

PROIZVODNI POKAZATELJI I KVALITETA JAJA KOKOŠI NESILICA HRANJENIH
DIZAJNIRANIM OMEGA-3 KRMNIM SMJESAMAPRODUCTION INDICATORS AND THE QUALITY OF EGGS OF LAYER HENS FED
WITH THE OMEGA-3-DESIGNED FEED MIXTURES

Zlata Kralik, Gordana Kralik, Manuela Košević, Ana Radanović

Izvorni znanstveni članak - Original scientific paper
Primljeno - Received: 1. veljače - February 2024
Revidirano - Revised: 22. veljače - February 2024
Prihvaćeno - Accepted: 4. ožujak - March 2024
<https://doi.org/10.33128/k.66.1.1>
UDK 636.52/58.085.8
637.411

SAŽETAK

Jaje je nutritivno visokovrijedna namirnica koja se može obogatiti različitim funkcionalnim sastojcima. Cilj rada bio je proizvesti jaja obogaćena omega-3 masnim kiselinama, usporediti proizvodne pokazatelje te utvrditi utjecaj vremena čuvanja jaja na pokazatelje unutarnje kvalitete jaja i oksidaciju masti u konvencionalnim i obogaćenim jajima. U istraživanju je upotrijebljeno 480 kokoši nesilica hibrida TETRA SL. Nesilice su podijeljene u tri pokusne skupine, kontrolna i dvije pokusne (K, P1 i P2). Svaka skupina imala je 160 nesilica podijeljenih u 16 ponavljanja, s 10 nesilica u svakom. Kontrolna skupina nesilica dobivala je hranu s 5 % sojina ulja. Skupina nesilica P1 konzumirala je hranu u kojoj je kombinirano riblje (1,5 %) i laneno ulje (3,5 %), a skupina nesilica P2 dobivala je hranu s 2 % ribljega i 3 % lanena ulja. Nesilice su dizajniranim smjesama hranjene četiri tjedna, a hranu i vodu dobivale su *ad libitum*. Krmne smjese bile su izbalansirane na 17,0 % sirovih proteina i 12,1 MJ/kg metaboličke energije. Dodatak kombinacije ulja u krmne smjese za nesilice značajno ($P < 0,001$) je smanjio omjer $\Sigma n-6/\Sigma n-3$ polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) u pokusnim smjesama u odnosu na kontrolnu. Sukladno omjeru PUFA-e u krmnim smjesama kretao se i omjer u jajima ($K=10,36$; $P1=1,88$ i $P2=1,98$; $P < 0,001$). Korišteni hranidbeni tretmani nisu imali utjecaja na završne mase nesilica ($P > 0,05$). Proizvodni pokazatelji (broj jaja po nesilici, masa jaja, intenzitet nesivosti i konzumacija hrane) bili su ujednačeni u svim ispitivanim skupinama. Značajan utjecaj ($P < 0,001$) na sve pokazatelje kvalitete jaja (visina bjelanjka, boja žumanjka, Houghove jedinice/HJ, pH bjelanjka i žumanjka) imalo je vrijeme čuvanja jaja. Hranidbeni tretman značajno je utjecao na pH bjelanjka ($P < 0,001$), dok je interakcija hranidbenoga tretmana i vremena čuvanja utjecala na vrijednosti boje žumanjka i pH vrijednosti bjelanjka i žumanjka ($P < 0,05$). U vrijednostima oksidacije lipida TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) u žumanjcima jaja nisu ustanovljenje značajne razlike između skupina svježih niti hlađenih jaja ($P > 0,05$). Rezultati prikazanih analiza ukazuju da konzumacija krmnih smjesa korištenih u ovome pokusu uspješno povećava sadržaj omega-3 PUFA u jajima, a ne narušava proizvodne pokazatelje i kvalitetu jaja. Rezultati također ukazuju da je važno voditi računa o vremenu i načinu čuvanja jaja, jer vrijeme čuvanja ima značajan utjecaj na promjene u vrijednostima pokazatelja kvalitete jaja.

Ključne riječi: omega-3 jaja, vrijeme čuvanja, kvaliteta jaja, TBARS

Prof. dr. sc. Zlata Kralik, e-mail: zlata.kralik@fazos.hr, orcid.org/0000-0001-9056-9564; Doc. dr. sc. Manuela Košević, e-mail: manuela.kosevic@fazos.hr, orcid.org/0000-0002-5760-621X; dr. sc. Ana Radanović, e-mail: azelicos@gmail.com, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Hrvatska, Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, 31000 Osijek, Hrvatska; Prof. dr. sc. dr. h. c. Gordana Kralik, profesor emeritus, e-mail: gkralik@fazos.hr, orcid.org/0000-0003-1603-3440, Znanstveni centar izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, 31000 Osijek, Hrvatska, Nutricin j. d. o. o., Đ. Đakovića 6, 31326 Darda, Hrvatska

