

Effect of Different Levels of Alfalfa Carotenoids on Yolk Color, Egg Quality, and Indicators of Oxidative Stress in Laying Hens

Soraya Ayatollahi, Hassan Kermanshahi, Reza Majidzadeh Heravi

1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

kermansh@um.ac.ir

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2025.94640.1263>

Introduction: Carotenoids, particularly lutein and β -carotene, are natural pigments with potent antioxidant activities, commonly used to enhance yolk pigmentation and reduce oxidative stress in poultry. With increasing demand for natural additives in animal feed, alfalfa (*Medicago sativa* L.), a rich source of xanthophylls, has drawn attention as a sustainable and functional ingredient. While synthetic products such as Lucantin® are widely used in commercial practice, their natural counterparts may offer comparable efficacy with improved consumer acceptance. The present study investigates the impact of different levels of alfalfa carotenoid extract and commercial Lucantin on egg quality traits and oxidative stress indicators in laying hens.

Materials and Methods: A total of 128 laying hens were randomly assigned to four dietary treatments in a completely randomized design with four replicates of eight birds each. Treatments included: C) control diet (corn-soybean based), A20) control + 20 g/ton alfalfa extract, A30) control + 30 g/ton alfalfa extract, and L35) control + 35 g/ton Lucantin. Carotenoids were extracted from fresh alfalfa via solvent extraction using ethanol, ethyl acetate, and hexane at temperatures of 25°C, 40°C, and 60°C, followed by filtration, rotary evaporation, and saponification using 40% KOH. Carotenoid content was quantified using UV-Vis spectrophotometry based on standard lutein protocols. Egg quality traits (including shell thickness, specific gravity, yolk color (DSM YolkFan™), yolk diameter, yolk height, yolk index, and Haugh unit) were recorded in weeks 2, 4, 6, and 8. Oxidative stress markers such as malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and total antioxidant capacity (TAC) were assessed in weeks 8 from plasma samples. Statistical analysis was performed using the GLM procedure of SAS 9.4, and treatment means were compared using Duncan's multiple range test.

Results and discussion: Dietary supplementation with alfalfa carotenoid extract and Lucantin® significantly improved yolk pigmentation compared to control ($P < 0.0001$), with Lucantin® showing the highest color index. Oxidative stress marker MDA was significantly reduced in A20 and A30 compared to control ($P = 0.0233$), indicating improved oxidative status. Although antioxidant enzymes SOD, GPx, and CAT did not differ significantly ($P > 0.1$), increasing trends were observed in carotenoid-supplemented groups. The yolk index, representing the ratio of yolk height to diameter and an indicator of internal yolk quality, showed no significant differences between treatments during the first two weeks ($P > 0.2$). However, by week six, treatments A30 and L35 exhibited significantly higher yolk index values compared to the control and A20 groups ($P = 0.016$), with A30 presenting the highest values. This suggests that both natural and synthetic carotenoids contribute to improved yolk consistency, likely through the antioxidant effects of lutein and zeaxanthin in alfalfa, which stabilize yolk microstructure and reduce lipid oxidation. Shell thickness did not differ significantly across dietary treatments throughout the experimental period ($P > 0.3$). Specific gravity, an indicator of internal egg quality and water-to-dry matter ratio, was unaffected by treatments ($P > 0.25$). Yolk diameter showed no significant differences among treatments ($P > 0.05$).

Conclusion: The present study demonstrates that dietary supplementation with alfalfa-derived carotenoids at 30 g/ton can effectively improve egg yolk pigmentation and systemic antioxidant defense in laying hens. The effects were equal to or even superior to those observed with synthetic Lucantin, supporting the application of alfalfa as a viable, natural alternative for enhancing egg quality and reducing oxidative stress in poultry production.

Keywords: oxidative stress, egg, yolk color, carotenoid, alfalfa

اثر سطوح مختلف کاروتنوئید یونجه بر رنگ زرده، کیفیت تخم مرغ و شاخص های مرتبط با استرس اکسیداتیو در مرغ های تخم گذار

ثریا آیت اللهی^۱، حسن کرمانشاهی^{۱*}، رضا مجیدزاده هروی^۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۰۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۸/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۰۱

