatka luteina u smjesu, O₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu, O₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

U O₀ skupini nije bilo uginuća tijekom pokusnog razdoblja, dok je u skupinama O₂₀₀ i O₄₀₀ uginula po jedna nesilica. Najveća proizvodnja jaja i najpovoljniji utrošak hrane po jajetu zabilježeni su u O₄₀₀ skupini s ukupno proizvedenih 3367 komada jaja te potrošenih 128,60

g hrane za proizvodnju jednog jajeta. Slijede O₂₀₀ skupina s 3316 kom. jaja i utroškom hrane od 132,07 g te O₀ skupina s ukupno proizvedenih 3108 jaja i utroškom hrane od 133,84 g po jajetu. Potrebno je naglasiti da je u O₀ skupini uginulo ukupno 7 nesilica prije početka pokusnog razdoblja, zbog čega je i broj proizvedenih jaja manji u usporedbi sa skupinama O₂₀₀ i O₄₀₀. Najbolji intenzitet nesivosti bio je u O₂₀₀ skupini s 97,67%. U O₄₀₀ skupini intenzitet nesivosti iznosio je 97,17%, dok je u O₀ bio najmanji sa 95,48%.

U istraživanju koje su proveli **Leeson i sur. (2007.)** praćen je utjecaj dodatka luteina (0, 125 i 250 mg/kg) i lana (10%) u hranu nesilica na proizvodne pokazatelje. Različite kombinacije luteina i lana u hrani nisu utjecale na konzumaciju hrane, kao ni na proizvodnju jaja ($P>0,05$), ali primijećena je nešto manja proizvodnja jaja u skupini nesilica hranjenih s 10% lana i 250 mg/kg luteina u odnosu na skupine sa 125 mg/kg luteina i bez dodatka luteina. Autori napominju da bi smanjena proizvodnja jaja mogla biti posljedica manjeg unosa hrane i antinutritivnih komponenti koje sadrže lanene sjemenke. U našem istraživanju proizvodnja jaja u skupinama s dodanim luteinom bila je ujednačena. Neka istraživanja navode da dodatak sjemenki lana može smanjiti konzumaciju hrane, masu kokoši i proizvodnju jaja, ali **Leeson i sur. (2007.)** nisu utvrdili negativan utjecaj dodatka lana na navedene proizvodne pokazatelje nesilica. S druge strane, nesilicama se može davati laneno ulje s ciljem povećanja sadržaja omega-3 masnih kiselina, bez negativnih utjecaja na proizvodne pokazatelje (**Grobas i sur., 2001.**). Nadalje, **Kralik i sur. (2008.b)** nisu utvrdili značajnu razliku za masu nesilica, broj jaja po nesilici, intenzitet nesivosti i konzumaciju hrane između skupina hranjenih različitim omjerom ribljeg i repičinog ulja (3,5% ribljeg i 1,5% repičinog ulja te 1,5% ribljeg i 3,5% repičinog ulja). Naši rezultati u skladu su s rezultatima navedenih autora.

5.3.2. Pokazatelji kvalitete jaja

U Tablicama 22., 23.a., 23.b. i 24. prikazani su pokazatelji vanjske i unutarnje kvalitete jaja mjereni na svježim jajima i jajima skladištenima 28 dana u hladnjaku na +4°C.

Od vanjskih pokazatelja analizirani su dužina i širina jaja, indeks oblika, masa jaja, čvrstoća i debljina ljuske. Iz rezultata analize prikazanih u Tablici 22. vidljivo je da lutein dodan u hranu nesilica nije utjecao ($P>0,05$) na pokazatelje vanjske kvalitete jaja. Vrijeme skladištenja nije utjecalo ($P>0,05$) na dužinu i širinu jaja te indeks oblika, kao niti na

čvrstoću ljuske, ali zabilježen je značajan utjecaj na masu jaja ($P=0,002$) i debljinu ljuske ($P<0,001$).

Najmanja dužina (56,77 mm) izmjerena je u O_{200} skupini kod svježih jaja, kao i u O_{400} skupini kod skladištenih jaja. Najveća dužina (56,97 mm) zabilježena je u O_{200} skupini kod skladištenih jaja. Širina jaja kretala se od 43,47 mm u O_0 skupini (svježa jaja) do 43,77 mm u O_{200} skupini (skladištena jaja). Prosječna vrijednost indeksa oblika analiziranih jaja kretala se od 76,51% (O_0 svježa) do 76,90% (O_{400} skladištena). Jaje je uobičajeno ovalnog oblika, pri čemu je jedan kraj jajeta širi i sužava se prema drugom kraju. Ovisno o vrijednosti indeksa oblika, jaja se mogu rasporediti u tri kategorije: duguljasta ($<72\%$), normalna (72-76%) i okruglasta ($>76\%$) (**Altuntaş i Şekeroğlu, 2008.**). **Kralik i sur. (2012.)** navode da je najoptimalnija vrijednost indeksa oblika jaja 74%, pri čemu je napuknuće ljuske pri operacijama klasiranja, pakiranja i transporta jaja minimalno. Prema navedenim vrijednostima može se zaključiti da su jaja u našem istraživanju okruglasta, jer je indeks oblika u svim ispitivanim skupinama prelazio 76%. **Nikolova i Kocevski (2006.)** navode da dob nesilica i godišnje doba imaju značajan utjecaj ($P<0,01$) na indeks oblika. Njihovi rezultati pokazali su da mlađe nesilice (<45 tjedana starosti) nesu jaja s indeksom oblika 76,27%, dok jaja starijih nesilica (>45 tjedana) imaju indeks oblika 74,17%. Prosječan indeks oblika jaja mlađih kokoši proizvedenih u kolovožu i rujnu iznosio je 76,62%. Naš pokus odvijao se tijekom kolovoza i rujna 2013. godine, a u trenutku analize jaja nesilice su bile u 36. tjednu starosti (mlade nesilice) pa prema tome naši rezultati za indeks oblika, s vrijednostima većim od 76%, odgovaraju rezultatima navedenih autora.

Analizirana jaja pripadala su u težinski razred M (53-63 g). Prosječna masa svježih jaja iznosila je 60,22 g, a skladištenih jaja 59,36 g. Iz podataka je vidljivo da se masa jaja smanjuje s vremenom skladištenja. Iako dodatak luteina nije utjecao na masu jaja ($P=0,522$), prosječno najveća masa kod svježih jaja bila je u kontrolnoj skupini (60,34 g) i smanjivala se u pokusnim skupinama (60,29 g te 60,03 g). Kod jaja čuvanih 28 dana u hladnjaku na $+4^{\circ}\text{C}$ najveća masa zabilježena je u O_{200} skupini (59,53 g), a slijede O_0 (59,44 g) te O_{400} skupina (59,12 g). Zabilježen je značajan utjecaj ($P=0,002$) vremena skladištenja na masu jaja. Tijekom skladištenja masa jaja smanjila se za 1,49% (O_0), 1,26% (O_{200}) te 1,52% (O_{400}). Smanjenje mase jaja tijekom skladištenja posljedica je gubitka odnosno isparavanja vode iz jajeta, a ovisi o uvjetima i dužini skladištenja.

Tablica 22. Pokazatelji vanjske kvalitete jaja tretmana O (\bar{x} ; n=30 po tretmanu)

| Tretman | Vrijeme skladištenja (dani) | Dužina jaja (mm) | Širina jaja (mm) | Indeks oblika (%) | Masa jaja (g) | Čvrstoća ljuske (kg/cm ²) | Debljina ljuske (mm) |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------|---------------------------------------|----------------------|
| O ₀ | 1 | 56,83 | 43,47 | 76,51 | 60,34 ^a | 3,313 | 0,366 ^{cd} |
| | 28 | 56,90 | 43,73 | 76,89 | 59,44 ^{ab} | 3,081 | 0,377 ^{ab} |
| O ₂₀₀ | 1 | 56,77 | 43,57 | 76,79 | 60,29 ^a | 3,211 | 0,363 ^d |
| | 28 | 56,97 | 43,77 | 76,83 | 59,53 ^{ab} | 3,337 | 0,380 ^a |
| O ₄₀₀ | 1 | 56,80 | 43,50 | 76,60 | 60,03 ^{ab} | 3,335 | 0,369 ^{bed} |
| | 28 | 56,77 | 43,63 | 76,90 | 59,12 ^b | 3,316 | 0,373 ^{abc} |
| SEM | | 0,227 | 0,144 | 0,345 | 0,332 | 0,100 | 0,003 |
| Izvori varijacije | | | | | | | |
| Tretman (T) | | 0,914 | 0,780 | 0,950 | 0,522 | 0,428 | 0,931 |
| Vrijeme skladištenja (VS) | | 0,675 | 0,091 | 0,401 | 0,002 | 0,612 | <0,001 |
| T x VS | | 0,876 | 0,899 | 0,877 | 0,970 | 0,198 | 0,127 |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; a,b,c,d P<0,05; Tretman O₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman O₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu, Tretman O₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

Jaja čuvana na višoj temperaturi dulje vrijeme imaju veći gubitak mase od jaja skladištenih na nižim temperaturama. **Akter i sur. (2014.)** navode značajano ($P < 0,05$) smanjenje mase jaja od 3,8% nakon 28 dana skladištenja u hladnjaku. U istraživanju **Kralik i sur. (2014.)** utvrđeno je također smanjenje mase omega-3 jaja tijekom skladištenja u trajanju od 28 dana u hladnjaku, sa 60,46 na 59,59 g, ali nisu utvrđene statistički značajne razlike. S druge strane, **Kralik i sur. (2007.)** utvrdili su veću masu omega-3 jaja skladištenih 14 dana u hladnjaku, iako razlike nisu bile značajne ($P > 0,05$).

Na čvrstoću ljuske jaja tretmana O primijenjeni tretmani nisu imali utjecaja ($P > 0,05$). Čvrstoća ljuske kretala se od 3,081 kg/cm² do 3,337 kg/cm². U O₀ i O₄₀₀ skupinama čvrstoća ljuske bila je veća kod svježih jaja, dok je u O₂₀₀ skupini ljuska bila čvršća kod skladištenih jaja. Debljina ljuske mijenjala se s vremenom skladištenja jaja ($P < 0,001$). Tako je kod skladištenih jaja izmjerena veća debljina ljuske u odnosu na svježa jaja kod sve tri skupine. Najveća debljina ljuske izmjerena je kod skladištenih jaja O₂₀₀ skupine i iznosila je 0,380 mm, a najmanja u istoj skupini na svježim jajima i to 0,363 mm. U navedenoj skupini zabilježena je i najveća razlika u debljini ljuske između svježih i skladištenih jaja, 0,017 mm. Prosječna debljina ljuske svih analiziranih jaja bila je 0,371 mm. **Kralik i sur. (2008.a)** navode da debljina ljuske kokošnjih jaja varira između 0,241 i 0,430 mm te da je za normalno rukovanje i transport jaja potrebna debljina ljuske od 0,330 do 0,340 mm. Debljina ljuske jaja analiziranih u našem istraživanju iznad je preporučenih optimalnih vrijednosti. **Pappas i sur. (2005.)**, kao i **Kralik i sur. (2007.)**, nisu utvrdili utjecaj vremena skladištenja ($P > 0,05$) na debljinu ljuske omega-3 obogaćenih jaja. S druge strane, **Kralik i sur. (2014.)** utvrdili su deblju ljusku ($P < 0,05$) kod svježih omega-3 jaja (0,377 mm) u odnosu na jaja skladištena 28 dana u hladnjaku (0,365 mm). Autori navode pozitivnu korelaciju između mase jaja i debljine ljuske, dok je u našem istraživanju situacija bila obrnuta, odnosno lakša jaja (skladištena) imala su deblju ljusku u odnosu na teža jaja (svježa).

Unutarnji pokazatelji kvalitete jaja obuhvaćaju masu osnovnih dijelova (bjelanjka, žumanjka i ljuske), boju žumanjka, visinu bjelanjka i Haugh-ove jedinice, pH vrijednosti i indekse loma bjelanjka i žumanjka te vrijednosni broj i stupanj starenja.

Rezultati analize pokazatelja unutarnje kvalitete jaja tretmana O prikazani su u Tablicama 23.a. i 23.b. Lutein dodan u smjese značajno je utjecao na pH bjelanjka ($P = 0,001$), dok je vrijeme skladištenja imalo statistički visoko značajan utjecaj ($P < 0,001$) na sve pokazatelje unutarnje kvalitete, osim na masu ljuske ($P > 0,05$).

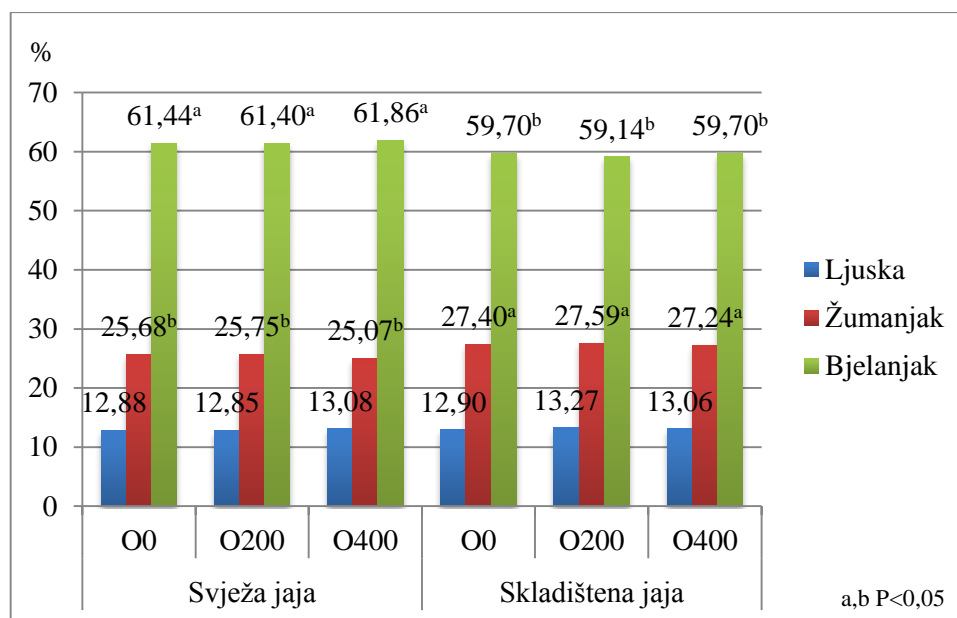
Promatrajući podatke za masu bjelanjka uočava se manja masa bjelanjka kod skladištenih jaja u odnosu na svježa jajakod sve tri ispitivane skupine. Najveća masa bjelanjka kod svježih jaja bila je u O₄₀₀ skupini (37,25 g), dok su vrijednosti u O₀ (37,04 g) i O₂₀₀ (37,03 g) bile ujednačene. Između navedenih vrijednosti nije utvrđena statistički značajna razlika. Kod jaja skladištenih 28 dana u hladnjaku također je najveća masa bjelanjka zabilježena u O₄₀₀ skupini (35,46 g), a slijede O₀ (35,42) te O₂₀₀ (35,22) skupine. Tijekom skladištenja dolazi do isparavanja vode iz bjelanjka, uslijed čega se smanjuje i njegova masa. Vrijednosti mase žumanjka kretale su se obratno od vrijednosti mase bjelanjka, odnosno skladištenjem je masa žumanjka porasla. Tako je u sve tri ispitivane skupine zabilježena značajno ($P < 0,001$) veća masa žumanjka kod jaja skladištenih 28 dana u hladnjaku, u odnosu na svježa jaja. Najveća masa žumanjka i kod svježih i kod skladištenih jaja bila je u O₀ skupini (15,53 g i 16,34 g), a slijede O₂₀₀ (15,51 g i 16,41 g) i O₄₀₀ (14,97 g i 15,99 g) skupine. **Akter i sur. (2014.)** utvrdili su značajno ($P < 0,05$) smanjenje mase bjelanjka i značajno ($P < 0,05$) povećanje mase žumanjka sa skladištenjem jaja u hladnjaku tijekom 28 dana, što je u skladu s našim rezultatima. Autori navode da skladištenjem jaja dolazi do gubitka vode iz bjelanjka, odnosno njene difuzije u žumanjak, pri čemu se smanjuje masa bjelanjka i povećava masa žumanjka, što je izraženije kad se jaja čuvaju na višim temperaturama. **Kralik i sur. (2014.)** također su utvrdili značajan utjecaj ($P < 0,05$) vremena skladištenja omega-3 jaja u hladnjaku na smanjenje mase bjelanjka. Masa žumanjka je povećana tijekom skladištenja, kao i u našem istraživanju, ali razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$). **Silversides i Scott (2001.)** primijetili su značajno ($P < 0,01$) smanjenje mase bjelanjka i povećanje mase žumanjka skladištenjem jaja na sobnoj temperaturi tijekom 10 dana, dok su **Jin i sur. (2011.)** utvrdili značajno povećanje ($P < 0,001$) mase žumanjka tijekom 10 dana skladištenja jaja u hladnjaku, a masa bjelanjka nije se značajno promijenila. Povećanjem temperature skladištenja dolazi do značajnog ($P < 0,001$) smanjenja mase bjelanjka. Masa ljuske jaja u ispitivanim pokusnim skupinama bila je ujednačena i kretala se od 7,66 g (O₄₀₀ skladištena) do 7,90 g (O₂₀₀ skladištena), što je u skladu s rezultatima **Kralik i sur. (2007., 2014.)**, koji nisu utvrdili utjecaj vremena skladištenja na 4°C na masu ljuske.