UVOD

Jaja se smatraju visokovrijednom prehrambenom namirnicom jer u svojem sastavu sadrže esencijalne aminokiseline i masne kiseline te vitamine i mikroelemente. Jaja se mogu obogatiti funkcionalnim sastojcima – nutricinima – ako se nesilice hrane posebno dizajniranim smjesama u koje se dodaju funkcionalni sastojci kao što su n-3 polinezasićene masne kiseline, selen, cink, vitamin E, vitamin C, lutein i drugi. Jaja proizvedena uporabom dizajniranih smjesa u hranidbi nesilica smatraju se funkcionalnom namirnicom. U prehranbenome sektoru funkcionalnom se hranom smatra ona namirnica koja uz osnovno prehrambeno djelovanje dodatno utječe na jednu ili više funkcija u organizmu konzumenta te poboljšava opće stanje organizma i/ili smanjuje rizik od određenih bolesti (Kralik i sur., 2010.). Jaja obogaćena omega-3 polinezasićenim masnim kiselinama (n-3 PUFA) udovoljavaju gore navedenoj definiciji funkcionalne hrane. Analizom kemijskoga sastava jaja primjetno je da lipidi, kao jedna od glavnih komponenata žumanjka jaja, predstavljaju esencijalne nutrijente važne za rast i razvoj peradi. Oni imaju važnu ulogu u ostvarenju proizvodnih osobina nesilica i kvaliteti proizvedenih jaja. Općenito se masti u krmne smjese za nesilica dodaju u količini manjoj od 10 %. Tijekom razdoblja nesenja, količina mobilizacije i sinteze lipida u kokoši nesilica je u dinamičkoj ravnoteži, neovisno o tome unose li se egzogeno iz hrane ili endogeno, sintezom u jetri. Da bi se formiralo jedno jaje potrebno je 5-6 g lipida, pri čemu količina koju nesilice dobivaju iz hrane iznosi približno 3 g dnevno (Gao i sur., 2021.). S ciljem osiguranja adekvatnoga unosa masnih kiselina nužnih za proizvodnju visokokvalitetnih jaja i ostvarenje dobrih proizvodnih rezultata, u obroke nesilica dodaju se različite vrste ulja (laneno, repičino i riblje). Utjecaj dodatka ribljega, repičina i lanena ulja ili lanenoga sjemena u hranu za nesilice s ciljem povećanja sadržaja omega-3 PUFA u jajima nije značajno utjecalo (Ebeid, 2011.) na proizvodne pokazatelje u nekim istraživanjima, dok je u nekim istraživanjima utvrđeno značajno smanjenje broja proizvedenih jaja, a povećana je i konzumacija i konverzije hrane (Jia i sur. 2008.). Irawan i sur. (2022.) upozoravaju da povećanje α -linolenske masne kiseline (ALA) ili n-3 PUFA u hrani nesilica s ciljem obogaćivanja jaja omega-3 PUFA može imati štetno djelovanje na performanse nesilica, te je po-

trebno utvrditi limit uporabe. Međutim, ima istraživanja koja su potvrdila pozitivan značajan utjecaj dodatka repičina, lanena i ribljega ulja u krmne smjese na proizvodne pokazatelje nesilica. Grobas i sur. (2001.) ustanovili su da nesilice hranjene lanenim uljem nesu teža jaja, s boljom konverzijom hrane od kontrolne skupine. Kralik i sur. (2008.) kombinirali su riblje i repičino ulje u hranidbi nesilica. Nesilice skupine E1 dobivale su u hrani 3,5 % ribljega ulja + 1,5 % repičina ulja, a E2 skupina nesilica hranjena je 1,5 % ribljim + 3,5 % repičinim uljem. Na kraju eksperimenta od 28 dana pokusne su skupine nesilica bile teže ($P < 0,005$) od kontrolne skupine nesilica. Elsayed i ElAffi (2020.) utvrdili su da dodatak 3 % lanena ulja povećava proizvodnju jaja, težinu jaja, poboljšava iskorištenje hrane, ali smanjuje tjelesnu masu nesilica tijekom eksperimenta od 12 tjedana. Lipidi u žumanjku jajeta uglavnom potječu iz ulja u hrani, pa stoga ulja koja se koriste u dizajniranju smjesa za nesilice igraju ključnu ulogu u proizvodnim performansama i kvaliteti jaja kokoši nesilica. Stoga je važno voditi računa o količini ulja koja se dodaje u smjese za nesilice.

Cilj ovoga istraživanja bio je usporediti proizvodne pokazatelje te utvrditi utjecaj vremena čuvanja jaja na pokazatelje unutarnje kvalitete jaja i vrijednosti oksidacije masti u jajima kontrolne skupine nesilica i skupine nesilica hranjenih omega-3 dizajniranim smjesama.

MATERIJAL I METODE

Smještaj i hranidba nesilica

Istraživanje je provedeno na ukupno 480 nesilica Tetra SL hibrida. Nesilice su podijeljene u tri pokusne skupine (kontrola K i pokusne P1 i P2). Nesilice kontrolne skupine konzumirale su hranu s 5 % sojina ulja, skupina nesilica P1 konzumirala je hranu s kombinacijom 1,5 % ribljeg ulja i 3,5 % lanena ulja, a skupina nesilica P2 dobivala je hranu s 2 % ribljega i 3 % lanena ulja. Postupci s nesilicama u pokusu, kao i analize jaja, provedeni su prema protokolima odobrenim od Bioetičkoga povjerenstva za istraživanja na životinjama Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Svaka skupina u istraživanju sadržavala je po 160 nesilica podijeljenih u 16 ponavljanja. Pokusno razdoblje trajalo je 30 dana. Prva 2 dana bilo je razdoblje prilagodbe nesilice (navikavanje jata na uvjete držanja), a pokusno raz-

doblje hranidbe nesilica trajalo je 28 dana. Nakon 21. dana hranidbe uzorkovana su jaja za analizu kvalitete i profil masnih kiselina. Preostalih 7 dana skupljana su jaja za potrebe ispitivanja s volonterima. Nesilice su hranu i vodu konzumirale *ad libitum*. Sastav krmnih smjesa prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav krmnih smjesa za hranidbu kokoši nesilica (%)

Table 1 Composition of feeding mixtures for the feeding of laying hens (%)

Sastojak / Ingredient	K	P1	P2
Kukuruz / Corn	48,86	48,86	48,86
Sojina sačma Soybean cake	20,67	20,67	20,67
Tostirana soja Roasted soybean	4,00	4,00	4,00
Suncokretova sačma Sunflower cake	5,00	5,00	5,00
Lucerka / Alfalfa	1,50	1,50	1,50
Kalcijeva zrnca Calcium granules	10,67	10,67	10,67
Monokalcijev fosfat Monocalcium phosphate	1,33	1,33	1,33
Kvasac / Yeast	0,50	0,50	0,50
Sol / Salt	0,33	0,33	0,33
Zakiseljivač / Acidifier	0,33	0,33	0,33
Nanofeed / Nanofeed	0,33	0,33	0,33
Metionin / Methionine	0,15	0,15	0,15
*Premix / Premix	1,33	1,33	1,33
Sojino ulje / Soybean oil	5,00	-	-
Riblje ulje / Fish oil	-	1,50	2,00
Laneno ulje / Linseed oil	-	3,50	3,00
Ukupno / Total	100,00	100,00	100,00

K=5 % sojina ulja; P1=1,5 % ribljega ulja + 3,5 % lanena ulja, P2 = 2 % ribljega + 3 % lanena ulja.