۱- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

kermansh@um.ac.ir

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2025.94640.1263>

چکیده

کاروتنوئیدها علاوه بر نقش در رنگ دهی فرآورده های دامی، به دلیل خواص آنتی اکسیدانی، جایگاه ویژه ای در تغذیه طیور یافته اند. این پژوهش با هدف مقایسه کارایی سه حلال (اتانول، اتیل استات و هگزان) در استخراج کاروتنوئیدها از یونجه و ارزیابی اثر استفاده تغذیه ای از عصاره کاروتنوئیدی یونجه بر کیفیت تخم مرغ و شاخص های اکسیداتیو خون انجام شد. عصاره گیری طی ۱۲ ساعت و در دمای ۲۵، ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی گراد انجام گرفت. ۱۲۸ قطعه مرغ تخم گذار ۵۹ هفتهگی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار، ۴ تکرار و ۸ پرند در هر قفس با جیره های آزمایشی تغذیه شدند. تیمارها شامل جیره پایه، جیره پایه + ۲۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی یونجه، جیره پایه + ۳۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی یونجه و جیره پایه + ۳۵ گرم رنگدانه تجاری لوکانتین در تن خوراک بودند. نمونه گیری تخم مرغ ها هر دو هفته برای ارزیابی شاخص های کیفی و خون گیری در هفته هشتم جهت سنجش فراسنجه های تنش اکسیداتیو انجام شد. بیشترین بازده با حلال هگزان در دمای ۶۰ درجه به دست آمد. براساس روند تغییرات صفات کیفی تخم مرغ، جیره های غنی از کاروتنوئید به ویژه سطح ۳۰ گرم در تن، سبب افزایش تدریجی ارتفاع و بهبود شاخص زرده گردید؛ همچنین در سطح معنی داری موجب افزایش شدت رنگ زرده و کاهش غلظت مالون دی آلدئید خون نسبت به گروه شاهد شد. نتایج این پژوهش نشان می دهد که افزودن این منبع طبیعی رنگدانه در سطح ۳۰ گرم در تن خوراک می تواند به عنوان جایگزینی برای بخشی از رنگدانه های سنتتیک تجاری به کار گرفته شود و به ویژه در دوره های تنش گرمایی یا کاهش کیفیت رنگ زرده توصیه می شود.

واژگان کلیدی: تنش اکسیداتیو، تخم‌مرغ، رنگ زرده، کاروتنوئید، یونجه

مقدمه

در صنعت تولید تخم‌مرغ، یکی از شاخص‌های مهم کیفیت محصول که در ترجیح مصرف‌کننده نقش کلیدی دارد، رنگ زرده است. رنگ زرده عمدتاً ناشی از حضور رنگدانه‌های طبیعی، از جمله کاروتنوئیدها در خوراک طیور می‌باشد (Abdel-Aal et al., 2017). کاروتنوئیدها گروهی از ترکیبات طبیعی محلول در چربی هستند که از طریق جیره قابلیت انتقال به تخم‌مرغ را دارند (Dansou et al., 2023) و علاوه بر نقش رنگ‌دهی، به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی عمل کرده و در کاهش تنش اکسیداتیو^۱، افزایش سلامت عمومی پرند و بهبود کیفیت فرآورده‌های حاصل و در نتیجه سلامت مصرف‌کنندگان مؤثرند (Nimalaratne & Wu, 2015). لوتئین و زی‌زانترین^۲ موجود در زرده تخم‌مرغ به دلیل زیست‌فراهمی بالاتر نسبت به منابع گیاهی، توجه بسیاری را در صنعت غذا و سلامت به خود جلب کرده‌اند. طبق مرور مطالعات انجام‌شده، مصرف تخم‌مرغ غنی از لوتئین و زی‌زانترین می‌تواند به بهبود عملکرد بینایی، محافظت از شبکه چشم در برابر آسیب‌های نوری و تقویت عملکرد آنتی‌اکسیدانی بدن کمک کند (Zaheer, 2017).

یونجه^۳ به عنوان یکی از گیاهان غنی از رنگدانه‌های کاروتنوئیدی، خصوصاً لوتئین، بتاکاروتن و زی‌زانترین شناخته می‌شود (Englmaierová et al., 2019). این ترکیبات در بافت‌های برگ و ساقه گیاه تجمع می‌یابند و از نظر ساختار شیمیایی به خوبی در چربی‌ها حل شده و قابلیت انتقال به سیستم تغذیه‌ای حیوانات را دارند. غلظت بالای این رنگدانه‌ها در یونجه، آن را به منبع بالقوه‌ای برای جایگزینی رنگ‌دانه‌های مصنوعی در خوراک طیور تبدیل کرده است. گزارش‌ها نشان می‌دهند که مصرف خوراک‌های حاوی یونجه می‌تواند موجب افزایش غلظت کاروتنوئید در زرده تخم‌مرغ شود و در نتیجه، رنگ زرده را به‌طور طبیعی افزایش دهد (Laudadio et al., 2014; Zheng et al., 2019; Englmaierová et al., 2019). همچنین، این کاروتنوئیدها با عملکرد آنتی‌اکسیدانی خود قادر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و محافظت از سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد هستند (Delgado-Vargas et al., 2000).