Tablica 23.a. Pokazatelji unutarnje kvalitete jaja tretmana O (\bar{x} ; n=30 po tretmanu)

| Tretman | Vrijeme skladištenja (dani) | Masa bjelanjka (g) | Masa žumanjka (g) | Masa ljuske (g) | Visina bjelanjka (mm) | Haugh-ove jedinice |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|
| O ₀ | 1 | 37,04 ^a | 15,53 ^{bc} | 7,78 | 7,09 ^a | 83,95 ^a |
| | 28 | 35,42 ^b | 16,34 ^a | 7,68 | 6,20 ^c | 77,98 ^c |
| O ₂₀₀ | 1 | 37,03 ^a | 15,51 ^{bc} | 7,75 | 7,26 ^a | 84,61 ^a |
| | 28 | 35,22 ^b | 16,41 ^a | 7,90 | 6,42 ^{bc} | 79,52 ^{bc} |
| O ₄₀₀ | 1 | 37,25 ^a | 14,97 ^c | 7,80 | 6,79 ^{ab} | 81,96 ^{ab} |
| | 28 | 35,46 ^b | 15,99 ^{ab} | 7,66 | 6,00 ^c | 76,75 ^c |
| SEM | | 0,322 | 0,226 | 0,102 | 0,198 | 1,293 |
| Izvori varijacije | | | | | | |
| Tretman (T) | | 0,767 | 0,062 | 0,543 | 0,083 | 0,111 |
| Vrijeme skladištenja (VS) | | <0,001 | <0,001 | 0,711 | <0,001 | <0,001 |
| T x VS | | 0,944 | 0,894 | 0,317 | 0,964 | 0,933 |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; a,b,c P<0,05; Tretman O₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman O₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu, Tretman O₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

Na Grafikonu 5. prikazani su udjeli bjelanjka, žumanjka i ljuske u masi jaja pokusnih skupina tretmana O. Vidljivo je značajno smanjenje udjela bjelanjka te povećanje udjela žumanjka tijekom skladištenja jaja. Vrijeme skladištenja nije utjecalo ($P>0,05$) na udio ljuske jajeta.



Grafikon 5. Udjeli osnovnih dijelova u jajima pokusnih skupina tretmana O

Najvažniji pokazatelji unutarnje kvalitete, odnosno svježine jaja, su visina bjelanjka i Haugh-ove jedinice (Tablica 23.a). Vrijednosti navedenih pokazatelja smanjuju se s duljinom skladištenja jaja, i to intenzivnije što je temperatura skladištenja viša. Tijekom skladištenja dolazi do razgradnje mucinskih niti bjelanjka, uslijed čega se mijenja struktura bjelanjka, on postaje rjeđi i smanjuje mu se visina. Budući da je izračun Haugh-ovih jedinica izravno povezan s visinom bjelanjka, tijekom skladištenja dolazi i do njihovog smanjenja. U našem istraživanju nije utvrđen utjecaj ($P>0,05$) luteina na visinu bjelanjka i Haugh-ove jedinice, ali je zato duljina skladištenja uzrokovala značajne razlike ($P<0,001$). Najpovoljnije vrijednosti visine bjelanjka utvrđene su u O₂₀₀ skupini, i za svježa i za skladištena jaja. Tako je kod svježih jaja O₂₀₀ skupine izmjerena visina bjelanjka od 7,26 mm, a kod skladištenih 6,42 mm. Svježa jaja skupina O₀ i O₄₀₀ imale su visinu bjelanjka od 7,09 i 6,79 mm, dok je kod skladištenih izmjereno 6,20 (O₀) te 6,00 mm (O₄₀₀). Vrijednosti Haugh-ovih jedinica, kako kod svježih tako i kod skladištenih jaja, kretale su se u skladu s vrijednostima visine bjelanjka, s najvećim vrijednostima izmjerenima u O₂₀₀ skupini (84,61 svježa odnosno 79,52 skladištena), nakog čega slijede O₀ (83,95 odnosno 77,98) i O₄₀₀

(81,96 te 76,75) skupine. Prema specifikaciji za uređaj EggMulti Tester EMT 5200 kojim su utvrđeni visina bjelanjka i Haugh-ove jedinice, jaja se mogu svrstati u četiri razreda svježine. Najsvježija jaja označena su s AA, a vrijednosti Haugh-ovih jedinica su iznad 72. Slijedi razred A s vrijednostima Haugh-ovih jedinica 71-60, zatim B s vrijednostima 59-31 i C razred s vrijednostima manjim od 30. Usporedbom vrijednosti izmjerenih u našem istraživanju sa specifikacijom uređaja EggMulti Tester vidljivo je da sva jaja, i svježa i skladištena, pripadaju u razred najbolje svježine, odnosno mogu se označiti s oznakom AA. **Kralik i sur. (2014.)** proučavali su utjecaj vremena skladištenja na kvalitetu omega-3 jaja. Skladištenje jaja trajalo je 28 dana u hladnjaku na 4°C. Mjerenjem visine bjelanjka i Haugh-ovih jedinica na svježim i skladištenim omega-3 jajima utvrđen je značajan utjecaj ($P < 0,05$) duljine čuvanja jaja na smanjenje vrijednosti navedenih pokazatelja. Tako je visina bjelanjka kod svježih jaja bila 7,09 mm, a kod skladištenih 6,19 mm. Haugh-ove jedinice smanjile su se s 83,95 na 77,97 nakon 28 dana skladištenja. **Farrell (1998.)** također je utvrdio značajno ($P < 0,05$) smanjenje vrijednosti Haugh-ovih jedinica skladištenjem omega-3 jaja na 5°C tijekom 30 dana, s 92,7 na 79,5. **Akter i sur. (2014.)** prikazuju slične rezultate i značajno ($P < 0,05$) opadanje Haugh-ovih jedinica s povećanjem vremena skladištenja. Autori navode da je smanjenje vrijednosti Haugh-ovih jedinica posljedica smanjenja visine gustog bjelanjka uslijed raspada kompleksa ovomucin-lizozim tijekom skladištenja. **Cedro i sur. (2009.)**, u istraživanju pokazatelja unutarnje kvalitete omega jaja tijekom skladištenja na 5°C, zabilježili su smanjenje vrijednosti Haugh-ovih jedinica za 10,76% nakon 21 dan skladištenja, ali utvrđene razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$). **Kralik i sur. (2007.)** također nisu utvrdili značajne razlike ($P > 0,05$) u vrijednostima Haugh-ovih jedinica nakon 14 dana skladištenja jaja, iako se uočavaju manje vrijednosti kod skladištenih jaja (75,73 : 70,18).

U Tablici 23.b. prikazani su također pokazatelji unutarnje kvalitete jaja tretmana O. Vrijednost pH bjelanjka i žumanjka važno je fizikalno svojstvo kvalitete jaja. Uobičajena pH vrijednost žumanjka pripada u kiselo područje (~6,00), dok je bjelanjak lužnatiji (~9,00). Skladištenjem jaja dolazi do povećanja pH vrijednosti bjelanjka i žumanjka zbog ispravanja vode i gubitka CO₂ kroz pore ljuske jajeta. U našem istraživanju utvrđen je značajan utjecaj ($P < 0,001$) dodatka luteina i vremena skladištenja, kao i njihove interakcije, na pH vrijednost bjelanjka te značajan utjecaj ($P < 0,001$) vremena skladištenja na pH vrijednost žumanjka. Utjecaj luteina očituje se u većim vrijednostima pH bjelanjka u skupinama O₂₀₀ i O₄₀₀ u odnosu na kontrolnu skupinu kod svježih jaja. Tako je kod svježih

jaja kontrolne skupine izmjeren pH od 8,90, dok je u skupinama s luteinom bio veći i iznosio 8,98 (O₂₀₀) i 8,99 (O₄₀₀). Kod jaja čuvanih 28 dana u hladnjaku nije utvrđen utjecaj luteina, ali je vrijeme skladištenja značajno utjecalo na povećanje pH vrijednosti u odnosu na svježa jaja svih pokusnih skupina. Tako je u kontrolnoj skupini zabilježen najveći porast vrijednosti pH s vremenom skladištenja, s 8,90 na 9,08. U ostalim skupinama porast pH vrijednosti također je značajan, iako je slabije izražen nego u kontrolnoj skupini. U O₂₀₀ skupini vrijednost pH porasla je s 8,98 na 9,07, dok je u O₄₀₀ skupini zabilježen porast s 8,99 na 9,10. Kod žumanjka također dolazi do porasta pH vrijednosti s vremenom čuvanja jaja. Utvrđene su statistički značajno veće ($P < 0,001$) pH vrijednosti žumanjka jaja čuvanih 28 dana u hladnjaku, u odnosu na žumanjke svježih jaja kod svih pokusnih skupina. Najveća vrijednost pH žumanjka od 6,13 utvrđena je kod skladištenih jaja O₄₀₀ skupine, dok je najniža vrijednost od 6,00 izmjerena kod žumanjaka svježih jaja O₀ skupine. Najveća razlika između pH vrijednosti svježih i skladištenih jaja utvrđena je u O₀ skupini (sa 6,00 na 6,12), dok je najmanja razlika zabilježena u O₂₀₀ skupini.

Brojni autori u svojim istraživanjima potvrđuju veće pH vrijednosti bjelanjka i žumanjka s vremenom skladištenja jaja, što povezuju s pojavom gubitka CO₂ kroz ljusku jajeta. **Kralik i sur. (2007.)** utvrdili su značajan ($P < 0,05$) porast pH vrijednosti bjelanjka omega-3 obogaćenih jaja tijekom skladištenja u trajanju od 14 dana u hladnjaku. U skupini s 1,5% ribljeg ulja i 3,5% repičinog ulja zabilježen je porast pH vrijednosti bjelanjka s 8,77 na 9,01, dok je u skupini s 3,5% ribljeg i 1,5% repičinog ulja pH bjelanjka svježih jaja iznosio 8,85, a skladištenih 8,98. U istraživanju **Pappas i sur. (2005.)** utvrđen je značajan ($P < 0,001$) utjecaj vremena skladištenja na povećanje pH vrijednosti bjelanjka tijekom 14-dnevnog skladištenja jaja obogaćenih s omega-3 masnim kiselinama. Kod svježih jaja pH vrijednost bjelanjka bila je 9,09, a nakon skladištenja 9,41. **Cedro i sur. (2009.)** za jaja skladištena 21 dan na 5°C bilježe značajan ($P < 0,05$) porast pH vrijednosti bjelanjka s 8,62 na 9,07, a žumanjka s 5,09 na 6,40. **Kralik i sur. (2014.)** navode također značajan ($P < 0,05$) utjecaj vremena skladištenja na porast pH vrijednosti bjelanjka i žumanjka omega-3 obogaćenih jaja. Vrijednost pH bjelanjka iznosila je 8,90 kod svježih jaja te 9,08 kod jaja skladištenih 28 dana u hladnjaku. Kod žumanjka pH vrijednost kretala se od 6,00 kod svježih do 6,12 kod skladištenih jaja. Porast pH vrijednosti bjelanjka i žumanjka utvrđen u našem istraživanju u skladu je s rezultatima navedenih autora.

Tablica 23.b Pokazatelji unutarnje kvalitete jaja tretmana O (\bar{x} ; n=30 po tretmanu)

| Tretman | Vrijeme skladištenja (dani) | pH bjelanjka | pH žumanjka | Indeks loma bjelanjka* | Indeks loma žumanjka* | Vrijednosni broj VB* | Stupanj starenja SS* |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| O ₀ | 1 | 8,90 ^c | 6,00 ^c | 1,3537 ^b | 1,4172 ^a | 63,50 ^a | 1,19 ^b |
| | 28 | 9,08 ^a | 6,12 ^a | 1,3561 ^a | 1,4161 ^b | 59,98 ^b | 2,31 ^a |
| O ₂₀₀ | 1 | 8,98 ^b | 6,03 ^{bc} | 1,3540 ^b | 1,4173 ^a | 63,24 ^a | 1,13 ^b |
| | 28 | 9,07 ^a | 6,10 ^a | 1,3560 ^a | 1,4159 ^b | 59,81 ^b | 2,55 ^a |
| O ₄₀₀ | 1 | 8,99 ^b | 6,04 ^b | 1,3542 ^b | 1,4173 ^a | 63,16 ^a | 1,06 ^b |
| | 28 | 9,10 ^a | 6,13 ^a | 1,3559 ^a | 1,4163 ^b | 60,34 ^b | 2,15 ^a |
| SEM | | 0,014 | 0,014 | 0,000 | 0,000 | 0,294 | 0,201 |
| Izvori varijacije | | | | | | | |
| Tretman (T) | | 0,001 | 0,162 | 0,818 | 0,494 | 0,693 | 0,494 |
| Vrijeme skladištenja (VS) | | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| T x VS | | 0,003 | 0,210 | 0,396 | 0,661 | 0,452 | 0,661 |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; a,b,c,d P<0,05; Tretman O₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman O₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu, Tretman O₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu; *n=20 po tretmanu

Na ispitivanim uzorcima jaja mjereni su i indeksi loma svjetlost bjelanjaka i žumanjaka (Tablica 23.b.). Zbog različitog sastava, odnosno većeg sadržaja vode, bjelanjak ima niži indeks loma svjetlosti od žumanjka. Indeksi loma bjelanjka i žumanjka mijenjaju se ovisno o dužini skladištenja jaja. Tako se indeks loma bjelanjka s vremenom povećava zbog gubitka vode i koncentriranja sadržaja, dok se indeks loma žumanjka s vremenom smanjuje jer se žumanjak razrjeđuje uslijed difundiranja vode iz bjelanjka. U slučaju indeksa loma bjelanjka utvrđen je značajan utjecaj vremena skladištenja ($P < 0,001$) na izmjerene vrijednosti, odnosno značajno veće vrijednosti izmjerene su kod skladištenih jaja u odnosu na svježa jaja. Najmanja vrijednost indeksa loma bjelanjka zabilježena je kod svježih jaja O_0 skupine i iznosila je 1,3537, a najveća kod skladištenih jaja iste skupine s izmjerenih 1,3561. Indeks loma žumanjka smanjuje se s dužinom čuvanja, što se i očituje značajnim utjecajem ($P < 0,001$) vremena skladištenja. Najmanju vrijednost indeksa loma žumanjka imala su skladištena jaja O_{200} skupine (1,4159), a najveća vrijednost (1,4173) zabilježena je kod svježih jaja O_{200} i O_{400} skupina.

Kralik (1976.) prikazuje vrijednosti indeksa loma bjelanjka i žumanjka jaja čuvanih od 2 do 37 dana u hladnjaku. Na jajima čuvanima 2 dana izmjerene vrijednosti iznosile su 1,3539 za bjelanjak i 1,4174 za žumanjak. Za jaja čuvana 30 dana utvrđen je indeks loma bjelanjka od 1,3556, a žumanjka 1,4164. Vidljiv je porast vrijednosti indeksa loma bjelanjka i smanjenje indeksa loma žumanjka s vremenom skladištenja. Skladištenjem jaja na višim temperaturama razlike su još izraženije. Izmjerene vrijednosti i trend promjene indeksa loma bjelanjka i žumanjka utvrđene u našem istraživanju u skladu su s rezultatima navedene autorice.

Vrijednosni broj (VB) predstavlja razliku između indeksa loma žumanjka i indeksa loma bjelanjka pomnoženu s tisuću. Vrijednost VB smanjuje se s vremenom čuvanja jaja zbog promjena vrijednosti indeksa loma bjelanjka i žumanjka. U našem istraživanju utvrđen je značajan utjecaj ($P < 0,001$) vremena skladištenja na vrijednosti VB. U svim pokusnim skupinama utvrđen je značajno manji VB kod skladištenih jaja. Kod svježih jaja VB kretao se od 63,16 (O_{400}) do 63,50 (O_0), dok je kod skladištenih jaja najmanja vrijednost (59,81) izmjerena u O_{200} skupini, a najveća (60,34) u O_{400} skupini. Stupanj starenja (SS) predstavlja razliku indeksa loma standardnog žumanjka mjenog na temperaturi od 25°C , koja iznosi 1,4184 i indeksa loma ispitivanog žumanjka, pomnožena s tisuću. Tijekom skladištenja dolazi do porasta vrijednosti stupnja starenja. Tako je utvrđen značajan utjecaj ($P < 0,001$) vremena skladištenja na SS jaja svih ispitivanih skupina. Vrijednosti SS kretale

su se u rasponu od 1,06 do 1,19 kod svježih jaja, dok su se kod skladištenih jaja vrijednosti SS kretale između 2,15 i 2,55. Najveća razlika u vrijednostima SS između svježih i skladištenih jaja utvrđena je u O₂₀₀ skupini (1,42), dok su u skupinama O₀ i O₄₀₀ razlike bile manje (1,12, odnosno 1,09). Utjecaj vremena skladištenja (28 dana u hladnjaku) na pokazatelje kvalitete omega-3 jaja, između ostalih i na VB i SS, istraživali su **Kralik i sur. (2014.)**. Na svježim jajima utvrdili su VB 63,70, a na skladištenima 60,13 (P<0,05). Stupanj starenja kretao se od 0,86 za svježa jaja do 1,86 za skladištena jaja. **Kralik i sur. (2009.)** u svom istraživanju utvrdili su vrijednosti VB od 60,20 za svježa jaja te 57,51 za jaja skladištena 28 dana na 4°C, dok je SS iznosio 1,07 (svježa) te 3,29 (skladištena jaja). **Kralik (1976.)** navodi vrijednosti VB od 63,14 za jaja čuvana dva dana u hladnjaku te 60,72 za jaja skladištena 30 dana u hladnjaku, a SS jaja u istim uvjetima skladištenja iznosio je 0,92 (2 dana) i 1,92 (30 dana). Usporedbom navedenih podataka vidljiv je trend smanjenja VB te povećanja SS s vremenom skladištenja jaja, što je utvrđeno i u našem istraživanju. Vrijednosti VB i SS utvrđene u našem istraživanju odgovaraju vrijednostima navedenih autora.