* Jedan kg premixa sadrži: vit. A 840.000 IJ ; vit. D3 210.000 IJ ; vit. E 8.350 mg; vit. K3 168 mg; vit. B1 150 mg; vit. B2 374 mg; vit. B6 200 mg; vit. B12 918 mg; vit. C 1.860 mg; niacin 2.100 mg; pantotenska kiselina 584 mg; folna kiselina 75 mg; biotin 7 mg; kolin klorid 33.600 mg; željezo 2.520 mg; jod 76 mg; bakar 425 mg; mangan 5.640 mg; cink 175 mg; selen 32 mg; canthaxanthin 260 mg.

K = 5% soybean oil, P1 = 1.5% fish oil + 3.5% linseed oil, P2 = 2% fish oil + 3% linseed oil.

*One kg of premix contains: vit. A 840.000 IJ; vit. D3 210.000 IJ; vit. E 8.350 mg; vit. K3 168 mg; vit. B1 150 mg; vit. B2 374 mg; vit. B6 200 mg; vit. B12 918 mg; vit. C 1.860 mg; niacin 2.100 mg; pantothenic acid 584 mg; folic acid 75 mg; biotin 7 mg; choline chloride 33.600 mg; iron 2.520 mg; iodine 76 mg; copper 425 mg; manganese 5.640 mg; zinc 175 mg; selenium 32 mg; canthaxanthin 260 mg.

Navedene smjese za nesilice bile su izbalansirane na bazi 17,0 % sirovoga proteina i 12,1 MJ/kg ME. Kemijski sastav korištenih smjesa prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Kemijski sastav smjesa korištenih u pokusu (%)

Table 2 Chemical composition of feed mixtures used in the experiment (%)

Pokazatelj / Indicator	K	P1	P2
Vlaga / Moisture	9,8	9,5	9,7
Sirovi protein Crude protein	17,23	17,31	17,07
Sirova mast Crude fat	7,7	7,7	7,7
Sirova vlaknina Crude fiber	4,9	4,7	4,8
Sirovi pepeo Raw ash	11,88	11,67	11,18

K=5 % sojina ulja; P1=1,5 % ribljega ulja + 3,5 % lanena ulja, P2 = 2 % ribljega + 3 % lanena ulja.

Vlaga – HRN ISO 6496:2001; sirovi protein – ISO 1871:2009; sirova mast – HRN ISO 6492:2001, sirova vlaknina – RU-013-06; mod. HRN EN ISO 6865:2001.; sirovi pepeo – HRN ISO 5984:2004/Ispr. 1:2016.

K = 5% soybean oil, P1 = 1.5% fish oil + 3.5% linseed oil, P2 = 2% fish oil + 3% linseed oil.

Moisture – HRN ISO 6496:2001; Crude protein – ISO 1871:2009; Crude fat – HRN ISO 6492:2001, Crude fiber – RU-013-06; Mod. HRN EN ISO 6865:2001.; Raw ash – HRN ISO 5984:2004/Corr. 1:2016.

Kokoši nesilice bile su smještene u kavezima, a po jednoj nesilici bilo je osigurano 750 cm² površine kaveza, od čega je 600 cm² bilo korisne površine. Kavezi s nesilicama bili su smješteni u istome peradnjaku, u kojem su vladali isti mikroklimatski uvjeti. Režim osvjetljenja bio je 16 sati svjetla i 8 sati mraka.

Analiza unutarnje kvalitete jaja

Analiza unutarnje kvalitete obavljena je na 270 jaja (90 po skupini). Sve analize provedene su na svježim jajima te jajima čuvanima 14 i 28 dana u hladnjaku na +4 °C. Kvaliteta jaja određena je mjerenjem sljedećih pokazatelja: masa jaja, visina bjelanjka, Houghove jedinice (HJ), boja žumanjka, pH bjelanjka i pH žumanjka. Automatskim uređajem Egg Multi-Tester EMT-5200 (Robotmation Co., Ltd., Tokyo, Japan) izmjerena je masa jaja (g), visina bjelanjka (mm), HJ i boja žumanjka, a vrijednosti pH bjelanjka i žumanjka izmjerene su pH metrom MP 120 (Mettler Toledo, model SevenEasy).

Analiza profila masnih kiselina u krmnim smjesama za nesilice i u žumanjcima jaja

Za analizu je uzorkovano 30 jaja i 3 uzorka smjese za nesilice. Profil masnih kiselina analiziran je na 30 žumanjaka, 10 po skupini. Uzorci smjese analizirani su u tri paralelna uzorka. Standardna metoda pripreme uzoraka za određivanje profila masnih kiselina podrazumijeva ekstrakciju masti iz uzorka te hidrolizu i esterifikaciju masnih kiselina. Masne kiseline određene su prema metodi Csapó i sur. (1986.). Profil masnih kiselina utvrđen je korištenjem plinskoga kromatografa SCION 436-GC (SCION Instruments), opremljenoga kapilarnom kolonom tipa FAMEWAX, RESTEK, Bellefonte, SAD, (unutarnji promjer 30 x 0,32 mm, film 0,25 μm) i plamenim detektorom. Volumen uzorka za injektiranje bio je 1 μL , a radni uvjeti sljedeći: temperatura injektora: 230 °C, temperatura detektora 230 °C te protok plina nosioca (vodik) 2,5 mL/min. Temperaturni program pećnice programiran je na sljedeći način: od 50 do 160 °C: 20 °C/min., od 160 do 225 °C: 10 °C/min., uz zadržavanje na 225 °C 9 minuta. Ukupno trajanje analize je 21 minuta. Za identifikaciju pojedinačnih masnih kiselina u kromatogramu korištena je standardna smjesa 37 masnih kiselina (Food Industry FAME Mix, Restek Corporation, Bellefonte, PA, SAD). Udjeli pojedinačnih masnih kiselina prikazani su kao postotak ukupnih masnih kiselina u lipidima žumanjaka. Nakon očitavanja kromatograma izračunan je udio pojedinih masnih kiselina u ukupnim mastima žumanjka iz omjera površine relevantnoga pika prema ukupnoj površini pikova svih masnih kiselina.