کاربرد رنگدانه‌های سنتتیک در تغذیه طیور علاوه بر مسائل اقتصادی و وابستگی وارداتی، نگرانی‌هایی از نظر سلامت مصرف‌کننده نیز به دنبال دارد. بسیاری از رنگدانه‌های مصنوعی مورد استفاده در جیره‌ها، از مشتقات شیمیایی یا فرآورده‌های صنعتی تولید می‌شوند و پایداری زیستی محدود و حساسیت بالا به اکسیداسیون دارند. این موضوع می‌تواند منجر به تشکیل ترکیبات اکسیداتیو در بافت‌های بدن پرند و ورود احتمالی فرآورده‌های اکسیداسیون لیپیدی و رنگدانه‌های با پایداری پایین به زنجیره غذایی انسان شود. مصرف طولانی مدت یا دوزهای بالای رنگدانه‌های سنتتیک می‌تواند با ایجاد استرس اکسیداتیو، التهاب خفیف بافتی و تغییر در کیفیت چربی زرده همراه باشد که از دیدگاه ایمنی غذایی، مورد توجه مصرف‌کنندگان و نهادهای نظارتی قرار گرفته است. رنگدانه‌های طبیعی به دلیل منشأ گیاهی یا میکروبی خود، از نظر زیست‌سازگاری و ایمنی غذایی نسبت به رنگدانه‌های سنتتیک ارجحیت دارند. این ترکیبات معمولاً همراه با سایر مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پلی‌فنول‌ها و ویتامین‌ها هستند و به همین دلیل از پایداری اکسیداتیو و کارایی زیستی بیشتری برخوردارند. این ویژگی باعث می‌شود که رنگدانه‌های طبیعی بدون ایجاد ترکیبات ناخواسته، موجب بهبود ویژگی‌های کیفی زرده از جمله رنگ، ارتفاع و شاخص زرده

^۱ Oxidative stress

^۲ Zeaxanthin

^۳ *Medicago sativa*

شوند (Nabi et al., 2020). در مقابل، رنگدانه‌های سنتتیک غالباً فاقد این همراهی آنتی‌اکسیدانی هستند. بنابراین، استفاده از منابع طبیعی رنگدانه می‌تواند گزینه‌ای ایمن‌تر، پایدارتر و سازگارتر با سلامت محصول نهایی و خواسته‌های مصرف‌کنندگان باشد. همچنین، استفاده از منابع طبیعی رنگدانه، وابستگی به واردات را کاهش داده و امکان تولید محصول سالم‌تر و مورد پذیرش بیشتر مصرف‌کنندگان را فراهم می‌کند. طبق گزارش چاوز و همکاران (Chaves et al., 2022)، استفاده از رنگدانه‌های طبیعی در جیره‌های پایه سورگوم می‌تواند کیفیت رنگ زرده و پذیرش مصرف‌کننده را به‌صورت مؤثرتری نسبت به رنگدانه‌های سنتتیک بهبود دهد. بنابراین، جایگزینی رنگدانه‌های سنتتیک با منابع طبیعی می‌تواند رویکردی پایدار، ایمن و اقتصادی برای تولید تخم‌مرغ با کیفیت بالاتر باشد.