Boja žumanjka jedan je od pokazatelja kvalitete jaja koji je potrošačima, pored svježine jaja, od velike važnosti. Rezultati određivanja boje žumanjka prikazani su u Tablici 24. i na Grafikonu 6. U našem istraživanju utvrđen je statistički značajan utjecaj dodatka luteina, kao i vremena skladištenja jaja (P<0,001) na boju žumanjka (EggMulti Tester). Najveća vrijednost boje žumanjka zabilježena je u O₄₀₀ skupini kod skladištenih jaja i iznosila je 14,40. U navedenoj skupini zabilježena je i najveća vrijednost boje i za svježa jaja i to 13,77. Navedene vrijednosti su i očekivane s obzirom na dodatak 400 mg/kg luteina u hranu nesilica. Vrijednosti boje žumanjka kontrolne skupine, bez dodatka luteina, iznosi 12,90 za svježa te 13,10 za skladištena jaja. Dodatak 200 mg/kg luteina uzrokovao je značajno povećanje vrijednosti boje u odnosu na O₀ skupinu, kako kod svježih tako i kod skladištenih jaja. Iako je vidljiv daljnji porast intenziteta boje s dodatkom 400 mg/kg luteina, nije utvrđena značajna razlika u odnosu na O₂₀₀ skupinu. Intenzitet boje porastao je s 12,90 (O₀) na 13,67 u O₂₀₀ skupini te 13,77 u O₄₀₀ skupini za svježa jaja. Vrijeme skladištenja nije utjecalo na vrijednost boje žumanjka u kontrolnoj skupini, dok je u pokusnim skupinama zabilježena značajno veća vrijednost boje žumanjka kod skladištenih jaja u odnosu na svježa.

Tablica 24. Boja žumanjka jaja O tretmana u ovisnosti o dodanom luteinu i vremenu skladištenja (\bar{x} ; n=30 po tretmanu)

| Tretman | Vrijeme skladištenja (dani) | Boja žumanjka | | | |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------|------------------|---------------------|-------|
| | | EggMulti Tester | CIE ¹ | | |
| | | | L* | a* | b* |
| O ₀ | 1 | 12,90 ^c | 61,24 | 10,74 ^e | 55,54 |
| | 28 | 13,10 ^c | 60,57 | 12,79 ^{cd} | 57,51 |
| O ₂₀₀ | 1 | 13,67 ^b | 60,00 | 11,72 ^{de} | 53,21 |
| | 28 | 14,13 ^a | 59,41 | 15,18 ^{ab} | 55,34 |
| O ₄₀₀ | 1 | 13,77 ^b | 59,70 | 14,14 ^{bc} | 53,86 |
| | 28 | 14,40 ^a | 59,18 | 15,94 ^a | 55,63 |
| SEM | | 0,104 | 0,734 | 0,527 | 1,359 |
| Izvori varijacije | | | | | |
| Tretman (T) | | <0,001 | 0,113 | <0,001 | 0,229 |
| Vrijeme skladištenja (VS) | | <0,001 | 0,329 | <0,001 | 0,083 |
| T x VS | | 0,111 | 0,995 | 0,244 | 0,991 |

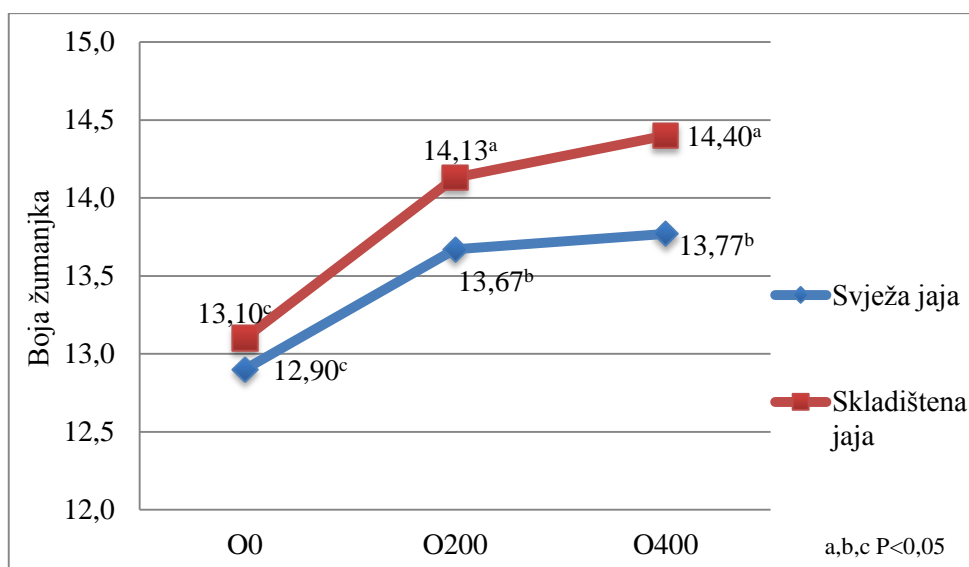
\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; a,b,c,d,e P<0,05; Tretman O₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman O₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu i Tretman O₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu; ¹n=10 po tretmanu

Leeson i Caston (2004.) davali su nesilicama u hranu lutein u udjelima od 0 do 1000 mg/kg i proučavali njegov utjecaj na sadržaj luteina u žumanjcima te na boju žumanjka. Primijetili su značajan porast vrijednosti boje nakon samo sedam dana hranidbe, i to s 6/7 na 12/13. Boja žumanjka ustalila se na 13/14, a dodatak luteina u udjelima većim od 250 mg/kg nije utjecao na daljnje povećanje boje. U istraživanju **Leesona i sur. (2007.)** korištena je kombinacija luteina i 10% lanenih sjemenki u hranidbi nesilica, pri čemu je ostvareno istovremeno obogaćivanje jaja omega-3 masnim kiselinama i luteinom. Autori su utvrdili da već dodatak od 125 mg/kg luteina uzrokuje značajan (P<0,001) porast boje žumanjka, i to sa 6,7 u kontrolnoj skupini na 13,7. Daljnje povećanje dodatka luteina od 250 mg/kg neznatno je povećalo boju žumanjka na 13,9. **Englmaierová i sur. (2013.)** ostvarili su porast boje žumanjka sa 6,4 na 13,1 (P<0,001) uz dodatak 250 mg/kg luteina u smjese za nesilice, dok su **Englmaierová i Skřivan (2013.)** dodatkom 100 mg/kg luteina utjecali na povećanje boje sa 7,7 u kontrolnoj skupini na 8,4 (P<0,001). **Jang i sur. (2014.)** ostvarili su značajno (P<0,05) povećanje intenziteta boje žumanjka pri dodatku 40 mg/kg luteina u hranu nesilica. U kontrolnoj skupini, bez dodatka luteina, zabilježili su boju žumanjka od 7,70, dok je u pokusnoj ona iznosila 9,45. **Lokaewmanee i sur. (2011.)** također bilježe značajan utjecaj (P<0,001) dodatka već i 20 mg/kg luteina na porast boje žumanjka. Tako je u kontrolnoj skupini zabilježen intenzitet boje od 5,72, a dodatkom 20 mg/kg luteina porastao je na 6,87. Dodatak 40 mg/kg uzrokovao je daljnji porast

intenziteta boje na 7,53. Iz rezultata navedenih autora vidi se da dodatak čak i malih koncentracija luteina utječe na boju žumanjka. U našem istraživanju potvrđen je pozitivan utjecaj dodatka luteina na intenzitet boje žumanjka te su stoga naši rezultati u skladu s rezultatima navedenih autora. Razlika se javlja u boji žumanjka kontrolne skupine, koja je intenzivnija u odnosu na navedene autore. Razlog je vjerojatno veći sadržaj kukuruza u smjesama korištenim u našem istraživanju, kao i uporaba standardnog premiksa za smjesu tretmana O, koji već sadrži pigmente u svom sastavu. Iako se sklonosti potrošača razlikuju, DSM (www.dsm.com) utvrdio je da potrošači u većini zemalja preferiraju žumanjke čija je boja na skali boja 12 ili više. Slična je situacija i u Hrvatskoj, gdje potrošači preferiraju žumanjke intenzivnije boje. **Kralik i sur. (2006.)** navode da se prosječne vrijednosti boje žumanjka u Republici Hrvatskoj kreću u rasponu od 12,76 do 13,08.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju značajno ($P < 0,001$) veći intenzitet boje žumanjka kod jaja skladištenih 28 dana u hladnjaku u odnosu na svježa jaja kod sve tri skupine. U kontrolnoj skupini razlika između dva termina mjerenja nije bila značajna, ali u O_{200} i O_{400} skupinama utvrđena je značajnost. U literaturi je malo podataka koji govore o promjeni intenziteta boje jaja obogaćenih s omega-3 masnim kiselinama i luteinom tijekom skladištenja. Stoga se za usporedbu navode istraživanja autora koji prikazuju promjene boje žumanjaka omega-3 obogaćenih jaja tijekom skladištenja, kao što su **Kralik i sur. (2007.)**. U radu navedenih autora, tijekom skladištenja jaja u trajanju od 14 dana u hladnjaku, utvrđeno je smanjenje boje žumanjaka s 13,24 na 12,76 u skupini s 3,5% ribljeg i 1,5% repičinog ulja, te s 13,24 na 13,00 u skupini s 1,5% ribljeg i 3,5% repičinog ulja, ali razlike nisu bile značajne ($P > 0,05$). **Barbosa i sur. (2011.)** nisu utvrdili utjecaj vremena skladištenja na promjenu boje žumanjka jaja obogaćenih s omega-3 masnim kiselinama skladištenih u hladnjaku tijekom 35 dana, dok su za jaja skladištena na sobnoj temperaturi utvrdili značajno ($P < 0,05$) smanjenje vrijednosti boje s 11,50 na 10,38.

Na Grafikonu 6. prikazane su vrijednosti boje žumanjaka jaja pokusnih skupina tretmana O.



Grafikon 6. Boja žumanjaka jaja pokusnih skupina tretmana O

Što se tiče CIE Lab pokazatelja boje, utvrđen je značajan ($P < 0,001$) utjecaj luteina i vremena skladištenja samo na CIE a^* vrijednost (stupanj crvenila). Primjećuje se porast vrijednosti uz dodatak luteina s 10,74 u kontrolnoj skupini na 15,94 u O_{400} skupini, kao i s vremenom skladištenja u svim pokusnim skupinama. Kod svježih jaja nije bilo razlika između O_0 i O_{200} skupina, ali je značajna razlika zabilježena u O_{400} skupini u odnosu na prethodne dvije. Kod jaja skladištenih 28 dana u hladnjaku primjećuje se značajna razlika već pri dodatku 200 mg/kg luteina, dok između O_{200} i O_{400} skupina nije bilo razlike. Na CIE L^* (stupanj svjetloće) i CIE b^* (stupanj žutila) vrijednosti dodatak luteina i vrijeme skladištenja nisu imali utjecaj, ali primjećuje se smanjenje svjetloće i žutila žumanjka s povećanjem dodatka luteina. Sa skladištenjem dolazi do opadanja CIE L^* vrijednosti i porasta CIE b^* vrijednosti žumanjka.

Istraživanja o utjecaju dodatka luteina na CIE Lab pokazatelje boje dostupna u literaturi provedena su uglavnom na konvencionalno proizvedenim, svježim jajima. **Lokaewmanee i sur. (2011.)** su dodatkom različitih razina luteina (10-40 mg/kg) u hranu nesilica utjecali značajno ($P < 0,05$) na povećanje CIE a^* vrijednosti boje. Primijećeno je smanjenje CIE L^* vrijednosti, kao i u našem istraživanju te povećanje CIE b^* vrijednosti boje, ali razlike nisu bile statistički značajne. **Sirri i sur. (2007.)** navode da povećanje sadržaja luteina u smjesama (80-160 mg/kg) značajno ($P < 0,001$) utječe na povećanje stupnja crvenila (CIE a^*), dok se vrijednosti stupnja svjetloće i žutila nisu značajno razlikovale između pokusnih skupina, iako je utvrđeno smanjenje CIE L^* i CIE b^* vrijednosti, što je bio slučaj i u

našem istraživanju. Istraživanje o utjecaju dodatka 250 mg/kg luteina u smjese za nesilice na CIE Lab pokazatelje boje žumanjka proveli su **Englmaierová i sur. (2013.)**. Rezultati su pokazali značajan utjecaj ($P < 0,001$) dodatka luteina na sve pokazatelje boje u odnosu na kontrolnu skupinu. Dodatak luteina utjecao je na smanjenje CIE L* vrijednosti i povećanje CIE a* i CIE b* vrijednosti boje žumanjka.

5.3.3. Sadržaj luteina u žumanjcima jaja

Rezultati određivanja sadržaja luteina u žumanjcima jaja tretmana O prikazani su u Tablici 25. i na Grafikonu 7.

Tablica 25. Sadržaj luteina u žumanjcima jaja tretmana O (\bar{x} ; n=10 po tretmanu)

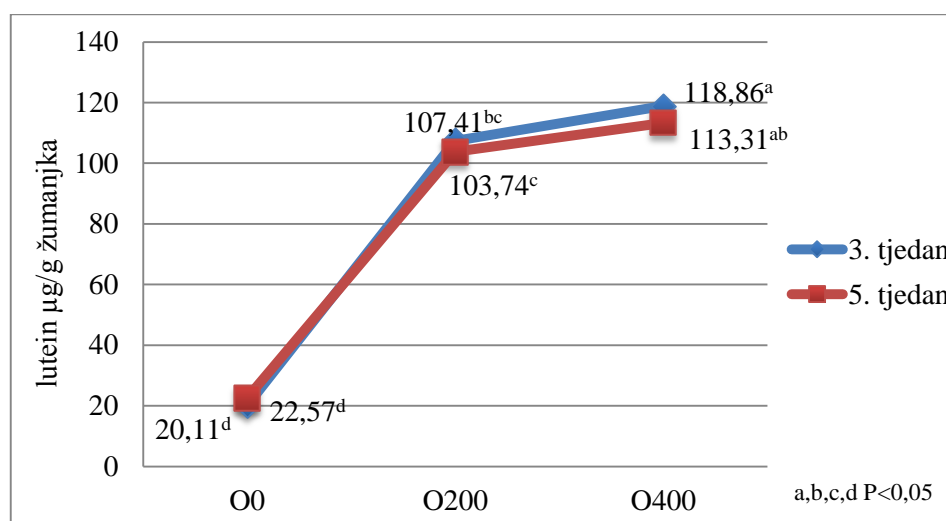
| Tretman | Vrijeme analize (tjedni) | Sadržaj luteina | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|
| | | $\mu\text{g/g}$ žumanjka | mg/60 g jajeta |
| O ₀ | 3. | 20,11 ^d | 0,31 ^d |
| | 5. | 22,57 ^d | 0,35 ^d |
| O ₂₀₀ | 3. | 107,41 ^{bc} | 1,65 ^{bc} |
| | 5. | 103,74 ^c | 1,59 ^c |
| O ₄₀₀ | 3. | 118,86 ^a | 1,82 ^a |
| | 5. | 113,31 ^{ab} | 1,74 ^{ab} |
| SEM | | 3,171 | 0,049 |
| Izvori varijacije | | | |
| Tretman (T) | | <0,001 | |
| Vrijeme analize (VA) | | 0,388 | |
| T x VA | | 0,422 | |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; a,b,c,d $P < 0,05$; Tretman O₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman O₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu i Tretman O₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