Određivanje oksidacije lipida u žumanjcima

Za određivanje oksidacije lipida u žumanjcima jaja iz svake je skupine nasumično prikupljeno po 30 jaja (ukupno 90). Oksidacija lipida u žumanjku određena je na svježim jajima te jajima čuvanima 14 i 28 dana u hladnjaku na 4 °C (n=10 po skupini). Priprema uzorka za analizu oksidacije masti obavljena je na sljedeći način: 4 g žumanjka odvagano je u epruvetu i dodano je 12 ml desetpostotne trikloroetene kiseline, smjesa je homogenizirana i centrifugirana 15 minuta na 5500 x g na 4 °C. Nakon centrifugiranja otpipetirano je 2,5 ml supernatanta, kojemu je dodan 1 ml otopine tiobarbiturne kiseline (pH 2,5). Epruvete su zatvorene i uronjene u vodenu kupelj na 95 °C 30 minuta. Nakon hlađenja dodano je 1,5 ml destilirane vode

te je smjesa centrifugirana 15 minuta na 5500 x g na 4 °C. Sadržaj obojenoga produkta koji nastaje reakcijom produkata lipidne peroksidacije s tiobarbiturnom kiselinom izmjeren je spektrofotometrijski na 532 nm (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, SAD). Dobivene vrijednosti uspoređene su sa standardnom krivuljom priređenom s pomoću standarda malondialdehid tetrabutilamonijeve soli (Sigma-Aldrich, Švicarska), a iskazane u μg MDA/g žumanjka.

Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja obrađeni su s pomoću statističkoga programa TIBCO® Statistica™, version 13.5.0.17, ©1984-2018 TIBCO Software, Inc. (2018). U analizi je korištena GLM procedura i analiza varijance, a za utvrđivanje značajnih razlika na razini $P < 0,05$, $P < 0,01$ i $P < 0,001$ korišten je Fisherov LSD-test.

REZULTATI I RASPRAVA

U Tablici 3. prikazane su sume masnih kiselina u smjesama za nesilice prema hranidbenim tretmanima, kontrolne smjese (K) i pokusnih smjesa (P1 i P2) te sume masnih kiselina u žumanjcima jaja. Kontrolna smjesa sadržavala je 16,72 % SFA, 26,47 % MUFA, 51,84 % n-6 PUFA i 5,04 % n-3 PUFA. Omjer n-6/n-3 PUFA u K smjesi bio je 10,28:1. U kontrolnoj smjesi nisu detektirane EPA i DHA. Pokusne skupine P1 i P2 u smjesama za nesilice sadržale su 16,84 % i 17,33 % SFA, 25,89 % i 26,28 % MUFA te 23,40 % i 22,79 % n-6 PUFA. Sadržaj n-3 PUFA u pokusnim skupinama bio je ujednačen te je iznosio P1 33,89 %, odnosno 33,59 %. Omjer n-6/n-3 PUFA u smjesi P1 iznosio je 0,69:1, a u P2 0,68:1. Sadržaj EPA i DHA povećan je u P2 u odnosu na P1 smjesu od 1,86 % i 2,42 % na 3,53 % i 4,84 %. Utvrđene su značajne razlike ($P = 0,001$) između n-3 PUFA kao i omjera n-6/n-3 PUFA između kontrolne i pokusnih smjesa ($P = 0,001$). Rezultati analiza smjesa korištenih u pokusu suglasni su s navodima Yalcin i Unal (2010.) i Alagawany i sur. (2019.). Hranidba nesilica standardnim krmnim smjesama prema Grčević i sur. (2011.) i Khan i sur. (2017.) sadrži veći udio n-6 PUFA, a manji udio n-3 PUFA, što je bio slučaj i u našem istraživanju. Rezultati kemijskih analiza u žumanjcima jaja ukazuju da je korišten hranidbeni tretman imao statistički značajan utjecaj na sadržaj ΣSFA ,

Σ MUFA, Σ n-6 i Σ PUFA n-3 te na omjer PUFA n-6/n3 ($P < 0,05$). Rezultate sukladne našima u svojim istraživanjima prikazali su Ebeid (2011.), Kralik i sur. (2020) te Irawan i sur. (2022.). Jaja kokoši nesilica koje su hranjene standardnom krmnom smjesom sadrže viši udio Σ n-6 PUFA u odnosu na pokusne skupine, a manji udio Σ n-3 PUFA, utvrdili su također Khan i sur. (2017.), kao i Grčević i sur. (2011.). S navodima autora sukladni su naši rezultati.

U Tablici 4. prikazane su žive mase nesilica na početku i kraju istraživanja, a na Tablici 3. proizvodni pokazatelji tijekom pokusnoga razdoblja. Prosječne

žive mase nesilica na početku istraživanja u K, P1 i P2 skupinama iznosile su 2063,36 g; 2094,05 g i 2070,13 g. Nakon 28. dana tretmana masa nesilica istim redoslijedom iznosila je K 2066,11 g; P1 2099,91 g i 2076,16 g. Nisu utvrđene značajne razlike u živim masama između skupina nesilica na početku ($P = 0,069$) niti na kraju istraživanja ($P = 0,086$). Primjetno je bilo održavanje dobre tjelesne kondicije kod svih skupina nesilica. Našim rezultatima sukladni su rezultati Aguillón-Páez i sur. (2020.), koji pri uporabi lanena i suncokretova sjemena u krmnim smjesama za nesilice također

Tablica 3. Suma masnih kiselina u krmnim smjesama za nesilice (% ukupnih masnih kiselina) i sume masnih kiselina u žumanjcima (mg FA/100 g jestivoga dijela jaja)

Table 3 The sum of fatty acids in the feed mixtures for laying hens (% of total fatty acids) and the sum of fatty acids in yolks (mg FA/100 g edible part of egg)