بازده استخراج و کیفیت عصاره‌های کاروتنوئیدی به‌طور قابل‌توجهی تحت تأثیر نوع حلال مورد استفاده قرار می‌گیرد. حلال‌های مختلف مانند اتانول، اتیل‌استات و هگزان به‌دلیل تفاوت در قطبیت و توانایی انحلال ترکیبات لیپوفیلک، عملکرد متفاوتی در استخراج رنگدانه‌ها از ماتریکس^۴ گیاهی نشان می‌دهند؛ بنابراین، انتخاب نوع حلال می‌تواند بر مقدار رنگدانه‌های بازیابی شده و ویژگی‌های تغذیه‌ای عصاره نهایی مؤثر باشد (Rodriguez-Amaya, 2001; Saini & Keum, 2018). در شرایط صنعتی، استفاده از رنگدانه‌های سنتتیک مانند لوکانتین به‌دلیل پایداری بالا و اثرگذاری سریع بر رنگ زرده متداول است، اما نگرانی‌های مربوط به ایمنی غذایی و اثرات زیست محیطی موجب افزایش تمایل به جایگزینی آن‌ها با منابع طبیعی کاروتنوئیدی شده است (Yunitasari et al., 2023). مطالعات نشان می‌دهند که مصرف خوراکی‌های حاوی رنگدانه طبیعی می‌تواند ضمن بهبود رنگ زرده، موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی (کاهش مالون‌دی‌آلدئید^۵) و افزایش ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی پلاسما (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام^۶، افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیس‌موتاز^۷ و کاتالاز^۸) در طیور تخم‌گذار گردد (Reda et al., 2025).

با وجود مطالعات متعدد در زمینه تأثیر رنگدانه‌های گیاهی بر کیفیت تخم‌مرغ، تاکنون بررسی جامعی پیرامون مقایسه روش‌های مختلف استخراج کاروتنوئید از یونجه با سه حلال (هگزان، اتیل‌استات و اتانول) و ارزیابی اثرات تغذیه‌ای آن‌ها در کنار مقایسه با یک رنگ‌دانه مصنوعی رایج، در مرغ تخم‌گذار انجام نشده است. از این‌رو، پژوهش حاضر با اهداف زیر طراحی و اجرا گردید:

۱. استخراج کاروتنوئید از یونجه با سه نوع حلال رایج و مقایسه بازده و کیفیت عصاره‌ها،
۲. بررسی اثرات تغذیه‌ای عصاره‌های به دست آمده بر رنگ زرده و شاخص‌های کیفی تخم‌مرغ،
۳. ارزیابی تأثیر رنگدانه‌ها بر شاخص‌های خونی کلیدی مرتبط با تنش اکسیداتیو در مرغ تخم‌گذار.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش و جیره غذایی

مطالعه حاضر در ایستگاه تحقیقاتی و فارم دانشگاه فردوسی مشهد به مدت ۸ هفته در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و چهار تکرار اجرا شد؛ هر تکرار شامل هشت پرندۀ نگهداری شده در قفس بود. در این مطالعه از مرغ‌های تخم‌گذار سویه شیور سفید^۹ در ۵۹ هفتهگی استفاده شد. این سویه از جمله لاین‌های تجاری اصلاح‌شده با عملکرد تخم‌گذاری بالا است که

^۴ Matrix

^۵ Malondialdehyde

^۶ Total Antioxidant Capacity

^۷ Superoxide Dismutase

^۸ Catalase

^۹ Shaver White Strain

توسط شرکت پرورش طیور شیور^{۱۰} در کانادا توسعه یافته است. جیره پایه بر اساس ذرت و کنجاله سویا و مطابق با نیازهای تغذیه ای سویه شیور سفید در سن ۵۹ هفتگی تنظیم شد (Shaver, 2020). چهار تیمار آزمایشی به شرح زیر در نظر گرفته شدند: تیمار شاهد (بدون افزودن منبع کاروتنوئیدی)، (۲) تیمار شاهد + ۲۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج شده از گیاه یونجه، (۳) تیمار شاهد + ۳۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج شده از گیاه یونجه و (۴) تیمار شاهد + ۳۵ گرم لوکانتین (رنگدانه شرکت جوانه خراسان) به عنوان منبع تجاری کاروتنوئید به ازای هر تن خوراک بود. به منظور سهولت در ارائه نتایج، تیمارها در جداول و ادامه متن به صورت اختصاری نشان داده شدند: C = تیمار شاهد، A20 = تیمار شاهد + ۲۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج شده از گیاه یونجه در تن خوراک، A30 = تیمار شاهد + ۳۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج شده از گیاه یونجه در تن خوراک، L35 = تیمار شاهد + ۳۵ گرم لوکانتین در تن خوراک