Kod jaja tretmana O bilježi se značajan porast sadržaja luteina u žumanjcima s povećanjem sadržaja luteina u smjesama. Tretman je značajno utjecao ($P < 0,001$) na sadržaj luteina pri čemu su najveće vrijednosti ostvarene u skupini s 400 mg/kg luteina dodanih u smjesu. Rezultati analize provedene 3. tjedna pokusa pokazuju porast sadržaja luteina u žumanjcima s 20,11 $\mu\text{g/g}$ na 107,41 $\mu\text{g/g}$ (O₂₀₀) te 118,86 $\mu\text{g/g}$ (O₄₀₀), što je i najveća zabilježena vrijednost te statistički značajno različita od vrijednosti O₂₀₀ skupine. Iz vrijednosti dobivenih analizom uzoraka 5. tjedna pokusa vidljiv je nešto niži sadržaj luteina u žumanjcima u odnosu na rezultate dobivene trećeg tjedna ali razlike nisu bile

statistički značajne. Najbolji rezultati obogaćivanja žumanjaka ostvareni su dodatkom 400 mg/kg luteina u smjese već nakon 3 tjedna hranidbe. Promatrajući srednje vrijednosti dobivenih rezultata može se reći da je sadržaj luteina u pokusnim skupinama veći za 4,95 odnosno 5,44 puta u odnosu na kontrolnu skupinu. U istraživanju **Leesona i Castona (2004.)** u smjesu na bazi kukuruza i soje dodano je 8% mljevenih lanenih sjemenki, kao izvor omega-3 masnih kiselina, i 0, 125, 250 i 500 mg/kg luteina. Kontrolna smjesa bila je na bazi kukuruza i soje, bez dodataka. Rezultati analize su pokazali lošije odlaganje luteina u jaja nesilica hranjenih s dodatkom lanenih sjemenki u odnosu na kontrolnu skupinu. Dodatkom većih razina luteina u hranu porastao je i njegov sadržaj u žumanjcima, i to s 0,24 mg/60 g jajeta na 1,40 mg/60 g jajeta (uz dodatak 250 mg/kg luteina). Ti rezultati su usporedivi s našima, s tim da je u našoj kontrolnoj skupini sadržaj luteina bio nešto veći (0,33 mg/60 g), a uz dodatak 200 mg/kg luteina u hranu ostvaren je prosječan sadržaj luteina od 1,62 mg/60 g jajeta, što je za 15,7% više od rezultata nevedenih autora uz dodatak 250 mg/kg luteina. Nadalje, **Leeson i sur. (2007.)** dodavali su u smjese za nesilice 10% mljevenih sjemenki lana te 0, 125 i 250 mg/kg luteina. Sadržaj luteina u žumanjcima kontrolne skupine jaja bio je 0,11 mg/60 g jajeta, a u skupinama sa 125 i 250 mg/kg luteina 1,39, odnosno 1,73 mg/60 g jajeta. Ostvaren je veći sadržaj luteina u žumanjcima uz manji dodatak luteina u hranu (250 mg/kg) u odnosu na našu O₄₀₀ skupinu, gdje je uz dodatak 400 mg/kg luteina ostvareno prosječno 1,78 mg/60 g jajeta. **Nain (2011.)** je nesilicama davao kombinaciju 10% lanenih sjemenki i 500 mg/kg luteina te pratio porast sadržaja luteina u žumanjcima tijekom 56 dana hranidbe, u usporedbi sa skupinom kojoj je u hranu dodan samo lan (10%). Najbolje obogaćenje žumanjka ostvareno je nakon 28 dana hranidbe a sadržaj luteina bio je 34,59 µg/g žumanjka u pokusnoj skupini te prosječno 8,64 µg/g žumanjka u skupini s lanom. Na početku istraživanja sadržaj luteina u pokusnoj skupini bio je 9,38 µg/g žumanjka, a u skupini s lanom 9,70 µg/g žumanjka. Vidljiv je trend obogaćivanja žumanjka kao i u našem istraživanju, iako su vrijednosti puno manje u usporedbi s našim rezultatima.

Na Grafikonu 7. prikazan je rast koncentracije luteina u žumanjcima jaja tretmana O u ovisnosti o sadržaju luteina u hrani i vremenu analize.



Grafikon 7. Sadržaj luteina u žumanjcima jaja tretmana O

Iz rezultata analize sadržaja luteina u žumanjcima jaja zaključuje se da je bolje obogaćivanje jaja luteinom, odnosno veći porast sadržaja luteina, ostvaren u tretmanu K (7,7X K : 5,4X O), iako je sam sadržaj luteina bio veći u žumanjcima jaja tretmana O. Navedeni podatak u skladu je s rezultatima **Leosona i Castona (2004.)** gdje je dodatak sjemenki lana, kao izvora omega-3 masnih kiselina, u hranu nesilica utjecao na smanjenje bioakumulaciju luteina u žumanjcima.

5.3.4. Masne kiseline u žumanjcima jaja

Profil masnih kiselina u žumanjcima jaja tretmana O sa 0, 200 i 400 mg/kg luteina dodanog u smjese za nesilice prikazan je u Tablici 26. Dodatak luteina u smjese nije utjecao na sadržaj ni pojedinačnih niti ukupnih zasićenih (SFA) te mononezasićenih (MUFA) masnih kiselina. Zabilježen je nešto veći sadržaj ukupnih SFA te nešto manji sadržaj ukupnih MUFA u O₂₀₀ skupini u odnosu na ostale dvije skupine, ali razlike nisu bile statistički značajne. Kod ukupnih n-6 PUFA vidljiv je trend smanjenja njihovog sadržaja s porastom sadržaja luteina dodanog u smjese: 21,17% > 20,10% > 19,96%, ali nije utvrđena statistički značajna razlika. Kod n-3 PUFA utvrđen je značajan utjecaj luteina, kako na sadržaj ukupnih n-3 PUFA (P=0,017), tako i na sadržaj važnih DPA (22:5n3) (P=0,005) i DHA kiselina (22:6n3) (P<0,001).

Tablica 26. Profil masnih kiselina u žumanjcima jaja tretmana O (% od ukupnih masnih kiselina; $\bar{x}\pm s$; n=7 po tretmanu)

| Masna kiselina | O ₀ | O ₂₀₀ | O ₄₀₀ | P vrijedost |
|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------|
| Miristinska C14:0 | 0,25±0,04 | 0,29±0,02 | 0,25±0,03 | 0,142 |
| Pentadekanska C15:0 | 0,09±0,00 | 0,09±0,02 | 0,08±0,01 | 0,195 |
| Palmitinska C16:0 | 25,14±1,35 | 26,98±2,90 | 25,38±1,60 | 0,275 |
| Heptadekanska C17:0 | 0,22±0,03 | 0,22±0,03 | 0,22±0,02 | 0,988 |
| Stearinska C18:0 | 7,19±0,68 | 7,30±0,32 | 7,64±0,55 | 0,345 |
| Arahidska C20:0 | 0,02±0,00 | 0,02±0,00 | 0,02±0,00 | 0,162 |
| Heneikozanska C21:0 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,191 |
| Behenska C22:0 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,191 |
| Trikozanska C23:0 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,194 |
| Lignocerinska C24:0 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,205 |
| SFA | 32,95±1,05 | 34,94±2,70 | 33,63±1,41 | 0,203 |
| Miristoleinska C14:1 | 0,04±0,01 | 0,04±0,00 | 0,04±0,01 | 0,754 |
| Palmitoleinska C16:1 | 2,35±0,52 | 2,44±0,28 | 2,29±0,38 | 0,804 |
| Elaidinska C18:1n9t | 0,15±0,01 | 0,14±0,02 | 0,17±0,04 | 0,159 |
| Oleinska C18:1n9c | 38,04±0,74 | 37,24±2,96 | 37,92±1,27 | 0,737 |
| Oktedekanska izomer C18:1 (cis) | 1,45±0,10 | 1,21±0,28 | 1,47±0,16 | 0,057 |
| Oktedekanska izomer C18:1 (trans) | 0,27±0,04 | 0,28±0,06 | 0,41±0,24 | 0,221 |
| Eikozenska C20:1n9 | 0,15±0,01 | 0,13±0,03 | 0,15±0,01 | 0,191 |
| MUFA | 42,45±0,87 | 41,48±3,36 | 42,46±1,13 | 0,661 |
| Linolna C18:2n6 | 19,56±1,09 | 18,66±1,36 | 18,22±0,89 | 0,148 |
| Oktadekadienska izomer (A) C18:2 | 0,06±0,01 | 0,06±0,01 | 0,10±0,05 | 0,058 |
| Oktadekadienska izomer (B) C18:2 | 0,06 ^b ±0,01 | 0,05 ^b ±0,01 | 0,12 ^a ±0,05 | 0,006 |
| Oktadekadienska izomer (C) C18:2 | 0,04 ^b ±0,01 | 0,03 ^b ±0,01 | 0,09 ^a ±0,03 | <0,001 |
| Oktadekadienska izomer (D) C18:2 | 0,05±0,03 | 0,03±0,01 | 0,05±0,02 | 0,067 |
| γ-linolenska C18:3n6 | 0,10±0,02 | 0,09±0,02 | 0,09±0,01 | 0,542 |
| c9,t11-CLA | 0,02±0,00 | 0,02±0,01 | 0,02±0,00 | 0,999 |
| Eikozadienska C20:2 | 0,12±0,01 | 0,10±0,02 | 0,11±0,01 | 0,143 |
| Eikozatrienska C20:3n6 | 0,15±0,01 | 0,14±0,02 | 0,17±0,04 | 0,092 |
| Arahidonska C20:4n6 | 0,94±0,18 | 0,84±0,03 | 0,91±0,05 | 0,334 |
| Dokozatetraenska C22:4n6 | 0,07±0,03 | 0,07±0,01 | 0,08±0,01 | 0,832 |
| n-6 PUFA | 21,17±1,33 | 20,10±1,44 | 19,96±1,05 | 0,236 |
| α-linolenska C18:3n3 | 2,03±0,31 | 2,03±0,36 | 2,05±0,27 | 0,990 |
| Eikozatrienska C20:3n3 | 0,022 ^{ab} ±0,00 | 0,018 ^b ±0,01 | 0,028 ^a ±0,00 | 0,020 |
| Eikozapentaenska C20:5n3 | 0,06±0,01 | 0,06±0,01 | 0,06±0,01 | 0,680 |
| Dokozapentaenska C22:5n3 | 0,10 ^b ±0,02 | 0,15 ^{ab} ±0,05 | 0,19 ^a ±0,05 | 0,005 |
| Dokozaheksaenska C22:6n3 | 1,22 ^b ±0,06 | 1,21 ^b ±0,08 | 1,62 ^a ±0,11 | <0,001 |
| n-3 PUFA | 3,43^b±0,28 | 3,47^b±0,36 | 3,96^a±0,28 | 0,017 |
| n-6/n-3 PUFA | 6,22^a±0,76 | 5,85^{ab}±0,75 | 5,06^b±0,42 | 0,025 |

\bar{x} =aritmetička sredina; s=standardna devijacija; a,b P<0,05; Tretman O₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman O₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu i Tretman O₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

Sadržaj navedenih masnih kiselina u pokusnim skupinama bio je veći u odnosu na kontrolnu, zbog čega je i sadržaj ukupnih n-3 PUFA bio veći u pokusnim skupinama. Iz

navedenog slijedi da je i omjer n-6/n-3 PUFA bio povoljniji u skupinama s dodatkom luteina u smjese ($P=0,02$), pri čemu je najmanji i najpovoljniji omjer od 5,06 zabilježen u O_{400} , slijedi O_{200} s 5,85 te na kraju kontrolna skupina s omjerom 6,22. Dodatak luteina u smjese uzrokovao je smanjenje sadržaja n-6 PUFA i povećanje sadržaja n-3 PUFA, što je rezultiralo značajnim smanjenjem omjera n-6/n-3 PUFA. Djelovanje luteina na smanjenje navedenog omjera, u kombinaciji s obogaćivanjem jajeta luteinom, dodatni je pozitivni učinak u proizvodnji funkcionalne namirnice.

Kako je već spomenuto, malo istraživanja je provedeno o utjecaju luteina iz hrane nesilica na sastav masnih kiselina žumanjka, kako kod konvencionalnih jaja, tako i kod jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama. U našem istraživanju korištena je kombinacija ulja bogatih omega-3 masnim kiselinama (repičino, sojino, laneno i riblje ulje), a njihov učinak vidljiv je kroz povećanje sadržaja n-3 PUFA u žumanjcima (Tablica 26.).

Brojni autori istraživali su utjecaj dodatka različitih biljnih ulja i ulja morskih organizama na profil masnih kiselina u žumanjku, ali malo ih je istraživalo kombinaciju četiri ulja korištenih u našem istraživanju, dok su podaci o utjecaju luteina iz hrane na profil masnih kiselina u žumanjcima jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselina vrlo rijetki u literaturi. Poznato je da dodatak biljnih i ribljeg ulja utječe na poboljšanje profila masnih kiselina u žumanjcima. Dodatkom različitih kombinacija ribljeg, lanenog, repičinog ili sojinog ulja (**Farrell, 1998.; Škrčić i sur., 2007.; Kralik i sur., 2008.b; Škrčić i sur., 2008.**) ostvaruje se povećanje sadržaja ukupnih i pojedinačnih n-3 PUFA uz istovremeno smanjenje n-6 PUFA čime se dobiva i povoljniji, niži omjer n-6/n-3 masnih kiselina.

Utjecaj dodatka 10% sjemenki lana i 500 mg/kg luteina u hranu za nesilice na profil masnih kiselina u žumanjcima jaja istraživao je **Nain (2011.)**. Skupinu u kojoj je dodano samo 10% sjemenki lana možemo smatrati kontrolnom. Autor nije primijetio većih odstupanja između dviju skupina. Tako je sadržaj SFA, ukupnih PUFA i n-6 PUFA bio malo veći u skupini s dodatkom luteina ali razlike nisu bile statistički značajne. Sadržaj MUFA i n-3 PUFA bio je ujednačen u obje skupine. Omjer n-6/n-3 neznatno se povećao u skupini s dodatkom luteina. Osim za sadržaj SFA i MUFA, koji je u našem istraživanju također bio ujednačen, ostali rezultati nisu u skladu s rezultatima navedenog autora. U našem slučaju sadržaj n-6 PUFA smanjivao se s dodatkom luteina, iako ne značajno ($P=0,236$), dok je sadržaj n-3 PUFA bio značajno veći u skupinama s luteinom u odnosu na kontrolu ($P=0,017$). Navedene promjene uzrokovale su smanjenje omjera n-6/n-3 sa 6,17 u kontrolnoj skupini na 5,04 u skupini s 400 mg/kg luteina ($P=0,025$).

Od ostalih istraživanja izdvaja se samo istraživanje **Altuntaş i Aydin (2014.)**, koji su u smjese za nesilice dodavali prah cvijeta kadifice, koji sadrži lutein, u udjelima od 0, 10 i 20 g/kg smjese i proučavali njegov utjecaj na sastav masnih kiselina, ali samo kod standardnih konzumnih jaja. Utvrđeno je značajno ($P < 0,01$) povećanje sadržaja C16:0 i C18:0 te smanjenje sadržaja C16:1n7 i C18:1n9 u obje pokusne skupine u odnosu na kontrolu. Sadržaj ukupnih SFA u pokusnim skupinama bio je veći, a ukupnih MUFA manji ($P < 0,05$) nego u kontrolnoj skupini. Kao i kod spomenutih autora, i u našim pokusnim skupinama tretmana O s dodatkom luteina u smjese došlo je do porasta sadržaja C16:0, C18:0 i ukupnih SFA, te smanjenja sadržaja C16:1n7 i C18:1n9, ali razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$). Vidljiv je sličan trend kretanja rezultata, međutim pretpostavka je da je sastav ulja u hrani nesilica u interakciji s luteinom utjecao na smanjenje razlika te je potrebno provesti daljnja istraživanja o kombiniranom utjecaju dodatka različitih ulja i razina luteina u hranu nesilica na profil masnih kiselina i sadržaj luteina u žumanjcima jaja.

5.3.5. Oksidacija lipida u žumanjcima jaja

Rezultati određivanja oksidacije lipida u žumanjcima jaja tretmana O iskazani u μg MDA/g žumanjka prikazani su u Tablici 27. i na Grafikonu 8.

Tablica 27. Vrijednosti lipidne oksidacije (TBARS) u žumanjcima jaja tretmana O (\bar{x} ; n=10 po tretmanu)

| Tretman | Vrijeme analize (dani) | TBARS (μg MDA/g žumanjka) |
|--------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| O ₀ | 1. | 0,605 ^{bc} |
| | 28. | 0,803 ^a |
| O ₂₀₀ | 1. | 0,585 ^{bc} |
| | 28. | 0,751 ^a |
| O ₄₀₀ | 1. | 0,571 ^c |
| | 28. | 0,711 ^{ab} |
| SEM | | 0,045 |
| Izvori varijacije | | |
| Tretman (T) | | 0,379 |
| Vrijeme analize (VA) | | <0,001 |
| T x VA | | 0,817 |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; a,b,c $P < 0,05$; Tretman O₀= bez dodatka luteina u smjesu, Tretman O₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu i Tretman O₄₀₀= dodano 400 mg/kg luteina u smjesu

Iz analiziranih rezultata vidljiv je značajan utjecaj vremena analize, odnosno trajanja čuvanja jaja, na vrijednosti oksidacije lipida u žumanjcima. Tretman nije utjecao na dobivene vrijednosti.