Masne kiseline Fatty acid	K	P1	P2	P vrijednost P value
Suma masnih kiselina u krmnim smjesama (% od ukupnih masnih kiselina) Sum of fatty acids in feed mixtures (% of total fatty acids)				
Σ SFA	16,72±0,22 ^b	16,84±0,21 ^b	17,33±0,01 ^a	0,006
Σ MUFA	26,47±0,07 ^a	25,89±0,13 ^b	26,28±0,09 ^a	0,001
Σ n-6 PUFA	51,84±0,11 ^a	23,40±0,21 ^b	22,79±0,19 ^c	0,001
Σ n-3 PUFA	5,04±0,03 ^b	33,86±0,28 ^a	33,59±0,28 ^a	0,001
Σ n6/n3 PUFA	10,28±0,05 ^a	0,69±0,02 ^b	0,68±0,01 ^b	0,001
Suma masnih kiselina u žumanjcima (mg FA/100 g jestivoga dijela jaja) Sum of fatty acids in yolks (mg FA/100 g edible part of egg)				
Σ SFA	2080,14±79,76 ^b	2188,80±40,88 ^a	2158,64±51,65 ^{ab}	0,036
Σ MUFA	2634,49±72,23 ^b	2932,35±103,27 ^a	2958,31±95,32 ^a	0,001
Σ n-6 PUFA	1553,51±225,91 ^a	1127,71±52,27 ^b	1149,82±66,57 ^b	0,002
Σ n-3 PUFA	149,88±26,34 ^b	589,59±46,60 ^a	580,71±57,44 ^a	0,001
Σ n6/n3 PUFA	10,36 ^a	1,88 ^b	1,98 ^b	0,001

K=5 % sojina ulja; P1=1,5 % ribljege ulja + 3,5 % lanena ulja, P2 = 2 % ribljege + 3 % lanena ulja; =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; Prosječne vrijednosti u redovima označene slovima ^{a,b,c} su statistički značajno različite na razini $P < 0,05$; $P < 0,01$ i $P < 0,001$.

K = 5% soybean oil, P1 = 1.5% fish oil + 3.5% linseed oil, P2 = 2% fish oil + 3% linseed oil; = mean value; sd = standard deviation; Average values in rows marked with letters ^{a,b,c} are statistically significantly different at the $P < 0.05$ level; $P < 0.01$ and $P < 0.001$.

Tablica 4. Živa masa nesilica na početku i na kraju istraživanja ($\bar{x} \pm sd$; g)

Table 4 Live weight of laying hens at the beginning and at the end of research ($\bar{x} \pm sd$; g)

Masa nesilica Laying hen's weight	K (n=160)	P1 (n=158)	P2 (n=157)	P vrijednost P value
Početak istraživanja Start of research	2063,35±126,6	2094,05±127,6	2070,13±117,1	0,069
Kraj istraživanja End of research	2066,11±135,3	2099,91±134,0	2076,26±119,2	0,086

K=5 % sojina ulja; P1=1,5 % ribljege ulja + 3,5 % lanena ulja, P2=2 % ribljege + 3 % lanena ulja; \bar{x} =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; n.s. $P > 0,05$
K=5% soybean oil, P1=1.5% fish oil + 3.5% linseed oil, P2=2% fish oil + 3% linseed oil; \bar{x} = mean value; sd=standard deviation; n.s. $P > 0,05$.

nisu ustanovili razlike u početnim i završnim masama nesilica između tretmana. Međutim, Elsayed i AIAfif (2020.) utvrdili su da dodatak 3 % lanena ulja smanjuje tjelesnu masu nesilica u odnosu na kontrolnu skupinu tijekom eksperimenta od 12 tjedana.

S ciljem povećanja omega-3 masnih kiselina u jajima, Ayerza i Coates (2000.) dodavali su u krmne smjese za nesilice različite udjele chia sjemenaka (*Salvia hispanica* L.) te su utvrdili negativan utjecaj hranidbenih tretmana na prirast tjelesne mase kokoši nesilica tijekom pokusa, a njihovi rezultati nisu sukladni našima.

U Tablici 5. prikazani su proizvodni pokazatelji nesilica tijekom pokusnoga perioda. Nakon formiranja pokusnih skupina za vrijeme prilagodbe nesilica na skupinu i uvjete držanja koje je trajalo dva dana, u K skupini nije bilo uginuća, te se u skupini nalazilo 160 nesilica. U skupini P1 uginule su dvije nesilice, pa je skupina na početku hranidbenoga perioda imala 158 nesilica, dok su u P2 zabilježena tri uginuća, te je skupina imala 157 nesilica. Tijekom pokusnoga razdoblja hranidbe dizajniranim smjesama nije bilo uginuća. Ukupan broj jaja tijekom pokusnoga razdoblja u kontrolnoj skupini bio je 3176 komada, P1 skupini 3146 komada i P2 skupini 3116 komada. Intenzitet nesivosti u svim skupinama kretao se oko 94,5a%, a masa jaja oko 67 g. Konzumacija hrane po danu kretala se od 125,2 g (skupina K) do 127,3 g (skupina P2). Ebeid (2011.) je u istraživanju koristio smjese s ribljim i lanenim uljem i navodi da korišteni tretmani nisu imali utjecaja na proizvodnju jaja, konzumaciju hrane i masu jaja. Lee i sur. (2021.) također ističu da dodavanje lanena ulja u hranu nesilica ne utječe na konzumaciju hrane i proizvodnju jaja, što su potvrdila i istraživanja Neijat i sur. (2016.). Njihovi rezultati sukladni su našima.