تمام جیره‌ها از نظر انرژی قابل متابولیسم و پروتئین خام یکسان سازی شده و وزن اولیه پرندگان در هر قفس به منظور حذف اثر تفاوت‌های آغازین کنترل گردید. خوراک به شکل آردی^{۱۱} تهیه شد و تخصیص خوراک به صورت محدود به میزان ۱۱۰ گرم به ازای هر پرنده در روز انجام گرفت. آب آشامیدنی به صورت آزاد در دسترس پرندگان قرار داشت. هزینه خوراک به ازای تولید یک کیلوگرم تخم مرغ با استفاده از ضریب تبدیل و قیمت یک کیلوگرم خوراک (Bagheri et al., 2020) در زمان اجرای طرح ۲۸ تا ۳۲ هزار تومان برآورد شد. در آغاز آزمایش، مرغ‌های تخم‌گذار با میانگین وزن بدن 150 ± 15 گرم و میانگین وزن تخم مرغ 64 ± 1 مورد استفاده قرار گرفتند. تولید تخم مرغ اولیه در شروع دوره حدود ۸۶٪ گزارش شد. ترکیب مواد مغذی جیره‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱ - اجزاء تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره پایه

Table 1-The ingredient and nutrient composition of basal diet

درصد جیره	اقلام خوراکی (درصد) Ingredients (percentage)
51.00	ذرت Corn
30.00	کنجاله سویا (پروتئین خام ۴۴ درصد) Soybean meal (CP 44%)
4.00	سبوس گندم Wheat bran
9.00	پودر سنگ آهک Limestone powder
1.40	دی کلسیم فسفات Di-calcium phosphate
3.25	روغن گیاهی Vegetable oil
0.15	دی ال-متیونین DL-methionine
0.10	ال-لایزین هیدروکلراید L-lysine hydrochloride
0.30	نمک خوراکی NaCl

^{۱۰} Shaver Poultry Breeding Farms

^{۱۱} Mash

بی کربنات سدیم Sodium bicarbonate	0.20
کولین کلراید Choline chloride (60%)	0.10
مکمل ویتامینه ^۱ Vitamin premix ¹	0.25
مکمل معدنی ^۲ Mineral premix ²	0.25

ترکیب شیمیایی جیره پایه

Chemical compounds of the diet

انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/ کیلوگرم) ME, kcal/kg	2750
پروتئین خام (درصد) CP%	16.50
کلسیم (درصد) Ca%	4.10
فسفر قابل استفاده (درصد) Available P %	0.40
لیزین قابل دسترس (درصد) Digestible lysine %	0.75
متیونین + سیستین (درصد) Digestible methionine + cystine %	0.65
سدیم Sodium	0.17

^۱ هر کیلوگرم مکمل ویتامینه شامل ۱۱۰۲۵ واحد بین المللی ویتامین A، ۳۵۲۸ واحد بین المللی ویتامین D۳، ۳۳ واحد بین المللی ویتامین E، ۹۱۰۰ میلیگرم ویتامین K۳، ۱۸۰۰ گرم ویتامین B۱، ۸۲۵۰ گرم ویتامین B۲، ۱ گرم ویتامین B۳، سه گرم ویتامین B۵، ۳۰۰ گرم ویتامین B۶، ۱۲۵۰ گرم ویتامین B۹، ۱۵۰۰ گرم ویتامین B۱۲ و 50.0 گرم کولین کلراید است.

^۲ هر کیلوگرم مکمل معدنی حاوی ۲۵۰۱ میلیگرم ید و ۳۰۰ میلیگرم سلنیوم است.

¹ Vitamin premix supplied the following, per kilogram of diet: vitamin A, 11025 IU; vitamin D3, 3528 IU; vitamin E, 33 mg; vitamin K3, 0.91 mg; Vitamin B1, 0.18 g; Vitamin B2, 0.825 g; Vitamin B3, 1.00g; Vitamin B5, 3.00 g; Vitamin B6, 0.30g; Vitamin B9, 0.125g; Vitamin B12, 0.15g; choline chloride, 50g

² Mineral premix supplied the following per kilogram of diet: I (calcium iodate), 1.25g; Se (Sodium selenite), 0.3 g