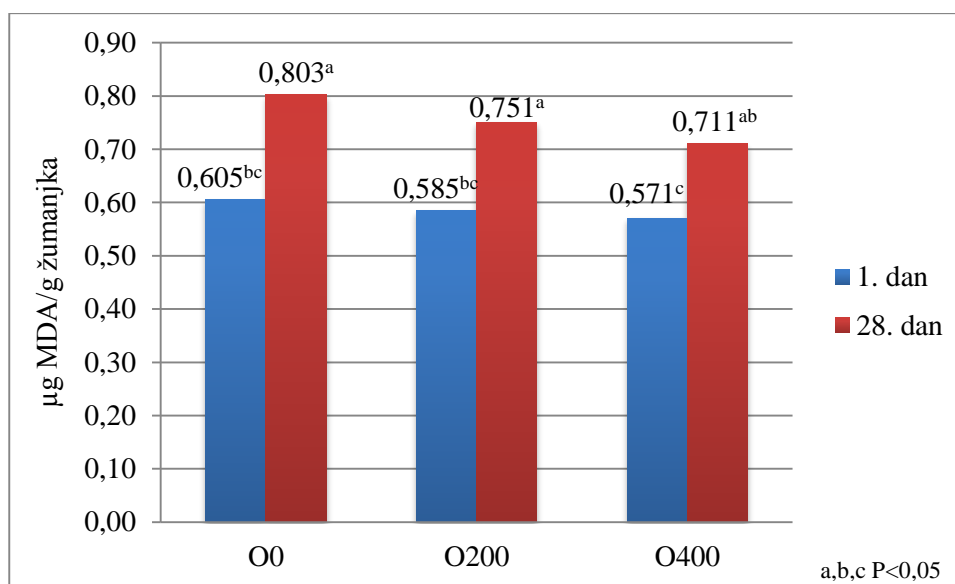
Kod jaja tretmana O zabilježene su nešto više vrijednosti oksidacije lipida u odnosu na žumanjke iz tretmana K, kao i veća razlika između čuvanih i svježih jaja. Razlog može biti veći sadržaj ulja (5% - repičino, sojino, laneno i riblje) s većim udjelom polinezasićenih masnih kiselina koje su podložnije oksidaciji u smjesama tretmana O u odnosu na 2,26 % suncokretovog ulja u smjesama tretmana K. Nadalje, vidljiv je i sličan trend što se tiče vrijednosti oksidacije lipida žumanjaka kontrolne u odnosu na pokusne skupine. Najviše vrijednosti oksidacije, i kod svježih i kod čuvanih jaja, zabilježene su u kontrolnoj skupini, zatim slijede O₂₀₀ te O₄₀₀ skupine, ali razlike nisu bile statistički značajne. Unatoč tome, najpovoljnije vrijednosti dobivene u O₄₀₀ skupini mogle bi se protumačiti zaštitnim djelovanjem luteina.

Lutein djeluje kao hvatač superoksidnih i hidroksilnih radikala te inhibira lipidnu peroksidaciju u modelnim sustavima (*in vitro*), a ujedno povećava aktivnost antioksidativnih enzima katalaze, superoksid dismutaze, glutation reduktaze i glutation u krvi i jetri laboratorijskih miševa (**Sindhu i sur., 2010.**). Međutim, istraživanja o antioksidativnom djelovanju luteina u kokošjim jajima su rijetka. Poznato je da su jaja obogaćena n-3 masnim kiselinama pojačano osjetljiva na oksidaciju što može uzrokovati probleme tijekom skladištenja i kuhanja jaja (**Cherian i sur., 1996.**). U istraživanju **Suraija i sur. (2000.)** kombinacija visokih razina vitamina E i luteina utjecala je na značajno smanjenje stvaranja MDA kao rezultat lipidne peroksidacije potaknute željeznim ionima, unatoč visokom sadržaju polinezasićene DHA u kokošjim jajima. U našem istraživanju vidljivo je pozitivno djelovanje luteina u smanjenju lipidne oksidacije u skupinama s povećanim sadržajem luteina, ali razlike nisu bile statistički značajne. Nadalje, obogaćivanje jaja vitaminom E i karotenoidima smanjilo je oksidaciju kolesterola u mastima žumanjka izloženima dušikovom oksidu (**Lai i sur., 1996.a**) ili tijekom pripreme jaja u prahu (**Lai i sur., 1996.b**). Također je pokazano da obogaćivanje jaja vitaminom E štiti karotenoide u žumanjku od oksidacije (**Lai i sur., 1996.b**). **Surai i sur. (2000.)** zaključuju da kombinacija dva antioksidansa, vitamina E i luteina, može poboljšati kvalitetu dizajniranih jaja tijekom skladištenja u usporedbi s običnim konzumnim jajima, čak i u prisutnosti povećanih razina DHA. Utjecaj luteina na oksidativne promjene u žumanjcima jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama istraživao je **Nain (2011.)**.

Kontrolna skupina nesilica dobivala je 10% lana u smjesi dok je pokusnoj skupini, pored 10% lana, dodano i 500 mg/kg luteina. TBARS vrijednosti, kao pokazatelji oksidacije, mjerene su na svježim jajima i jajima čuvanim 30 dana na 4°C. Na svježim jajima kontrolne skupine izmjereno je 0,6552 mg MDA/kg žumanjka, a u skupini s dodatkom luteina 0,5679 mg MDA/kg žumanjka. Navedene vrijednosti usporedive su s vrijednostima izmjerenima u našem istraživanju (0,605 mg MDA/kg kontrola te 0,571 mg MDA/kg skupina s 400 mg/kg luteina). Iako, kao i u našem istraživanju, nije utvrđena statistički značajna razlika između vrijednosti izmjerenih u kontrolnoj i pokusnoj skupini, vidljivo je zaštitno djelovanje luteina na smanjenje oksidacije lipida u pokusnoj skupini. Kod jaja čuvanih 28 dana navedeni autor utvrdio je 0,7557 mg MDA/kg u kontrolnoj skupini te 0,6490 mg MDA/kg u pokusnoj skupini. Razlike između svježih i čuvanih jaja nisu bile statistički značajne, ali vidljiv je utjecaj vremena čuvanja na porast koncentracije produkata oksidacije lipida u žumanjcima. Vrijednosti oksidacije izmjerene u našem istraživanju na čuvanim jajima bile su nešto više nego kod navedenog autora i to 0,803 mg MDA/kg kontrola te 0,711 mg MDA/kg skupina s 400 mg/kg luteina, ali u skladu s trendom manjih oksidativnih promjena u skupini s dodatkom luteina.

Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila antioksidativna sposobnost luteina, samog i u kombinaciji s drugim antioksidansima, na oksidativnu stabilnost masti žumanjaka jaja obogaćenih s omega-3 masnim kiselinama.

Na Grafikonu 8. prikazane su navedene vrijednosti pri čemu se bolje vidi utjecaj vremena analize jaja, odnosno vremena čuvanja jaja. Kod jaja analiziranih nakon 28 dana čuvanja utvrđene su značajno veće ($P < 0,001$) vrijednosti oksidacije lipida u sve tri skupine nego kod svježih jaja.



Grafikon 8. Oksidacija lipida u žumanjcima jaja tretmana O mjerena na svježim jajima (1. dan) i jajima čuvanima 28 dana u hladnjaku na 4°C

5.3.6. Biokemijski pokazatelji u krvi nesilica

Rezultati određivanja sadržaja biokemijskih pokazatelja u krvi nesilica tretmana O prikazani su u Tablici 28. Sadržaj biokemijskih pokazatelja u krvi nesilica tretmana O nije bio pod utjecajem luteina dodanog u smjese za nesilice ($P>0,05$). Vrijednosti glukoze, uree, kreatinina i albumina bile su ujednačene između pokusnih skupina. Najveća vrijednost GGT-e izmjerena je u O₂₀₀ skupini (29,2 U/L), a najmanja u O₄₀₀ skupini (20,5 U/L). Sadržaj ukupnih proteina i albumina opadao je ($O_0 > O_{200} > O_{400}$), a sadržaj KOL i HDL rastao ($O_0 < O_{200} < O_{400}$) s dodatkom luteina u smjese. Vrijednosti kolesterola kretale su se od 2,78 mmol/L (O₀) do 3,72 mmol/L (O₄₀₀), a HDL kolesterola od 0,68 mmol/L (O₀) do 0,90 mmol/L (O₄₀₀). Najviše vrijednosti TGC zabilježene su u O₂₀₀ skupini (19,44 mmol/L), slijedi O₀ (17,57 mmol/L) te O₄₀₀ (18,45 mmol/L). Najveća koncentracija SOD izmjerena je u kontrolnoj skupini (0,721 U/L), a najmanja u O₂₀₀ skupini (0,587 U/L). Koncentracija utvrđena u O₄₀₀ skupini bila je između navedenih vrijednosti (0,658 U/L).

Tablica 28. Prosječne vrijednosti biokemijskih pokazatelja u krvi nesilica tretmana O (\bar{x} ; n=7 po tretmanu)

| Pokazatelj | Tretman | | | SEM | P vrijednost |
|--------------------|----------------|------------------|------------------|-------|--------------|
| | O ₀ | O ₂₀₀ | O ₄₀₀ | | |
| GGT (U/L) | 22,7 | 29,2 | 20,5 | 3,028 | 0,137 |
| GUK (mmol/L) | 10,51 | 10,21 | 10,37 | 0,396 | 0,866 |
| UREA (mmol/L) | 0,57 | 0,55 | 0,58 | 0,027 | 0,703 |
| CRE (μ mol/L) | 24,7 | 23,8 | 23,3 | 0,639 | 0,342 |
| PROT (g/L) | 52,1 | 50,3 | 49,7 | 2,228 | 0,727 |
| ALB (g/L) | 18,8 | 18,1 | 17,6 | 0,701 | 0,516 |
| KOL (mmol/L) | 2,78 | 3,10 | 3,72 | 0,427 | 0,303 |
| HDL (mmol/L) | 0,68 | 0,72 | 0,90 | 0,118 | 0,386 |
| TGC (mmol/L) | 17,57 | 19,44 | 18,45 | 1,402 | 0,648 |
| SOD (U/L) | 0,721 | 0,587 | 0,658 | 0,043 | 0,114 |

\bar{x} =aritmetička sredina; SEM=standardna greška aritmetičke sredine; O₀= bez dodatka luteina u smjesu, O₂₀₀= dodano 200 mg/kg luteina u smjesu i O₄₀₀= u smjesu je dodano 400 mg/kg luteina

U literaturi nema podataka o utjecaju dodatka luteina u kombinaciji s uljima bogatim omega-3 masnim kiselinama u hranu na biokemijske pokazatelje krvi nesilica. Stoga su spomenuti rezultati nekih autora koji su istraživali utjecaj biljnih i ribljeg ulja na biokemijske pokazatelje u krvi.

Ahmad i sur. (2014.) istraživali su utjecaj dodatka repičinog ulja (0, 2, 3 i 4%) na koncentracije ukupnog, HDL- i LDL-kolesterola te glukoze u serumu nesilica. Dodatak različitih razina repičinog ulja nije utjecao ($P>0,05$) na razine navedenih pokazatelja u krvi nesilica iako je s povećanjem udjela repičinog ulja u hrani došlo do blagog povećanja koncentracije ukupnog kolesterola i HDL-kolesterola te smanjenja koncentracije LDL-kolesterola. U skupini sa 4% ulja zabilježeno je 139 mg/dl ukupnog KOL, 54,3 mg/dl HDL te 69,5 mg/dl LDL, što preračunato u jedinice iskazane u našim rezultatima (mmol/L) iznosi redom: KOL 3,6, HDL 1,4 i LDL 1,8. Navedene vrijednosti KOL odgovaraju vrijednosti izmjerenoj u našoj O₄₀₀ skupini, dok su u ostalim skupinama te vrijednosti niže. HDL kolestrol s vrijednošću od 1,4 mmol/L gotovo je dvostruko veći nego u našem istraživanju (0,68 – 0,9 mmol/L). Koncentracija glukoze bila je ujednačena između

pokusnih skupina te je u skupini s 4% ulja iznosila 255,60 mg/dl, što preračunato iznosi 14 mmol/L. Ta vrijednost veća je od onih izmjerenih u našem istraživanju, gdje su se vrijednosti GUK kretale od 10,21 do 10,51 mmol/L. **Basmacioğlu i sur. (2003.)** istraživali su utjecaj dodatka ribljeg ulja i sjemenki lana na krvne pokazatelje kod kokoši nesilica starih 34 tjedna. Rezultati su pokazali da kombinacija ribljeg ulja (1,5%) i sjemenki lana (4,32%) nije utjecala na sadržaj triglicerida, kolesterola i HDL kolesterola u odnosu na skupine sa dodatkom samo ribljeg ulja ili samo sjemenki lana. U skupini u kojoj je dodana navedena kombinacija sadržaj TGC bio je 1418 mg/dL (16 mmol/L), KOL 105,5 mg/dL (2,71 mmol/L) i HDL 39 mg/dL (1,01 mmol/L). Vrijednosti TGC i KOL veće su, a vrijednost HDL manja nego u našem istraživanju. Utjecaj dodatka različitih izvora ulja na biokemijske pokazatelje u krvi prepelica istraživali su **Al-Daraji i sur. (2010.)**. Prepelice su u hrani dobivale 3% suncokretovog, lanenog, kukuruznog ili ribljeg ulja. Autori su primijetili da je sadržaj ukupnih proteina, albumina, glukoze i HDL-kolesterola bio veći ($P < 0,05$) u skupinama s lanenim i ribljim uljem u odnosu na ostale skupine. S druge strane, sadržaj ukupnog kolesterola, triglicerida, LDL-kolesterola i kreatinina bio je manji u skupinama s lanenim i ribljim uljem ($P < 0,05$). Prosječne vrijednosti PROT (60,3 g/L), ALB (39,2 g/L), GUK (17,54 mmol/L), KOL (4,45 mmol/L), HDL (2,48 mmol/L) i CRE (74,26 μ mol/L) utvrđene kod prepelica u skupinama s lanenim i ribljim uljem znatno su veće, a jedino je sadržaj TGC (1,72 mmol/L) znatno manji kod prepelica nego kod kokoši nesilica u našem istraživanju. Autori su zaključili da dodatak ribljeg i lanenog ulja u hranu značajno poboljšava krvni profil prepelica u usporedbi sa suncokretovim i kukuruznim uljem. **Hajizadeh i Shahryar (2014.)** proveli su istraživanje o utjecaju različitih udjela (2 i 4%) repičinog ulja na krvne pokazatelje kod prepelica. Rezultati su pokazali da dodatak 4% repičinog ulja utječe na povećanje sadržaja glukoze u krvi, dok je sadržaj ukupnog, HDL- i LDL-kolesterola kao i triglicerida bio manji u odnosu na skupinu s 2% ulja, ali nije utvrđena statistička značajnost ($P > 0,05$). U skupini s 4% ulja izmjereno je 17,4 mmol/L GUK, što je znatno veće nego prosječna vrijednost GUK od 10,36 mmol/L u našem istraživanju. Vrijednosti TGC, KOL i HDL kolesterola bile su: 1,2, 5,6 te 2,6 mmol/L. Sadržaj TGC kod prepelica znatno je manji nego kod kokoši nesilica (~18,49 mmol/L) izmjeren u našem istraživanju, dok su vrijednosti KOL i HDL prosječno za 2 jedinice veće nego u našem istraživanju.

6. ZAKLJUČCI

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj luteina dodanog u hranu nesilica na povećanje sadržaja luteina u žumanjcima standardnih jaja i jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama i njegovo djelovanje na proizvodne pokazatelje nesilica, fizikalna i kemijska svojstva kvalitete jaja, profil masnih kiselina i oksidaciju lipida u žumanjcima te biokemijske pokazatelje u krvi nesilica. Na temelju rezultata provedenih istraživanja može se zaključiti:

Utjecaj tretmana K na istraživana svojstva

- Lutein dodan u smjese za nesilice tretmana K nije utjecao na razlike u tjelesnim masama nesilica između pokusnih skupina ($P > 0,05$).
- Proizvodni pokazatelji (broj jaja po nesilici, intenzitet nesivosti, kao i konzumacija hrane) bili su ujednačeni između pokusnih skupina.
- Promatrajući pokazatelje vanjske kvalitete jaja tretmana K uočava se značajan utjecaj luteina dodanog u smjese na masu jaja ($P = 0,028$) i debljinu ljuske ($P = 0,001$). Masa jaja iz tretmana K_{200} bila je statistički značajno veća kod skladištenih jaja. Utvrđena je značajno tanja ljuska skladištenih jaja u tretmanu K_{200} u odnosu na ostale tretmane. Na ostale pokazatelje vanjske kvalitete jaja (dužina, širina, indeks oblika te čvrstoća ljuske) lutein nije značajno utjecao ($P > 0,05$).
- Na masu osnovnih dijelova, visinu bjelanjka i Haugh-ove jedinice lutein dodan u smjese za nesilice nije imao utjecaja ($P > 0,05$).
- Dodatak luteina značajno je utjecao na pH vrijednost žumanjka ($P < 0,001$). Utvrđena je značajno manja pH vrijednost žumanjka kod skladištenih jaja K_{200} tretmana u odnosu na ostale tretmane. Za pH vrijednost bjelanjka, indekse loma svjetlosti bjelanjka i žumanjka te vrijednosni broj i stupanj starenja nije utvrđen utjecaj luteina ($P > 0,05$).
- Lutein je značajno ($P < 0,001$) utjecao na boju žumanjka. Utvrđeno je značajno povećanje intenziteta boje s porastom koncentracije luteina u smjesama, kako kod svježih tako i kod skladištenih jaja. U skupini bez dodatka luteina boja žumanjka svježih jaja iznosila je 9,63, u skupini K_{200} 12,77, a u K_{400} 13,50. Kod skladištenih jaja boja je bila 10,30 (K_0), 13,27 (K_{200}) te 14,00 (K_{400}).