U istraživanju Grobas i sur. (2001.) ustanovljeno je da kokoši nesilice hranjene krmnim smjesama s dodatkom lanena ulja nesu teža jaja i imaju bolju konverziju hrane od kontrolne skupine. Rezultati ovoga autora nisu sukladni našim rezultatima. U Tablici 6. prikazan je utjecaj hranidbenih tretmana (K, P1 i P2) i vremena čuvanja jaja (1, 14 i 28 dana) na pokazatelje unutarnje kvalitete jaja. Analizirani su visina bjelanjaka, boja žumanjka, HJ te pH vrijednosti bjelanjaka i žumanjaka. Visina bjelanjaka kod svježih jaja u K skupini bila je 6,20 mm, P1 skupini 6,25 mm i P2 5,84 mm, a nakon 28 dana hlađenja istim redoslijedom iznosila je 4,5 mm, 4,77 mm i

4,83 mm. Utvrđeno je da se boja žumanjaka mijenja tijekom čuvanja jaja, a jačega je intenziteta kod jaja porijeklom od nesilica P1 skupine u odnosu na K i P2 skupine. Kod svježih jaja P1 (73,90) skupine ustanovljena je najveća vrijednost HJ, a zatim slijedi skupina K (72,16) i skupina P2 (71,83). Smanjenje vrijednosti HJ tijekom čuvanja jaja u hladnjaku 14, odnosno 28 dana, posljedica je opadanja visine bjelanjaka, što se dovodi u vezu s procesima hidrolitičke razgradnje i difuzije nutrijenata u žumanjak, kao i s isparavanjem vode i CO₂ kroz pore ljuske. Kemijski procesi u bjelanjcima i žumanjcima mijenjaju pH vrijednosti. Tako se pH vrijednost bjelanjaka tijekom čuvanja jaja u hladnjaku povisuje kod K od 8,22 do 9,06, P1 skupine 8,04 do 9,04 i P2 skupine od 8,12 do 9,05. Istovremeno se povisuje i pH vrijednost žumanjaka kod K skupine od 5,99 do 6,19, P1 skupine od 6,03 do 6,18 i P2 skupine od 6,00 do 6,17. Statističkom obradom podataka utvrđen je utjecaj hranidbenih tretmana samo na pH vrijednost bjelanjaka (P=0,001).

Vrijeme čuvanja bilo je značajno za sve analizirane pokazatelje svježine jaja (P=0,001). Interakcija hranidbenih tretmana i vremena čuvanja jaja pokazali su se značajnima za boju žumanjaka (P=0,018) te pH vrijednosti bjelanjaka (P=0,001) i žumanjaka (P=0,013). U istraživanju utjecaja vremena čuvanja na kvalitetu konvencionalnih i omega-3 PUFA kokošjih jaja Kralik i sur. (2014.) navode da vrijeme čuvanja konvencionalno proizvedenih jaja značajno (P<0,05) utječe na povećanje pH bjelanjaka i žumanjka, dok su smanjene vrijednosti visine bjelanjaka, HJ i boje žumanjka. Naši rezultati sukladni su rezultatima navedenih autora, jer smo također utvrdili statistički značajan utjecaj vremena čuvanja jaja u hladnjaku na pokazatelje unutarnje kvalitete/svježine jaja. Ebeid (2011.) je u istraživanju koristio smjese s ribljim i lanenim uljem, a pritom navodi da korišteni tretmani nisu imali utjecaja na visinu bjelanjaka i Houghove jedinice, no imali su značajan pozitivan učinak na boju žumanjka. U Tablici 7. prikazani su rezultati oksidacije masnih kiselina u lipidima žumanjaka. TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) vrijednosti u K, P1 i P2 skupinama jaja povećavale su se tijekom vremena čuvanja u hladnjaku na 4 °C. Nisu ustanovljene značajne razlike između skupina svježih niti hlađenih jaja (P>0,05), iako se uočava trend povećanja TBARS vrijednosti ovisno o trajanju čuvanja kod svih skupina, što je i bilo očekivano.

Tablica 5. Proizvodni pokazatelji nesilica u pokusu

Table 5 Production indicators of laying hens in the experiment

Proizvodni pokazatelji/Production indicators	K	P1	P2
Broj nesilica na početku istraživanja (kom) Number of layers at the beginning of the research (pcs)	160	158	157
Broj nesilica na kraju istraživanja (kom) Number of layers at the end of the research (pcs)	160	158	157
Mortalitet (%) / Mortality (%)	0	0	0
Ukupno jaja po skupini (kom) / Total eggs per group (pcs)	3176	3146	3116
Broj jaja po nesilici (kom) / Number of eggs per layer (pcs)	19,84	19,91	19,84
Masa jaja (g) / Eggs weight (g)	67,47	67,78	67,50
Intenzitet nesivosti (%) / Laying intensity (%)	94,52	94,82	94,51
Konzumacija hrane (g/danu) / Feed consumption (g/day)	125,2	126,6	127,3

K=5 % sojinog ulja; P1=1,5 % ribljeg ulja + 3,5 % lanenog ulja, P2 = 2 % ribljeg + 3 % lanenog ulja
 K = 5% soybean oil, P1 = 1.5% fish oil + 3.5% linseed oil, P2 = 2% fish oil + 3 % linseed oil

Tablica 6. Utjecaj hranidbenoga tretmana i vremena čuvanja na pokazatelje unutarnje kvalitete jaja

Table 6 The influence of feeding treatment and storage time on the indicators of internal egg quality

Pokusna skupina Experimental groups	Vrijeme analize Time of analyses	Pokazatelji/ Indicators				
		Visina bjelanjka Albumen height (mm)	Boja žumanjka Yolk colour	HJ	pH bjelanjka Albumen pH	pH žumanjka Yolk pH
K	1	6,20±1,02 ^a	12,66±0,47 ^{cd}	71,83±10,31 ^a	8,22±0,09 ^d	5,99±0,08 ^e
	14	5,57±1,02 ^b	12,70±0,70 ^{cd}	70,79±7,86 ^b	8,88±0,04 ^{bc}	6,04±0,05 ^d
	28	4,52±0,86 ^c	12,76±0,50 ^c	60,12±9,83 ^c	9,06±0,07 ^a	6,19±0,08 ^a
P1	1	6,25±0,87 ^a	12,46±0,73 ^d	73,90±7,72 ^a	8,04±0,15 ^f	6,03±0,08 ^{de}
	14	5,21±1,09 ^b	13,06±0,36 ^{ab}	68,93±8,36 ^b	8,92±0,04 ^b	6,10±0,11 ^c
	28	4,77±1,22 ^c	13,13±0,51 ^a	62,25±10,97 ^c	9,04±0,07 ^a	6,18±0,08 ^{ab}
P2	1	5,84±1,30 ^a	12,66±0,47 ^{cd}	72,16±9,30 ^a	8,12±0,14 ^e	6,00±0,05 ^{de}
	14	5,57±0,88 ^b	12,80±0,48 ^{bc}	70,57±7,87 ^b	8,86±0,03 ^c	6,13±0,12 ^c
	28	4,83±0,81 ^c	12,90±0,54 ^b	64,11±8,46 ^c	9,05±0,04 ^a	6,17±0,09 ^{ab}
P vrijednost / P value						
Hranidbeni tretman Feeding tretman		0,992	0,091	0,556	0,001	0,054
Vremena čuvanja Storage time		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Interakcija / Interaction		0,141	0,018	0,442	0,001	0,013

K=5 % sojina ulja; P1=1,5 % ribljega ulja + 3,5 % lanena ulja, P2 = 2a % ribljega + 3 % lanena ulja; =srednja vrijednost; sd=standardna devijacija; Prosječne vrijednosti u redovima označene slovima ^{a,b,c,d,e,f} su statistički značajno različite na razini P<0,05; P<0,01 i P<0,001. Jaja su čuvana u hladnjaku na +4 °C.