آماده سازی عصاره کاروتنوئیدی یونجه

یک کیلوگرم از پودر یونجه تازه و سبز پس از آسیاب شدن، ابتدا با آب مقطر شسته شد و سپس به مدت ۲۵ ساعت در ۵ لیتر آب مقطر خیسانده گردید. پس از خیساندن، نمونه تحت فشار مکانیکی فشرده و مایع به دست آمده از طریق کاغذ صافی با تخلخل مناسب فیلتر شد. فرآیند استخراج کاروتنوئیدها با استفاده از سه حلال اتیل استات، اتانول و هگزان انجام گرفت که هر کدام با توجه به تفاوت قطبیت و قدرت حلالیت، نقش بسزایی در بازیابی طیف های مختلف کاروتنوئیدها دارند. هگزان به عنوان حلال غیر قطبی، توانایی بالایی در استخراج کاروتنوئیدهای لیپوفیلیک دارد، اتانول با قطبیت متوسط قادر است ترکیبات قطبی تر را استخراج کند و اتیل استات نیز به عنوان حلالی با قطبیت نسبی، برای استخراج ترکیبات با قطبیت متوسط مناسب است (Bednarik, 2013; Jiang et al., 2024). استخراج نمونه ها به مدت ۱۲ ساعت در دماهای ۲۵، ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی گراد تا زمانی انجام شد که لایه آلی کاملاً بی رنگ گردید چرا که نشان دهنده استخراج کامل بود. نمونه ها پس از عبور از فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرون، تحت خلأ و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با دستگاه روتاری تبخیر شدند. عصاره به دست آمده شامل استر لوتئین همراه با اسیدهای چرب بود (King & Wang, 2004; Rodríguez-Amaya & Kimura 2004).

جداسازی لوتئین

برای تفکیک لوتئین از استرهای اسید چرب، عصاره تغلیظ شده با محلول ۴۰ درصد پتاسیم هیدروکسید^{۱۲} به مدت ۲ ساعت در دمای کنترل شده صابونی سازی^{۱۳} گردید. پس از صابونی شدن و ساترifiوژ، فاز رویی استونی با دقت و به آرامی روبرداری^{۱۴} شد. پس از تبخیر فاز استونی، لایه روغنی حاوی کاروتنوئید کل به دست آمد. این لایه در هگزان حل و محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت تا کریستال های زرد رنگ لوتئین شکل گرفتند. کریستال ها جهت اندازه گیری و آنالیزهای بعدی حفظ شدند (King & Wang 2004).

تعیین غلظت کاروتنوئید کل و لوتئین

غلظت کاروتنوئید کل و لوتئین توسط اسپکتروفتومتری^{۱۵} در محدوده طول موج ۲۱۰ تا ۲۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. استاندارد لوتئین (۹۵٪ خلوص، سیگما^{۱۶}، آمریکا) برای رسم منحنی استاندارد و محاسبه غلظت کاروتنوئید کل استفاده شد. میزان کاروتنوئید کل با توجه به معادله ۱ محاسبه شد.

معادله (۱)

$$Total\ Carotenoids\ (g/g) = \frac{A \times V \times 10^6}{A_{1cm}^{1\%} \times W}$$

که در آن A میزان جذب نوری محلول عصاره شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر، V حجم نهایی عصاره (میلی لیتر)، $A_{1cm}^{1\%}$ ضریب جذب ویژه کاروتنوئید (لیتر بر گرم در سانتی متر) که برای لوتئین معادل عدد ۲۵۹۲ در طول موج ۴۵۰ نانومتر در نظر گرفته شد (Britton, 1995). W وزن نمونه اولیه (گرم) و 10^6 ضریب تبدیل واحد به میکروگرم است (Rodríguez-Amaya & Kimura 2004).

نمونه برداری و ارزیابی شاخص های کیفی تخم مرغ

نمونه برداری تخم مرغ ها به صورت هر دو هفته از هر قفس انجام شد و یک تخم مرغ تازه از هر قفس به صورت تصادفی جمع آوری گردید. ضخامت و وزن پوسته، ارتفاع و قطر زرده با استفاده از ابزارهای دقیق، طول و قطر با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۵ میلی متر و وزن با استفاده از ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه گیری شدند. همان طور که در معادله ۲ نشان داده شده است شاخص زرده^{۱۷} به عنوان نسبت ارتفاع زرده به قطر آن تعریف می شود و معیاری برای ارزیابی کیفیت داخلی تخم مرغ به شمار می آید (Heiman & Carver, 1936). این شاخص در مطالعات مختلف به منظور بررسی تأثیر تیمارهای تغذیه ای یا شرایط نگهداری و سن بر کیفیت تخم مرغ به کار گرفته شده است و بیانگر میزان برجستگی و قوام زرده است؛ به طوری که کاهش آن می تواند نشانه ای از کاهش تازگی یا تخریب ساختار زرده باشد (Akyurek, Silversides & scott, 2000 ; & Okur, 2009).