- Dodatak luteina značajno je utjecao i na CIE Lab pokazatelje boje ($P < 0,001$). Utvrđeno je značajno smanjenje svjetloće (CIE L^*) te značajno povećanje intenziteta crvene (CIE a^*) i žute (CIE b^*) boje žumanjka u tretmanima s 200 i 400 mg/kg luteina.
- Dodatak luteina u smjese za nesilice statistički je značajno ($P < 0,001$) utjecao na povećanje sadržaja luteina u žumanjcima jaja tretmana K. U skupini bez dodatka luteina izmjereno je prosječno 12,73 μg luteina/g žumanjka. Uz dodatak 200 i 400 mg/kg luteina u smjesi sadržaj luteina u žumanjcima raste na 88,72 $\mu\text{g/g}$, odnosno 98,43 $\mu\text{g/g}$ žumanjka.
- Preračunato na 60 g jajeta sadržaj luteina u jajima tretmana K iznosi 0,20 mg, odnosno 1,38 mg te 1,53 mg u obogaćenim jajima, što predstavlja značajan doprinos unosu luteina kod ljudi.
- Dodatak 200 mg/kg luteina uzrokovao je značajan porast sadržaja ukupnih MUFA ($P = 0,007$) te smanjenje ukupnih n-6 PUFA ($P = 0,002$) i n-3 PUFA ($P = 0,021$) u žumanjcima K_{200} skupine u odnosu na K_0 i K_{400} skupine. Omjer n-6/n-3 PUFA bio je veći u pokusnim skupinama u odnosu na kontrolnu, ali razlike nisu bile značajne ($P > 0,05$).
- U žumanjcima jaja K_{200} i K_{400} pokusnih skupina zabilježene su manje vrijednosti lipidne oksidacije u odnosu na K_0 , ali razlike nisu bile statistički značajne ($P > 0,05$).
- Lutein dodan u smjese za nesilice nije utjecao ($P > 0,05$) na vrijednosti biokemijskih pokazatelja u krvi nesilica u usporedbi sa skupinom nesilica koja je hranjena bez dodatka luteina.

Utjecaj tretmana O na istraživana svojstva

- Lutein dodan u hranu nesilica, u kombinaciji s uljima bogatima omega-3 masnim kiselinama, nije utjecao na mase nesilica u tretmanu O ($P > 0,05$).
- ukupan broj jaja, broj jaja po nesilici te intenzitet nesivosti bili su nešto veći u pokusnim skupinama, zbog većeg broja životinja na početku pokusa (manje uginuća u pripremnom razdoblju).
- Dodatak luteina nije uzrokovao značajne promjene ($P > 0,05$) pokazatelja vanjske kvalitete jaja O tretmana (duljina, širina, indeks oblika, masa jaja, čvrstoća i debljina ljuske)
- Na pokazatelje unutarnje kvalitete jaja tretmana O (masa osnovnih dijelova, visina bjelanjka i Haugh-ove jedinice) također nije zabilježen značajan utjecaj luteina ($P > 0,05$).

-
- Dodatak luteina uzrokovao je značajan ($P < 0,001$) porast pH vrijednosti bjelanjka svježih jaja tretmana O, dok kod skladištenih jaja nije bilo značajnih razlika između pokusnih skupina ($P > 0,05$).
 - Na pH vrijednost žumanjka, indekse loma svjetlosti bjelanjka i žumanjka te VB i SS jaja tretmana O lutein nije imao utjecaja ($P > 0,05$).
 - Zabilježen je značajan utjecaj luteina ($P < 0,001$) na boju žumanjka. Intenzitet boje porastao je s 12,90 (O_0) na 13,67 u O_{200} skupini te 13,77 u O_{400} skupini za svježa jaja, te s 13,10 (O_0) na 14,13 (O_{200}) te 14,40 (O_{400}) kod skladištenih jaja.
 - Dodatak luteina značajno je utjecao na povećanje intenziteta crvenila (CIE a^*) žumanjka ($P < 0,001$), dok na CIE L^* i CIE b^* vrijednosti boje nije imao utjecaja ($P > 0,05$).
 - Sadržaj luteina u žumanjcima jaja tretmana O značajno ($P < 0,001$) je porastao uz dodatak luteina u smjese. U O_0 skupini prosječan sadržaj luteina bio je 21,34 $\mu\text{g/g}$ žumanjka, a u pokusnim skupinama 105,58 $\mu\text{g/g}$ (O_{200}) te 116,09 $\mu\text{g/g}$ (O_{400}). Preračunato na 60 g jajeta te vrijednosti iznose 0,33 mg (O_0), 1,62 mg (O_{200}) i 1,78 mg (O_{400}).
 - Omega-3 jaje obogaćeno luteinom doprinosi unosu poželjnih omega-3 masnih kiselina i luteina u prehrani ljudi.
 - Na sadržaj SFA, MUFA i n-6 PUFA lutein dodan u smjese za nesilice nije imao utjecaja ($P > 0,05$), dok je sadržaj poželjnih n-3 PUFA značajno ($P = 0,017$) porastao uz dodatak luteina, a omjer n-6/n-3 PUFA značajno ($P = 0,025$) se smanjio u skupinama s luteinom. U kontrolnoj skupini omjer n-6/n-3 PUFA iznosio je 6,22, u O_{200} bio je 5,85, a u O_{400} 5,06.
 - Oksidacija lipida u žumanjcima jaja tretmana O nije bila pod utjecajem luteina ($P > 0,05$) iako su u pokusnim skupinama zabilježene manje vrijednosti oksidacije.
 - Dodatak luteina nije utjecao ($P > 0,05$) na promjenu biokemijskih pokazatelja u krvi nesilica tretmana O.

Dodatkom luteina u smjese za kokoši nesilice jaja se obogaćuju karotenoidom luteinom, koji je važan za zdravlje očiju, bez negativnog utjecaja na proizvodne pokazatelje i zdravlje nesilica te kvalitetu jaja. U kombinaciji s omega-3 masnim kiselinama, koje su važne za zdravlje srca, krvnih žila i mozga, dobiva se namirnica koja svojim svojstvima odgovara definiciji funkcionalne namirnice.

7. LITERATURA

1. Ahmad, S., Ahsan-ul-Haq, Kamran, Z., Yousaf, M., Ata-ur-Rehman, Sohail, M.U., Iqbal, Z., Manzoor, A., Riaz, M.T. (2014): Supplemental Effects of Canola Oil as a Source of Polyunsaturated Fatty Acids and Vitamin A on Production Performance, Blood Metabolites and Immune Response in Laying Hens. *Animal Nutrition and Feed Technology*, 14, 499-510.
2. Akter, Y., Kasim, A. Omar, H., Qurni Sazili, A. (2014): Effect of storage time and temperature on the quality characteristics of chicken eggs. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 12 (3&4), 87-92.
3. Al-Daraji, H.J., Al-Hassani, A.S., Al-Mashadani, H.A., Al-Hayani, W.K., Mirza, H.A. (2010): Effect of Dietary Supplementation with Sources of Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids on Certain Blood Characteristics of Laying Quail. *International Journal of Poultry Science*, 9(7), 689-694.
4. Altuntaş, A., Aydın, R. (2014): Fatty Acid Composition of Egg Yolk from Chickens Fed a Diet including Marigold (*Tagetes erecta* L.). *Journal of Lipids*, Article ID 564851, 4 pages, doi:10.1155/2014/564851
5. Altuntas, E., Sekeroglu, A. (2008): Effect of egg shape index on mechanical properties of chicken eggs. *Journal of Food Engineering*, 85, 606-612.
6. Alves-Rodrigues, A., Shao, A. (2004): The science behind lutein. *Toxicology Letters*, 150, 57-83.
7. Baker, R.T.M. (2001): Canthaxanthin in aquafeed applications: is there any risk? *Trends in Food Science and Technology*, 12, 240-243.
8. Barbosa, V.C., Gaspar, A., Calixto, L.F.L., Agostinho, T.S.P. (2011): Stability of the pigmentation of egg yolks enriched with omega-3 and carophyll stored at room temperature and under refrigeration. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(7), 1540-1544.
9. Barker, F.M. (2010): Dietary supplementation: Effects on visual performance and occurrence of AMD and cataracts. *Current Medical Research and Opinion*, 26, 2011-2023.
10. Basmacıoğlu, H. , Çabuk, M., Ünal, K., Özkan, K., Akkan, S., Yalçın, H. (2003): Effects of dietary fish oil and flax seed on cholesterol and fatty acid composition of egg yolk and blood parameters of laying hens. *South African Journal of Animal Science*, 33(4), 266-273.
11. Batkowska, J., Brodacki, A., Knaga, S. (2014): Quality of laying hen eggs during storage depending on egg weight and type of cage system (conventional vs. furnished cages). *Annals of Animal Science*, 14(3), 707-719.
12. Bhatti, B.M., Talat, T., Sardar, R., Naheed, G. (2002): Estimation of biochemical and haematological parameters after treatment with biovet in different strains of laying hens. *Pakistan Veterinary Journal*, 22(4), 162-165.
13. Bone, R.A., Landrum, J.T., Fernandez, L., Tarsis, S.L. (1988): Analysis of the macular pigment by HPLC: retinal distribution and age study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 29(6), 843-849.

14. Bourre, J.M., Galea, F. (2006): An important source of omega-3 fatty acids, vitamins D and E, carotenoids, iodine and selenium: A new natural multi-enriched egg. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 10 (5), 371-376.
15. Breithaupt, D.E. (2007): Modern application of xanthophylls in animal feeding - a review. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 501-506.
16. Brenna, J. (2002): Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 5, 127-132.
17. Britton, G. (1995): Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551-1558.
18. Brush, A.H. (1990): Metabolism of carotenoid pigments in birds. *The FASEB Journal*, 4: 2969-2977.
19. Buonocore, G., Perrone, S., Bracci, R. (2001): Free radicals and brain damage in the newborn. *Biology of the Neonate*, 79(3-4), 180-186.
20. Burkhardt, A. D. (1970): *Qualitätseigenschaften von Flüssigei*, Dissertation, Tübingen.
21. Capcarova, M., Kolesarova, A., Arpasova, H., Massanyi, P., Lukac, N., Kovacik, J., Kalafova, A., Schneidgenova, M. (2008): Blood Biochemical Dynamics and Correlations in Laying Hens after Experimental Nickel Administration. *International Journal of Poultry Science*, 7(6), 538-547.
22. Carranco-Jáuregui, M.E., Sanginés-García, L., Morales-Barrera, E., Carrillo-Domínguez, S., Ávila-González, E., Fuente-Martínez, B. (2006): Shrimp head meal in laying hen rations and its effects on fresh and stored egg quality. *INCI* [serial on the Internet]. 31(11): 822-827. Available from: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001100009 &lng=en](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001100009&lng=en)
23. Cedro, T.M.M., Calixto, L.F.L., Gaspar, A., Curvello, F.A., Hora, A.S. (2009): Internal Quality of Conventional and Omega- 3-Enriched Commercial Eggs Stored under Different Temperatures. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 11(3), 181-185.
24. Chait, A., Brunzell, J.D., Denke, M.A., Eisenberg, M., Ernst, N.D., Franklin, F.A. Jr., Ginsberg, H., Kotchen, T.A., Kuller, L., Mullis, R.M. (1993): Rationale of the diet-heart statement of the American Heart Association. Report of the Nutrition Committee. *Circulation*, 88(6), 3008-3029.
25. Cherian, G., Wolfe, F.W., Sim, J.S. (1996): Dietary oils with added tocopherols: Effects on egg or tissue tocopherols, fatty acids, and oxidative stability. *Poultry Science*, 75, 423-431.
26. Chung, H.Y., Rasmussen, H.M., Johnson, E.J. (2004): Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *The Journal of Nutrition*, 134, 1887-1893.
27. Commission Internationale de l'Eclairage (1976). www.cie.co.at/Publications/Standards
28. Csapó, J., Sugár, L., Horn, A., Csapó-Kiss, Z. (1987): Chemical composition of milk from red deer, roe and fallow deer kept in captivity. *Acta Agronomica Hungarica*, 36, 359-372.

29. Curran-Celentano, J., Hammond, B.R. Jr., Ciulla, T.A., Cooper, D.A., Pratt, L.M., Danis, R.B. (2001): Relation between dietary intake, serum concentrations, and retinal concentrations of lutein and zeaxanthin in adults in a Midwest population. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 796-802.
30. Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R., Paredes-Lopez O. (2000): Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains – characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 173-289.
31. Demming-Adams, B., Gilmore, A.M., Adams, W.W. (1996): In vivo functions of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal*, 10, 403-412.
32. Diretto, G., Tavazza, R., Welsch, R., Pizzichini, D., Mourgues, F., Papacchioli, V., Beyer, P., Giuliano, G. (2006): Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biology*, 6, 13.
33. DSM, http://www.dsm.com/markets/anh/en_US/products/products-solutions /products _solutions_tools/Products_solutions_tools_EggYolk.html
34. During, A.; Doraiswamy, S.; Harrison, E.H. (2008): Xanthophylls are preferentially taken up compared with beta-carotene by retinal cells via a SRBI-dependent mechanism. *The Journal of Lipid Research*, 49, 1715-1724.
35. Dwyer, J.H., Navab, M., Dwyer, K.M., Hassan, K., Sun, P., Shircore, P., Hama-Levy, S., Hough, G., Wang, X., Drake, T., Bairey Merz, N., Fogelman, A.M. (2001): Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. *Circulation*, 103, 2922-2927.
36. Englmaierová, M., Skřivan, M. (2013): Effect of synthetic carotenoids, lutein, and mustard on the performance and egg quality. *Scientia agriculturae bohemica*, 44(3): 138-143.
37. Englmaierová, M., Skřivan, M., Bubancová, I. (2013): A comparison of lutein, spray-dried *Chlorella*, and synthetic carotenoids effects on yolk colour, oxidative stability, and reproductive performance of laying hens. *Czech Journal of Animal Science*, 58(9): 412-419.
38. EUFIC (2006): The basics. Functional foods. <http://www.eufic.org/article/en/expid/basics-functional-foods/>, pristupljeno 09.03.2015.
39. EUFIC (2008): The importance of omega-3 and omega-6 fatty acids. <http://www.eufic.org/article/en/artid/The-importance-of-omega-3-and-omega-6-fatty-acids/>, pristupljeno 20.01.2015.
40. Ezhil Valavan, S. Mohan, B., Chandrasekaran, D., Mani, K., Mohan, B., Edwin, S.C. (2006): Effects of various n-3 lipid sources on the quality characteristics and fatty acids composition of chicken egg. <http://www.cabi.org/Uploads/animal-science/worlds-poultry-science-association/WPSA-italy-2006/10233.pdf>, pristupljeno 27.01.2015.
41. Farrell, D.J. (1998): Enrichment of hen eggs with n-3 long-chain fatty acids and evaluation of enriched eggs in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 538-544.
42. Fiedor, J., Burda, K. (2014): Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6, 466-488.

43. Franchini, A., Sirri, F., Tallarico, N., Minelli, G., Iaffaldano, N., Meluzzi, A. (2002): Oxidative Stability and Sensory and Functional Properties of Eggs from Laying Hens Fed Supranutritional Doses of Vitamins E and C. *Poultry Science* 81, 1744-1750.
44. Gajčević, Z. (2007.): Utjecaj selena i vitamina E na fizikalno kemijske osobine i očuvanje svježine jaja. Magistarski rad. Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
45. Gao, S., Qin, T., Liu, Z., Caceres, M.A., Ronchi, C.F., Chen, C.Y., Yeum, K.J., Taylor, A., Blumberg, J.B., Liu, Y., Shang, F. (2011): Lutein and zeaxanthin supplementation reduces H₂O₂-induced oxidative damage in human lens epithelial cells. *Molecular Vision*, 17, 3180-3190.
46. Golzar Adabi, S.H., Kamali, M.A., Davoudi, J., Cooper, R.G., Hajbabaei, A. (2010): Quantification of lutein in egg following feeding hens with a lutein supplement and quantification of lutein in human plasma after consumption of lutein enriched eggs. *Archiv für Geflügelkunde*, 74(3), 158-163.
47. Gonzales-Esquerria, R., Leeson, S. (2000): Effect of feeding hens regular or deodorized menhaden oil on production parameters, yolk fatty acid profile, and sensory quality of eggs. *Poultry Science*, 79, 1597-1602.
48. González, S., Astner, S., Wu, A., Goukassian, D., Pathak, M. (2003): Dietary lutein/zeaxanthin decreases ultraviolet B-induced epidermal hyperproliferation and acute inflammation in hairless mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 121, 399-405.
49. Granado, F., Olmedilla B., Blanco I. (2003): Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British Journal of Nutrition*, 90, 487-502.
50. Grobas, S., Mendez, J., Lazaro, R., de Blas, C., Mateos, G.G. (2001): Influence of Source and Percentage of Fat Added to Diet on Performance and Fatty Acid Composition of Egg Yolks of Two Strains of Laying Hens. *Poultry Science*, 80, 1171-1179.
51. Gyenis, J., Sütő, Z., Romvári, R., Horn, P. (2006): Tracking the development of serum biochemical parameters in two laying hen strains – a comparative study. *Archiv Tierzucht Dummerstorf*, 49(6), 593-606.
52. Hagan, J.K., Adjei, I.A., Baah, A. (2013): Effects of extended period of storage and strain of layer on quality of chicken eggs. *Journal of Science and Technology*, 33(2), 1-11.
53. Hajizadeh, A., Shahryar, H.A. (2014): Effects of Canola Oil Peroxide at Different Replicate of Heating on Blood Parameters in Japanese Quail. *Biological Forum – An International Journal*, 6(2): 135-137.
54. Halliwell, B. (1996): Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33-50.
55. Hamilton, P.B. (1992): The use of high-performance liquid chromatography for studying pigmentation. *Poultry Science*, 71, 718-724.
56. Hamilton, P.B., Parkhurst, C.R. (1990): Improved deposition of oxycarotenoids in egg yolks by dietary cottonseed oil. *Poultry Science*, 69, 354-359.
57. Hammershøj, M., Kidmose, U., Steinfeldt, S. (2010): Deposition of carotenoids in egg yolk by short-term supplement of coloured carrot (*Daucus carota*) varieties as forage material for egg-laying hens. *J. Sci. Food. Agric.*, 90, 1163-1171.