K = 5% soybean oil, P1 = 1.5% fish oil + 3.5% linseed oil, P2 = 2% fish oil + 3% linseed oil; = mean value; sd = standard deviation; Average values in columns marked by superscript ^{a,b,c,d,e,f} differ significantly at P<0,05; P<0,01 and P<0,001. The eggs were stored in a refrigerator at +4°C.

Tablica 7. Oksidacija lipida (TBARS) u žumanjcima jaja ispitivanih skupina

Table 7 Lipid oxidation (TBARS) in egg yolks of the tested groups

Skupina Group	Vrijeme analize Time of analysis	$\mu\text{g MDA/g}$ žumanjka $\mu\text{g MDA/g}$ yolk
K	1 dan / 1 st day	0,847±0,11
	14 dan / 14 th day	0,781±0,15
	28 dan / 28 th day	0,851±0,10
P1	1 dan / 1 st day	0,859±0,25
	14 dan / 14 th day	0,834±0,17
	228 dan / 28 th day	0,911±0,21
P2	1 dan / 1 st day	0,831±0,08
	14 dan / 14 th day	0,869±0,10
	28 dan / 28 th day	0,937±0,15
P vrijednost / P value		
Hranidbeni tretman / Feeding treatments		0,403
Vrijeme analize / Time of analyses		0,193
Interakcija / Interaction		0,841

K=5 % sojina ulja; P1=1,5 % ribljega ulja + 3,5% lanena ulja, P2 = 2 % ribljega + 3 % lanena ulja; n.s P>0,05

K = 5% soybean oil, P1 = 1.5% fish oil + 3.5% linseed oil, P2 = 2% fish oil + 3% linseed oil; n.s. P>0.05

Oksidacija lipida biokemijski je proces u kojem slobodni radikali preuzimaju elektrone iz masnih kiselina u staničnim membranama, pri čemu ih oštećuju. U nedostatku antioksidanta razvija se lančana lipidna oksidacija, koja prolazi kroz tri faze (inicijacija, propagacija i terminacija). Sprječavanje ove pojave postiže se s pomoću djelovanja antioksidanata u fazi inicijacije (Štefan i sur. 2007.; Adams, 1999.). Lipidna oksidacija predstavlja velik problem u prehrambenoj industriji i proizvodnji hrane koja sadrže lipide i vitamine topive u mastima u smislu roka uporabe i nutritivne vrijednosti takvih proizvoda (Ahmed i sur., 2016.). U istraživanju Kralik i sur. (2020.), koji su u eksperimentu imali tri skupne kokoši, kontrolnu i dvije hranjene kombinacijom ribljega ulja i mikroalge (*Schizochytrium limacinum*), utvrđeno je da jaja iz pokusnih skupina imaju značajno ($P<0,05$) intenzivniju oksidaciju lipida u žumanjcima, mjerenu 28. dana čuvanja u hladnjaku. Rezultati našega istraživanja nisu sukladni njihovim rezultatima.

ZAKLJUČAK

Iz rezultata istraživanja proizvodnih pokazatelja i kvalitete obogaćenih omega-3 jaja vidljivo je da se korištenjem dizajniranih smjesa za nesilice može značajno utjecati na profil masnih kiselina u jajima ($P<0,05$). Vidljivo je, nadalje, da se hranidbom kokoši dizajniranim smjesama može postići poželjan omjer n-6/n-3 PUFA koji preporučuju nutricionisti, a da se pri tome ne narušavaju proizvodni pokazatelji, kao ni kvaliteta omega-3 konzumnih jaja. Rezultati rada također se ističe važnost načina i dužine čuvanja jaja, jer upravo ovi efekti utječu na pokazatelje unutarnje kvalitete jaja.

Napomena: Ovo istraživanje financirano je sredstvima Europskih strukturnih i investicijskih fondova, dodijeljenima hrvatskom nacionalnom Znanstvenom centru izvrsnosti za personaliziranu brigu o zdravlju (KK.01.1.1.01.0010).