معادله (۲)

^{۱۲} KOH

^{۱۳} Saponification

^{۱۴} Decanting

^{۱۵} UV-Vis

^{۱۶} Sigma-Aldrich

^{۱۷} Yolk Index

$$Yolk\ index = \frac{YH}{YD}$$

که در آن YH ارتفاع زرده و YD میانگین قطر زرده است.

رنگ زرده تخم مرغ با استفاده از از پنل استاندارد فن سنچس رنگ^{۱۸} (سویس) به صورت چشمی و با مقیاس عددی ۱۵ مرحله‌ای تعیین شد. این پنل که در آزمایشگاه‌های مرغداری ایران کاربرد دارد، یکی از رایج‌ترین و معتبرترین روش‌های ارزیابی رنگ زرده، شامل طیفی از رنگ‌های استاندارد زرده است که به کمک آن رنگ نمونه‌ها با معیارهای مرجع مقایسه و درجه‌بندی می‌شوند.

واحد هاو^{۱۹} که نشان دهنده کیفیت داخلی تخم مرغ است نیز بر اساس معادله ۳ محاسبه گردید (Zhang et al., 2024). عدد بالاتر در واحد هاو نشان دهنده کیفیت داخلی بهتر و تازگی بیشتر تخم مرغ است؛ زیرا این شاخص به ارتفاع آلبومین و وزن تخم مرغ وابسته بوده و کاهش آن معمولاً ناشی از افت قوام سفیده در اثر نگهداری طولانی یا شرایط نامناسب است (Jones & Musgrove, 2005).

معادله (۳)

$$HU = 100 \log (H + 7.57 - 1.7W^{0.37})$$

که در آن H ارتفاع سفیده (میلی متر) و W وزن تخم مرغ (گرم) است.

وزن مخصوص تخم مرغ‌ها با استفاده از روش جابه‌جایی آب (اصول ارشمیدس) و مطابق روش گزارش شده توسط ویدال و همکاران (Vidal et al., 2013) و چاوز و همکاران (Chávez et al., 2022) اندازه‌گیری شد. ابتدا وزن تخم مرغ‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم ثبت گردید. سپس حجم هر تخم مرغ از طریق میزان جابجایی آب در استوانه مدرج (با دقت ۱ میلی لیتر) در دمای اتاق (۱±۲۵ درجه سانتی گراد) اندازه‌گیری شد. در نهایت، وزن مخصوص هر تخم مرغ با استفاده از معادله ۴ محاسبه شد:

معادله (۴)

$$SG = \frac{W}{V}$$

که در آن SG وزن مخصوص (g/cm³)، W وزن تخم مرغ (گرم)، V حجم تخم مرغ (سانتی متر مکعب، معادل با میلی لیتر) است.

نمونه برداری خون و تعیین شاخص‌های تنش اکسیداتیو

به منظور تعیین شاخص‌های خونی مرتبط با وضعیت اکسیداتیو، در پایان هفته هشتم دوره آزمایشی، از هر قفس یک پرنده به صورت تصادفی انتخاب و از ورید بال نمونه‌گیری خون انجام شد. نمونه‌ها پس از لخته شدن در لوله‌های بدون ضد انعقاد قرار داده شده و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس سرم جدا شده به میکروتیوب‌های استریل منتقل و در دمای -۲۰ درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایشات ذخیره شد.

فراسنجه‌های مورد اندازه‌گیری شامل مالون دی‌آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز^{۲۰}، کاتالاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام بودند. انتخاب این شاخص‌ها به دلیل نقش کلیدی آن‌ها در تبیین تعادل اکسیداتیو-آنتی‌اکسیدانی صورت

^{۱۸} YolkFan (DSM Nutritional Products)

^{۱۹} Haugh Unit

^{۲۰} GPx

گرفت. مالون دی آلدئید به عنوان یکی از متداول ترین نشانگرهای پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش آن بیانگر آسیب به ساختار غشای سلولی و تشدید تنش اکسیداتیو است. در مقابل، آنزیم‌های آنتی اکسیدانی با خنثی سازی گونه‌های فعال اکسیژن در حفظ پایداری سلولی نقش دارند و فعالیت آن‌ها شاخصی از توان دفاع آنتی اکسیدانی ارگانسم محسوب می‌شود (Ighodaro & Akinloye, 2017). ظرفیت آنتی اکسیدانی تام نیز معیاری ترکیبی برای ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل سرم بوده و نمایانگر تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد و سامانه‌های دفاعی بدن است.