58. Hamułka, J., Koczara, J., Gronek, M. (2005): Lutein content of selected polish foods and estimation of its intake. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(2), 201-206.
59. Handelman, G.J., Nightingale, Z.D., Lichtenstein, A.H., Schaefer, E.J., Blumberg, J.B. (1999): Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 247-251.
60. Hasler, C. M. (2002): Functional foods: Benefits, Concerns and Challenges - A Position Paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition*, 132, 3772-3781.
61. Hata, T.R., Scholz, T.A., Ermakov, I.V., McClane, R.W., Khachik, F., Gellermann, W., Pershing, L.K. (2000): Non-invasive Raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 115, 441-448.
62. Hencken, H. (1992): Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poultry Science*, 71, 711-717.
63. Hollander, D. (1981): Intestinal absorption of vitamins A, E, D, and K. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 97, 449-462.
64. Hosseini Siyar, S.A., Aliarabi, H., Ahmadi, A., Ashori, N. (2007): Effect of different storage conditions and hen age on egg quality parameters. *Australian Poultry Science Symposium*, 19, 106-109.
65. Hu, F.B., Stampfer, M.J., Rimm, E.B., Manson, J.E., Ascherio, A., Colditz, G.A., Rosner, B.A., Spiegelman, C., Speizer, F.E., Sacks, F.M., Hennekens, C.H., Willett, W.C. (1999): A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. *The Journal of the American Medical Association*, 281, 1387-1394.
66. Hurwitz, S., Bar, A., Katz, M., Sklan, D., Budowski, P. (1973): Absorption and secretion of fatty acids and bile acids in the intestine of the laying fowl. *The Journal of Nutrition*, 103, 543-547.
67. Jang, I., Ko, Y., Kang, S., Kim, S., Song, M., Cho, K., Ham, J., Sohn, S. (2014): Effects of Dietary Lutein Sources on Lutein-Enriched Egg Production and Hepatic Antioxidant System in Laying Hens. *The Journal of Poultry Science*, 51, 58-65.
68. Janke, A., Jirak, L. (1934): Über die Zersetzung und Ha *European Food Research and Technology*, 69, 434-452.
69. Jeon, J.Y.; Kim, K.E.; Im, H.J.; Oh, S.T.; Lim, S.U.; Kwon, H.S.; Moon, B.H.; Kim, J.M.; An, B.K.; Kang, C.W. (2012): The Production of Lutein-Enriched Eggs with Dietary Chlorella. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, 32(1), 13-17.
70. Jin, Y.H., Lee, K.T., Lee, W.I., Han, Y.K. (2011): Effects of Storage Temperature and Time on the Quality of Eggs from Laying Hens at Peak Production. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(2), 279-284.
71. Johnson, E.J. (2013): Emerging Science on Lutein in the Brain. 114th Abbott Nutrition Research Conference Cognition and Nutrition, April 8 - April 9, 2013, Columbus, OH, USA. <http://static.abbottnutrition.com/cms-prod/anh.org/img/Johnson.pdf>
72. Johnson, E.J., McDonald, K., Caldarella, S.M., Chung, H.Y., Snodderly, D.M. (2008): Cognitive findings of an exploratory trial of docosahexaenoic acid and lutein supplementation in older women. *Nutritional Neuroscience*, 11, 75-83.

73. Johnson, E.J., Vishwanathan, R., Johnson, M.A., Hausman, D.B., Davey, A., Scott, T. M., Green, R.C., Miller, L.S., Gearing, M., Woodard, J., Nelson, P.T., Chung, H.Y., Schalch, W., Wittwer, J., Poon, L.W. (2013): Relationship between Serum and Brain Carotenoids, α -Tocopherol, and Retinol Concentrations and Cognitive Performance in the Oldest Old from the Georgia Centenarian Study. *Journal of Aging Research*, Article ID 951786, 13 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/951786>
74. Johnson, J.D. (2007): Lutein and Zeaxanthin. An Introduction to the Chemistry of Dietary Carotenoids. <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotenoids/carotenoids.htm>
75. Junghans, A., Sies, H., Stahl, W. (2001): Macular pigments lutein and zeaxanthin as blue light filters studied in liposomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391, 160-164.
76. Jurkiewicz-Lange, B., Buettner, G. (2001): Electron paramagnetic resonance detection of free radicals in UV-irradiated human and mouse skin. In: Thiele J, Elsner P, editors. *Oxidants and antioxidants in cutaneous biology: current problems in dermatology*, vol. 29. Basel: Karger; 2001. p. 18-25.
77. Karadas, F., Grammenidis, E., Surai, P.F., Acamovic, T., Sparks, N.H.C. (2006): Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. *British Poultry Science*, 47(5), 561-566.
78. Kennel, L.S. (2000): Carotenoid pigments, in *Encyclopedia of Food Science and Technology*, 2nd Ed., Vol 1., Wiley-Interscience, New York, 2000.
79. Khachik, F. (2006): Distribution and metabolism of dietary carotenoids in humans as a criterion for development of nutritional supplements. *Pure and Applied Chemistry*, 78(8), 1551-1557.
80. Koh, W.P., Yuan, J.M., Wang, R., Lee, Y.P., Lee, B.L., Yu, M.C., Ong, C.N. (2011): Plasma carotenoids and risk of acute myocardial infarction in the Singapore Chinese health study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21, 685-690.
81. Kotake-Nara, E., Nagao, A. (2011): Absorption and Metabolism of Xanthophylls. *Marine Drugs*, 9, 1024-1037.
82. Kotrbáček, V., Skřivan, M., Kopecký, J., Pěnkava, O., Hudečková, P., Uhríková, I., Doubek, J. (2013): Retention of carotenoids in egg yolks of laying hens supplemented with heterotrophic *Chlorella*. *Czech Journal of Animal Science*, 58(5), 193-200.
83. Kovács, G., Schmidt, J., Husvéth, F., Dublec, K., Wágner, L., Farkas-Zele, E. (2000): Effect of feed composition on cholesterol content of the table egg. *Acta Alimentaria (Budapest)*, 29(1): 25-41.
84. Kralik, G. (1976.): Istraživanja promjena nekih sastojaka jaja Nick-Chick kokoši tokom čuvanja pod različitim uvjetima. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
85. Kralik, G., Gajčević, Z., Suchý, P., Straková, E., Hanžek, D. (2009): Effects of Dietary Selenium Source and Storage on Internal Quality of Eggs. *Acta Veterinaria Brno*, 78, 219-222.
86. Kralik, G., Has-Schön, E., Kralik, D., Šperanda, M. (2008.a): Peradarstvo. Biološki i zootehnički principi. Grafika Osijek, 2008., ISBN 978-953-6331-60-4.
87. Kralik, G., Škrtić, Z., Gajčević, Z., Hanžek, D. (2007.): Utjecaj različitih ulja u hrani za nesilice na kakvoću jaja i sadržaj masnih kiselina u žumanjku jajeta. *Krmiva*, 49(3), 115-125.

88. Kralik, G., Škrtić, Z., Suchý, P., Straková, E., Gajčević, Z. (2008b): Feeding Fish Oil and Linseed Oil to Laying Hens to Increase the n-3 PUFA of Egg Yolk. *Acta Veterinaria Brno*, 77, 561-568.
89. Kralik, G., Tolušić, Z., Gajčević, Z., Kralik, I., Hanžek, D. (2006): Commercial quality evaluation of different weight-grade eggs. *Acta Agraria Kaposvariensis*, 10(2), 199-206.
90. Kralik, Z., Kralik, G., Grčević, M., Galović, D. (2014): Effect of storage period on the quality of table eggs. *Acta Agraria Kaposváriensis*, 18(1), 200-206.
91. Kralik, Z., Kralik, G., Grčević, M., Škrtić, Z., Biazik, E. (2012.): Usporedba kvalitete konzumnih jaja različitih proizvođača. *Krmiva* 54(1), 17-21.
92. Krauss, R.M., Eckel, R.H., Howard, B., Appel, L.J., Daniels, S.R., Deckelbaum, R.J., Erdman, Jr., J.W., Kris-Etherton, P., Goldberg, I.J., Kotchen, T.A., Lichtenstein, A.H., Mitch, W.A., Mullis, R., Robinson, K., Wylie-Rosett, J., St. Jeor, S., Suttie, J., Tribble, D.L., Bazzarre, T.L. (2000): AHA Dietary Guidelines. Revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Stroke*, 31, 2751-2766.
93. Krinsky, N.I. (1994): The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 1003-1010.
94. Krinsky, N.I. (2002): Possible Biologic Mechanisms for a Protective Role of Xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, 132, 540-542.
95. Lai, S.-M., Gray, J.I., Chen, C., Grulke, E.A. (1996): Nitrogen Oxide-Initiated Cholesterol Oxidation and Carotenoid Degradation in an Egg Lipid Model System. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(2), 179-186.
96. Lai, S.-M., Gray, J.I., Partridge, J.A., Flegal, C.J. (1996): Stability of Cholesterol and Paprika Carotenoids in Egg Powders as Influenced by Dietary and Processing Treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72, 171-178.
97. Landrum, J., Bone, R. (2001): Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385, 28-40.
98. Landrum, J., Bone, R., Mendez, V., Valenciaga, A., Babino, D. (2012): Comparison of dietary supplementation with lutein diacetate and lutein: A pilot study of the effects on serum and macular pigment. *Acta Biochimica Polonica*, 59, 167-169.
99. Lazrak, T., Milon, A., Wolff, G., Albrecht, A.M., Mieke, M., Ourisson, G., Nakatani, Y. (1987): Comparison of the effects of inserted C40- and C50-terminally dihydroxylated carotenoids on the mechanical properties of various phospholipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 903, 132-141.
100. Lee, E.H., Faulhaber, D., Hanson, K.M., Ding, W., Peters, S., Kodali, S., Granstein, R.D. (2004): Dietary lutein reduces ultraviolet radiation-induced inflammation and immunosuppression. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(2), 510-517.
101. Leeson, S., Caston, L., Namkung, H. (2007): Effect of dietary lutein and flax on performance, egg composition and liver status of laying hens. *Canadian Journal of Animal Science*, 87, 365-372.
102. Leeson, S., Caston, L. (2004): Enrichment of eggs with lutein. *Poultry Science*, 83, 1709-1712.

103. Lobo, M.V., Huerta, L., Ruiz-Velasco, N., Teixeira, E., de La Cueva, P., Celdran, A., Martín-Hidalgo, A., Vega, M.A., Bragado, R. (2001): Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: Towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 49, 1253-1260.
104. Lokaewmanee, K., Yamauchi, K., Komori, T., Saito, K. (2011): Enhancement of xolk color in raw and boiled egg yolk with lutein from marigold flower meal and marigold flower extract. *The Journal of Poultry Science*, 48, 25-32.
105. Lugasi, A., Neszlényi, J., Hóvári, K., Lebovics, V., Hermán, A., Ács, T., Gundel, J., Bodó, I. (2006): Dietary manipulation of meat fatty acid composition in Hungarian Mangalica and an industrial genotype pig. *Acta Alimentaria (Budapest)*, 35, 385-395.
106. Maiani, G., Periago Castón, M.J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I.G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U. (2009): Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(2), 194-218.
107. Mandić, M.L. (2007.): Znanost o prehrani: hrana i prehrana u čuvanju zdravlja. Osijek: Prehrambeno tehnološki fakultet.
108. Maoka, T. (2009): Recent progress in structural studies of carotenoids in animals and plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 191-195.
109. Marik, P.E., Varon, J. (2009): Omega-3 Dietary Supplements and the Risk of Cardiovascular Events: A Systematic Review. *Clinical Cardiology*, 327, 365-372.
110. Martin, K.R., Wu, D., Meydani, M. (2000): The effect of carotenoids on the expression of cell surface adhesion molecules and binding of monocytes to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, 150, 265-274.
111. Marusich, W.L., Bauernfeind, J.C. (1981): Oxycarotenoids in poultry feeds. In: *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors* (Bauernfeind JC ed.). pp. 320-462. Academic Press, New York-London. 1981.
112. Meluzzi, A.F. Sirri, G. Manfreda, N. Tallarico, A. Franchini (2000): Effects of dietary vitamin E on the quality of table eggs enriched with n-3 long-chain fatty acids. *Poultry Science*, 79, 539-545.
113. Ministarstvo poljoprivrede (2014.). <http://www.mps.hr/default.aspx?id=11773>, pristupljeno 10.11.2014.
114. Moan, J. (2001): Visible light and UV radiation. In *Radiation at Home, Outdoors and in the Workplace* (D. Brune, R. Helborg, B. R. R. Persson, and R. Paakkonen, Eds.) Scandinavian Science Publishers, Oslo, Norway.
115. Morganti, P., Bruno, C., Guarneri, F., Cardillo, A., Del Ciotto, P., Valenzano, F. (2002): Role of topical and nutritional supplements to modify the oxidative stress. *International Journal of Cosmetic Science*, 24, 331-339.
116. Moussa, M., Landrier, J.F., Reboul, E., Ghiringhelli, O., Comera, C., Collet, X., Fröhlich, K., Böhm, V., Borel, P. (2008): Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *The Journal of Nutrition*, 138, 1432-1436.

117. Nain, Sandeep (2011): Improving the Effectiveness of Laying Hens for Use in Value-Added Egg Production. A thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Animal Science. Department of Agricultural, Food and Nutritional Science Edmonton, Alberta, Spring 2011.
118. Nikolova, N. Kocevski, D. (2006): Forming egg shape index as influenced by ambient temperatures and age of hens. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 22(1-2), 119-125.
119. Nilsson, S.E., Sundelin, S.P., Wihlmark, U., Brunk, U.T. (2003): Aging of cultured retinal pigment epithelial cells: oxidative reactions, lipofuscin formation and blue light damage. *Documenta Ophthalmologica*, 106, 13-16.
120. Nys, Y. (2000): Dietary carotenoids and egg yolk coloration-a review. *Archiv für Geflügelkunde*, 64, 45-54.
121. Olson, J.A. (1994): Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 1011-1016.
122. Palombo, P., Fabrizi, G., Ruocco, V., Ruocco, E., Fluhr, J., Roberts, R. (2007): Beneficial long-term effects of combined oral/topical antioxidant treatment with carotenoids lutein and zeaxanthin on human skin: a double-blind, placebo-controlled study. *Skin Pharmacology and Physiology*, 20, 199-210.
123. Panfoli, I., Calzia, D., Ravera, S., Morelli, A.M., Traverso, C.E. (2012): Extra-mitochondrial aerobic metabolism in retinal rod outer segments: New perspectives in retinopathies. *Medical Hypotheses*, 78, 423-427.
124. Pappas, A.C., Acamovic, T., Sparks, N.H., Surai, P.F., McDevitt, R.M. (2005): Effects of supplementing broiler breeder diets with organic selenium and polyunsaturated fatty acids on egg quality during storage. *Poultry Science*, 84(6), 865-74.
125. Parker, R.S. (1996): Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *The FASEB Journal*, 10(5), 542-551.
126. Pavlík, A., Pokludová, M., Zapletal, D., Jelínek, P. (2007): Effects of Housing Systems on Biochemical Indicators of Blood Plasma in Laying Hens. *Acta Veterinaria Brno*, 76, 339-347.
127. Peng, Y.M., Peng, Y.S., Lin, Y., Moon, T., Roe, D.J., Ritenbaugh, C. (1995): Concentrations and plasma-tissue-diet relationships of carotenoids, retinoids, and tocopherols in humans. *Nutrition and Cancer*, 23(3), 233-246.
128. Perrone, S., Longini, M., Marzocchi, B., Picardi, A., Bellieni, C.V, Proietti, F., Rodriguez, A., Turrisi, G., Buonocore, G. (2010): Effects of Lutein on Oxidative Stress in the Term Newborn: A Pilot Study. *Neonatology*, 97, 36-40.
129. Perry, A., Rasmussen, H., Johnson, E. J. (2009): Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 9-15.
130. Pravidnik o kakvoći jaja, *Narodne novine* 115/06., 69/08., 76/08.
131. Pravidnik o registraciji gospodarstava na kojima se drže kokoši nesilice, *Narodne novine* 113/10., 05/13. i 36/13.
132. Qureshi, A.I., Fareed, M., Suri, K., Ahmed, S., Nasar, A., Divani, A.A., Kirmani J.F. (2007:) Regular egg consumption does not increase the risk of stroke and cardiovascular diseases. *Medical Science Monitor*, 13(1), 1-8.