LITERATURA

1. Adams, C.A. (1999.): *Nutricines. Food Components in Health and Nutrition*. Nottingham University Press. Thrumpton, Nottingham, UK.
2. Aguilón-Páez Y.J., Romero L.A., Diaz G.J. (2020.): Effect of full-fat sunflower or flaxseed seeds dietary inclusion on performance, egg yolk fatty acid profile and egg quality in laying hens. *Animal Nutrition*, 6(2): 179-184.
3. Ahmed, M., Pickova, J., Ahmad, T., Liaquat, M., Farid, A., Jahangir, M. (2016.): Oxidation of lipids in foods. *Sarhad Journal of Agriculture*, 32(3): 230-238.
4. Alagawany M., Elnesr S.S., Farag M.R., Abd El-Hack M.E., Khafaga A.F., Taha A.E., Tiwari R., Yatoo M.I., Bhatt P., Khurana S.K., Dhama K. (2019.): Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids in Poultry Nutrition: Effect on Production Performance and Health. *Animals*, 9(8): 573.
5. Ayerza, R., Coates, W. (2000.): Dietary levels of chia: influence on yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. *Poultry science*, 79(5): 724-39.
6. Csapó, J., Sugár, L., Horn, A., Kiss, Z.C. (1986.): Chemical composition of milk from red deer roe and fallow deer kept in captivity. *Acta Agronomica Hungarica*, 3(4): 359-372.
7. Ebeid, T.A. (2011.): The impact of incorporation of n-3 fatty acids into eggs on ovarian follicular development, immune response, antioxidative status and tibial bone characteristics in aged laying hens. *Animal*, 5(10): 1554-1562.
8. Elsayed, N.K., AlAffi, S.F. (2020.): Fatty acid pattern and productive performance of laying hens fed dietary flaxseed oil. *Egyptian Poultry Science*, 40(4): (819-829).
9. Gao Z., Zhang J., Li F., Zheng J., Xu G. (2021.): Effect of Oils in Feed on the Production Performance and Egg Quality of Laying Hens. *Animals*, 11(12): 3482.
10. Grčević M., Gajčević-Kralik Z., Kralik G., Ivanković S. (2011.): Kokošje jaje kao funkcionalna namirnica. *Krmiva*, 53(2): 93-100.
11. Grobas, S., Mendez, J., Lazaro, R., De Blas, C., Mateo, 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(8): 1171-9.
12. Irawan, A., Ningsih, N., Hafizuddin, H., Rusli, R.K., Suprayogi, W.P.S., Akhirini, N., Hadi, R.F., Setyono, W., Jayanegara, A. (2022.): Supplementary n-3 fatty acids sources on performance and formation of omega-3 in egg of laying hens: a meta-analysis. *Poultry Science*, 101(1): 101566.
13. Jia, W., Slominski, B.A., Guenter, W., Humphreys, A., Jones, O. (2008): The effect of enzyme supplementation on egg production parameters and omega-3 fatty acid deposition in laying hens fed flaxseed and canola seed. *Poultry Science*, 87(10): 2005-2014.
14. Khan S.A., Khan A., Khan S.A., Beg M.A., Ali A., Damanhoury G. (2017.): Comparative study of fatty-acid composition of table eggs from the Jeddah food market and effect of value addition in omega-3 bio-fortified eggs. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(4): 929- 935.
15. Kralik G., Gajčević Z., Škrtić Z. (2008): The effect of different oil supplementations on laying performance and fatty acid composition of egg yolk. *Italian Journal of Animal Science*, 7(2): 173-183.
16. Kralik, G., Grčević, M., Gajčević-Kralik, Z. (2010.): *Animalni proizvodi kao funkcionalna hrana*. *Krmiva*, 52(1): 3-13.
17. Kralik, G., Grčević, M., Hanžek, D., Margeta, P., Galović, O., Kralik, Z. (2020): Feeding to produce n-3 fatty acid-enriched table eggs. *The Journal of Poultry Science*, 57(2):138-147.
18. 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.
19. Lee S.H., Kim Y.B., Kim D.H., Lee D.W., Lee H.G., Jha R., Lee K.W. (2021.): Dietary soluble flaxseed oils as a source of omega-3 polyunsaturated fatty acids for laying hens. *Poultry Science*, 100(8): 101276.
20. Neijat M., Ojekudo O., House J.D. (2016.): Effect of flaxseed oil and microalgae DHA on the production performance, fatty acids and total lipids of egg yolk and plasma in laying hens. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 115: 77-88.
21. Štefan, L., Tepšić, T., Zavidović, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007.): Lipidna peroksidacija- uzroci i posljedice. *Medicina Fluminensis*, 43(2.): 84-93.
22. TIBCO Statistica® Document Management System 13.5.0 Available online: <https://docs.tibco.com/products/tibco-534-statistica-document-management-system-13-5-0> (pristupljeno 16.12.2023).
23. Yalcin H., Unal M.K. (2010.): The enrichment of hen eggs with omega-3 fatty acids. *Journal of Medicinal Food*, 13(3): 610-4.

SUMMARY

Egg is a nutritionally valuable food that can be enriched with various functional ingredients. The aim of the paper was to produce the eggs enriched with the omega-3 fatty acids, compare production indicators, and determine the influence of egg storage time on the indicators of internal egg quality and lipid oxidation in conventional and enriched eggs. The research was conducted on 480 laying hens of the TETRA SL hybrid. The laying hens were divided into three groups, a control (K) group and two experimental (P1 and P2) groups. Each group consisted of 160 layers divided in 16 repetitions, with 10 hens per repetitions. The control group of laying hens consumed the feed with 5% soybean oil. The group of hens marked P1 consumed the feed in which fish (1.5%) and linseed oil (3.5%) were combined, and the group of hens marked P2 received the feed with 2% fish and 3% linseed oil. Laying hens were fed with the designed mixtures for 4 weeks, and they received the feed and water *ad libitum*. The feed mixtures were balanced at 17.0% crude protein and 12.1 MJ/kg of metabolic energy. The addition of oil combination to the laying hens' feed mixtures significantly ($P < 0.001$) reduced the ratio of $\Sigma n-6/\Sigma n-3$ polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the experimental mixtures when compared to the control. The ratio of PUFA in eggs ($K=10.36$; $P1=1.88$ and $P2=1.98$; $P < 0.001$) changed in accordance with the ratio in the feed mixtures. The nutritional treatments used had no effect on the final weight of laying hens ($P > 0.05$). Production indicators (number of eggs per layer, egg weight, the intensity of laying, and feed consumption) were uniform in all tested groups. Egg storage time had a significant influence ($P < 0.001$) on all egg-quality indicators (albumen height, yolk color, Haugh units/HU, and the pH of albumen and yolk). Nutritional treatment significantly affected the pH of albumen ($P < 0.001$), while the interaction of nutritional treatment and storage time affected yolk color values and pH values of albumen and yolk ($P < 0.05$). No significant differences were detected in the values of lipid oxidation TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) in egg yolks between the groups of either the fresh or of the chilled eggs ($P > 0.05$). The results of the presented analyses indicate that the consumption of feed mixtures used in this experiment successfully increases the content of omega-3 PUFA in eggs but does not impair production indicators and egg quality. The results also indicate that it is important to take care of the time and method of egg storage, because the storage time has a significant impact on the changes in the values of egg quality indicators.

Keywords: omega-3 eggs, storage time, egg quality, TBARS