133. Rajasekaran, A., Kalaivani, M. (2013): Designer foods and their benefits: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 1-16.
134. Rao, A.V., Rao, L.G. (2007): Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55, 207-216.
135. Reboul, E. (2013): Absorption of Vitamin A and Carotenoids by the Enterocyte: Focus on Transport Proteins. *Nutrients*, 5, 3563-3581.
136. Reboul, E., Abou, L., Mikail, C., Ghiringhelli, O., André, M., Portugal, H., Jourdeuil-Rahmani, D., Amiot, M.J., Lairon, D., Borel, P. (2005): Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochemical Journal*, 387(2), 455-461.
137. Renzi, L.M., Iannacocone, A., Johnson, E., Kritchevsky, S. (2008): The relation between serum xanthophylls, fatty acids, macular pigment and cognitive function in the Health ABC Study. *The FASEB Journal*, 22 (1_MeetingAbstracts), 877-5.
138. Richelle, M., Enslin, M., Hager, C., Groux, M., Tavazzi, I., Godin, J.P., Berger, A., Métairon, S., Quaile, S., Piguët-Welsch, C., (2004): Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 171-177.
139. Roberts, J.E., Wielgus, A.R., Boyes, W.K., Andley, U., Chignell, C.F. (2008): Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human lens epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 228, 49-58.
140. Rock, C.L. (1997): Carotenoids: Biology and Treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 75(3), 185-197.
141. Rock, C.L., Flatt, S.W., Wright, F.A., Faerher, S., Newman, V., Kealey, S., Pierce, J.P. (1997): Responsiveness of serum carotenoids to a high-vegetable diet intervention designed to prevent breast cancer recurrence. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 6(8), 617-23.
142. Rock, C.L., Lovalvo, J.L., Emenhiser, C., Ruffin, M.T., Flatt, S.W., Schwartz, S.J. (1998): Bioavailability of beta-carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *The Journal of Nutrition*, 128, 913-916.
143. Rock, C.L., Swendseid, M.E. (1992): Plasma β -carotene response in humans after meals supplemented with dietary pectin. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55, 96-99.
144. Roodenburg, A.J., Leenen, R., van Het Hof, K.H., Weststrate, J.A., Tijburg, L.B. (2000): Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1187-1193.
145. Samli, H.E., Ağa, A., Senkoğlu, N. (2005): Effects of Storage Time and Temperature on Egg Quality in Old Laying Hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 14, 548-553.
146. Sari, M., Aksit, M., Özdoğan, M., Basmacıoğlu, H. (2001): Effects of addition of flaxseed of laying hens on some production characteristics, levels of yolk and serum cholesterol, and fatty acid composition of yolk. *Archiv für Geflügelkunde*, 66, 75-79.
147. Scott, C.E., Eldridge, A.L. (2005): Comparison of carotenoid contents in fresh, frozen and canned corn. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 551-559.

148. Seddon, J.M., Ajani, U.A., Sperduto, R.D., Hiller, R., Blair, N., Burton, T.C., Farber, M.D., Gragoudas, E.S., Haller, J. (1994): Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *The Journal of the American Medical Association*, 272, 1413-1420.
149. Sies, H., Stahl, W. (1995): Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1315-1321.
150. Silversides, F.G., Scott, T.A. (2001): Effect of Storage and Layer Age on Quality of Eggs From Two Lines of Hens. *Poultry Science*, 80, 1240-1245.
151. Sindhu, E.R., Preethi, K.C., Kuttan, R. (2010): Antioxidant activity of carotenoid lutein in vitro and in vivo. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(8), 843-848.
152. Sirri, F., Iaffaldano, N., Minelli, G., Meluzzi, A., Rosato, M.P., Franchini, A. (2007): Comparative Pigmentation Efficiency of High Dietary Levels of Apo-Ester and Marigold Extract on Quality Traits of Whole Liquid Egg of Two Strains of Laying Hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 16, 429-437.
153. Sklan, D., Shachaf, B., Baron, J., Hurwitz, S. (1978): Retrograde movement of digesta in the duodenum of the chick: extent, frequency, and nutritional implications. *The Journal of Nutrition*, 108, 1485-1490.
154. Sommerburg, O., Keunen, J.E., Bird, A.C., van Kuijk, F.J. (1998): Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. *British Journal of Ophthalmology*, 82(8), 907-10.
155. Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., Sies, H., Tronnier, H. (2000): Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 795-798.
156. Stahl, W., Heinrich, U., Wiseman S., Eichler, O., Sies, H., Tronnier, H. (2001): Dietary tomato paste protects against ultraviolet light-induced erythema in humans. *The Journal of Nutrition*, 131, 1449-1451.
157. Stahl, W., Sies, H. (1996): Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336, 1-9.
158. Stahl, W., Sies, H. (2002): Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 15, 291-296.
159. Stahl, W., Sies, H. (2003): Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351.
160. Statistica for Windows v.12.0., StatSoft Inc, 2014.
161. Statistička izvješća 1509/2014., Poljoprivredna proizvodnja u 2013, ISSN 1333-3518 http://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2014/SI-1509.pdf
162. Strand, A., Herstad, O., Liaaen-Jensen, S. (1998): Fucoxanthin metabolites in egg yolks of laying hens. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119, 963-974.
163. Surai, P., Ionov, I., Kuchmistova, E., Noble, R.C., Speake, B.K. (1998b): The relationship between the levels of a-tocopherol and carotenoids in the maternal feed, yolk and neonatal tissues: Comparison between the chicken, turkey, duck and goose. *Journal of Science in Food and Agriculture*, 76, 593-598.

164. Surai, P.F., Ionov, I.A., Kuklenko, T.V., Kostjuk, I.A., MacPherson, A., Speake, B.K., Noble, R.C., Sparks, N.H.C. (1998a): 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. *British Poultry Science*, 39, 257-263.
165. Surai, P.F., MacPherson, A., Speake, B.K., Sparks, N.H.C. (2000): Designer egg evaluation in a controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54, 298-305.
166. Surai, P.F., Sparks, N.H.C. (2001a): Comparative evaluation of the effect of two maternal diets on fatty acids, vitamin E and carotenoids in the chick embryo. *British Poultry Science*, 42(2), 252-259.
167. Surai, P.F., Sparks, N.H.C. (2001b): Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 7-16.
168. Surai, P.F., Speake B.K., Sparks, N.H.C. (2001): Carotenoids in Avian Nutrition and Embryonic Development. 1. Absorption, Availability and Levels in Plasma and Egg Yolk. *The Journal of Poultry Science*, 38, 1-27.
169. Surai, P.F., Speake, B.K. (1998): Distribution of carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 9, 645-651.
170. Škrbić, Z., Pavlovski, Z., Lukić, M., Vitorović, D., Petričević, V., Stojanović, Lj. (2011): Changes of egg quality properties with the age of layer hens in traditional and conventional production. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27(3), 659-667.
171. Škrtić, Z., Kralik, G., Gajčević, Z., Bogut, I., Hanžek, D. (2007): The increase of the n-3 PUFA content in eggs. *Poljoprivreda*, 13(2), 47-52.
172. Škrtić, Z., Kralik, G., Gajčević, Z., Hanžek, D., Bogut, I. (2008): Effect of different source of oils on fatty acid profile and organoleptic traits of eggs. *Acta agriculturae Slovenica*, supplement 2, 129-134.
173. Tabidi, M.H. (2011): Impact of Storage Period and Quality on Composition of Table Egg. *Advances in Environmental Biology*, 5(5), 856-861.
174. Tyczkowski, J.K., Hamilton, P.B. (1986): Absorption, transport, and deposition in chickens of lutein diester, a carotenoid extracted from marigold (*Tagetes erecta*) petals. *Poultry Science*, 65(8), 1526-1531.
175. Upisnik farmi kokoši nesilica, <http://mps.hr/default.aspx?id=6976>
176. USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 26; <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/112>; pristupljeno 12.11.2014.
177. USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 26; <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/118>; pristupljeno 12.11.2014.
178. Van Bennekum, A., Werder, M., Thuahnai, S.T., Han, C.H., Duong, P., Williams, D.L., Wettstein, P., Schulthess, G., Phillips, M.C. (2005): Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochemistry*, 44, 4517-4525.
179. Van Elswyk, M.E. (1997): Comparison of n-3 fatty acid sources in laying hen rations for improvement of whole egg nutritional quality: a review. *British Journal of Nutrition*, 78(1), 61-69.
180. Vishwanathan, R., Kuchan, M.J., Sen, S., Johnson, E.J. (2014): Lutein and Preterm Infants With Decreased Concentrations of Brain Carotenoids. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 59, 659-665.

181. Walsh, T.J., Rizk, R.E., Brake, J. (1995): Effects of temperature and carbon dioxide on albumen characteristics, weight loss, and early embryonic mortality of long stored hatching eggs. *Poultry Science*, 74(9), 1403-1410.
182. Wang, M.X., Jiao, J.H., Li, Z.Y., Liu, R.R., Shi, Q., Ma, L. (2013): Lutein supplementation reduces plasma lipid peroxidation and C-reactive protein in healthy nonsmokers. *Atherosclerosis*, 227, 380-385.
183. Wang, W., Connor, S.L., Johnson, E.J., Klein, M.L., Hughes, S., Connor, W.E. (2007): Effect of dietary lutein and zeaxanthin on plasma carotenoids and their transport in lipoproteins in age-related macular degeneration. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(3), 762-769.
184. Williams, A.W., Boileau, T.W.M., Erdman Jr., J.W. (1998): Factors influencing the uptake and absorption of carotenoids. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 218, 106-108.
185. Woodall, A.A., Britton, G., Jackson, M.J. (1997): Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336, 575-586.
186. Wu, L., Huang, X., Shi, K., Tan, R. (2009): Bioavailability comparison of free and esterified lutein for layer hens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 11(2), 95-98.
187. Yanar, Y., Büyükçapar, H., Yanar, M., Göcer, M. (2007): Effect of carotenoids from red pepper and marigold flower on pigmentation, sensory properties and fatty acid composition of rainbow trout. *Food Chemistry*, 100, 326-330.
188. Yeum, K.J., Russell, R.M. (2002): Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual Review of Nutrition*, 22, 483-504.
189. Yonekura, L., Nagao, A. (2007): Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 107-115.
190. Yonekura, L., Nagao, A. (2009): Soluble fibers inhibit carotenoid micellization *in vitro* and uptake by Caco-2 cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73, 196-199.
191. Young, A.J., Lowe, G.M. (2001): Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385, 20-27.
192. Zazpe, I., Beunza, J.J., Bes-Rastrollo, M., Warnberg, J., de la Fuente-Arillaga, C., Benito, S., Vazquez, Z., Martinez-Gonzalez, M.A. (2011): Egg consumption and risk of cardiovascular disease in the SUN Project. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65(6), 676-682.
193. Zou, Z., Xu, X., Huang, Y., Xiao, X., Ma, L., Sun, T., Dong, P., Wang, X., Lin, X. (2011): High serum level of lutein may be protective against early atherosclerosis: The Beijing atherosclerosis study. *Atherosclerosis* 219, 789-793.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj luteina dodanog u hranu nesilica na sadržaj luteina u žumanjku standardnih jaja i jaja obogaćenih omega-3 masnim kiselinama kao i njegovo djelovanje na pokazatelje kvalitete jaja, profil masnih kiselina i oksidaciju lipida u žumanjcima te biokemijske pokazatelje u krvi nesilica. Istraživanje je provedeno u istom terminu u dva usporedna pokusa (tretmani K i O) na ukupno 600 kokoši nesilica Tetra SL hibrida koje su bile u 31. tjednu starosti, a trajalo je 5 tjedana. Svaki tretman obuhvaćao je po 300 nesilica podijeljenih u kontrolnu i dvije pokusne skupine. U tretmanu K nesilice su hranjene standardnom smjesom, a u tretmanu O smjesom koja sadrži 5% mješavine ulja s povećanim udjelom omega-3 masnih kiselina. Pokusne skupine unutar tretmana razlikovale su se po razinama luteina dodanog u smjesu na sljedeći način: bez dodatka luteina (K_0 i O_0), dodano 200 mg/kg luteina (K_{200} i O_{200}) i dodano 400 mg/kg luteina (K_{400} i O_{400}). Rezultati istraživanja pokazali su značajno ($P < 0,001$) obogaćivanje jaja luteinom u oba tretmana. Sadržaj luteina u jajima porastao je prosječno 7,65 puta u tretmanu K te 5,39 puta u tretmanu O. U tretmanu K zabilježen je značajan ($P = 0,028$) utjecaj luteina na povećanje mase jaja K_{200} skupine te značajno ($P = 0,001$) deblja ljuska jaja u K_{400} skupini. Lutein je značajno ($P < 0,001$) utjecao na smanjenje pH vrijednosti svježeg žumanjka K_{200} skupine i povećanje pH vrijednosti svježih bjelanjaka O_{200} i O_{400} skupina. Utvrđen je značajan utjecaj ($P < 0,001$) luteina na porast vrijednosti boje žumanjka u oba tretmana. Primjećuje se značajan utjecaj ($P < 0,001$) luteina na smanjenje CIE L^* i povećanje CIE a^* i CIE b^* vrijednosti boje žumanjka u tretmanu K, dok je u tretmanu O lutein značajno utjecao ($P < 0,001$) samo na povećanje CIE a^* vrijednosti žumanjka. Dodatak luteina uzrokovao je značajan porast sadržaja ukupnih MUFA ($P = 0,007$) te smanjenje ukupnih n-6 PUFA ($P = 0,002$) i n-3 PUFA ($P = 0,021$) u K_{200} skupini, dok je u tretmanu O lutein značajno povećao ($P = 0,017$) sadržaj n-3 PUFA i značajno ($P = 0,025$) smanjio omjer n-6/n-3 PUFA. Lutein nije utjecao ($P > 0,05$) na vrijednosti TBARS-a u žumanjcima jaja i biokemijskih pokazatelja u krvi nesilica u oba tretmana.

Ključne riječi: lutein, omega-3 masne kiseline, kvaliteta jaja, boja žumanjka, profil masnih kiselina, oksidacija lipida

9. SUMMARY

ENRICHMENT OF TABLE EGGS WITH LUTEIN

The aim of this study was to examine the impact of lutein added to the feed of laying hens on the content of lutein in yolk of standard eggs and eggs enriched with omega-3 fatty acids, as well as its effect on the eggs' quality indicators, fatty acid profile, lipid oxidation in yolks and biochemical parameters of hens' blood. The research was conducted in two parallel experiments (treatments K and O) on a total of 600 laying hens of Tetra SL hybrid that were 31 weeks old, and lasted for five weeks. Each treatment comprised of 300 hens divided into a control and two experimental groups. In the treatment K hens were fed with standard mixture, and in the treatment O with a mixture containing 5% oil mixture with increased content of omega-3 fatty acids. Experimental groups within the treatment differed depending on the levels of lutein added to the mixture in the following way: without the addition of lutein (K₀ and O₀), added 200 mg/kg lutein (K₂₀₀ and O₂₀₀) and added 400 mg/kg lutein (K₄₀₀ and O₄₀₀). The results of the study showed a significant ($P<0.001$) enrichment of eggs with lutein in both treatments. The content of lutein in eggs increased by an average of 7.65 fold in the treatment K and 5.39 fold in treatment O. In K treatment there was a significant effect of lutein ($P=0.028$) on increasing the egg weight in K₂₀₀ group and significantly ($P=0.001$) thicker egg shell in K₄₀₀ group. Lutein has significantly ($P<0.001$) influenced the decrease of pH values of fresh egg yolks in K₂₀₀ group and increase of pH values of fresh egg whites in O₂₀₀ and O₄₀₀ groups. A significant influence ($P<0.001$) of lutein on increase of egg yolk color values was determined in both treatments. There has been a significant effect ($P<0.001$) of lutein on decrease of CIE L* and increase of CIE a* and CIE b* values of yolk color in the treatment K, while in the treatment O lutein significantly affected ($P<0.001$) only the increase of CIE a* value of yolk color. Addition of lutein caused a significant increase in the content of total MUFA ($P=0.007$) and a decrease of total n-6 PUFA ($P=0.002$) and n-3 PUFA ($P=0.021$) in K₂₀₀ group, while in the O treatment lutein significantly increased ($P=0.017$) the content of n-3 PUFA and significantly reduced ($P=0.025$) the ratio of n-6/n-3 PUFA. Lutein did not affect ($P>0.05$) the TBARS values of egg yolks and biochemical parameters of hens blood in both treatments.

Keywords: lutein, omega-3 fatty acids, egg quality, yolk color, fatty acid profile, lipid oxidation

ŽIVOTOPIS

Manuela Grčević rođena je 15. travnja 1982. godine u Osijeku. Diplomirala je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku 2008. godine te stekla zvanje dipl. inž. prehrambene tehnologije i procesnog inženjerstva, smjer prehrambeni. Na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku zapošljava se 2008. godine kao stručna suradnica na Katedri za opću i specijalnu zootehniku Zavoda za specijalnu zootehniku. Poslijediplomski doktorski studij „Poljoprivredne znanosti“ smjer „Stočarstvo“ na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku upisala je 2009. godine. Do sada je bila suradnica na projektima Hrvatskog instituta za tehnologiju d.o.o. (Karnozin – funkcionalni sastojak mesa peradi, voditeljica: prof. dr. sc. dr. h. c. Gordana Kralik), Poslovne inovacijske agencije Republike Hrvatske (BICRO) (Obogaćivanje jaja funkcionalnim sastojcima, voditeljica: prof. dr. sc. dr. h. c. Gordana Kralik), Ministarstva poljoprivrede (Primjena molekularne genetike u poboljšanju uzgoja crne slavonske svinje, voditelj: doc. dr. sc. Vladimir Margeta) i Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku (Inovativnom tehnologijom do proizvodnje jaja s dodanom vrijednošću, voditeljica: doc. dr. sc. Zlata Kralik). Sudjelovala je na više međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova te do sada u koautorstvu objavila 20 znanstvenih radova (1 A1, 8 A2, 9 A3) te 2 stručna rada.