تحلیل آماری

تحلیل داده‌ها براساس طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ (SAS Institute, 2013) و مدل خطی کلی (GLM) تحلیل گردیدند. در صورت وجود تفاوت معنی دار بین تیمارها، برای مقایسه میانگین‌ها، آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح اطمینان ۹۵ درصد به کار گرفته شد.

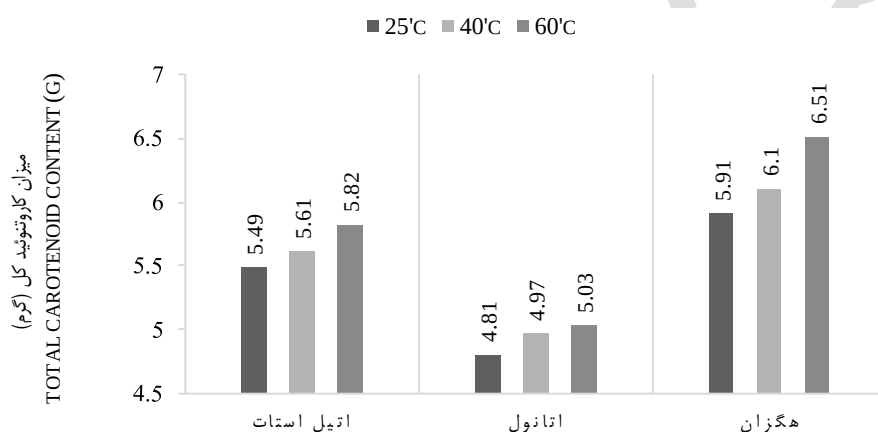
نتیجه گیری و بحث

بر اساس نتایج به دست آمده در شکل ۱، بیشترین میزان استخراج کاروتنوئید کل با استفاده از حلال هگزان در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به دست آمد (مقدار ۶/۵۱ گرم). این نتایج نشان می‌دهد که حلال‌های غیرقطبی مانند هگزان، به دلیل سازگاری با ساختار لیپوفیلیک کاروتنوئیدها، بازده استخراج بالاتری داشته‌اند مطابق با شواهدی که نشان می‌دهند استفاده از حلال‌های غیرقطبی برای استخراج کاروتنوئیدهای غیرقطبی مؤثرتر است؛ همچنین تأکید کرده‌اند که نوع ساختار مولکولی هر کاروتنوئید و ترکیب ماتریکس زیستی تعیین می‌کند که حلال قطبی یا غیرقطبی مناسب‌تر باشد (Saini & Keum, 2018). علارغم اینکه استفاده از حلال‌های غیررسمی جدید و تکنیک‌های استخراج سبز در حال افزایش است، اما هنوز هم ترکیبات متداول مثل هگزان به دلیل سهولت و کارایی در استخراج ترکیبات لیپوفیلی ترجیح داده می‌شوند (Arvayo-Enríquez et al., 2013). نکته قابل توجه آن است که نتایج مشابهی در سایر ماتریکس‌های گیاهی نیز گزارش شده است؛ به عنوان مثال، در مطالعه‌ای بر روی دانه نیم، هگزان به عنوان مؤثرترین حلال در استخراج روغن نیم شناخته شد که تأکیدی بر نقش قطبیت حلال در بازده استخراج ترکیبات غیرقطبی است (Ahizi et al., 2022). بنابراین، هم خوانی نتایج حاضر با مطالعات دیگر نشان می‌دهد که انتخاب حلال با قطبیت مشابه ماهیت مولکولی رنگدانه، عامل کلیدی در افزایش بازده استخراج است. همچنین افزایش دما تا محدوده مناسب باعث کاهش ویسکوزیته حلال و تسهیل انتقال جرم شده و بازده استخراج کاروتنوئید را بهبود می‌دهد (Shahidan et al., 2017). علاوه بر این حضور پروتئین‌ها و فسفولیپیدها در ماده اولیه

می‌تواند حل‌پذیری کاروتنوئیدها در حلال‌های قطبی را افزایش دهد. بنابراین، تفاوت در ترکیب ماتریس، نوع کاروتنوئید و شرایط فرآیند می‌تواند علت اختلاف نتایج میان مطالعات مختلف باشد (Yang et al., 2020).

رنگ زرده

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول (۲) مربوط به تغییرات رنگ زرده طی دوره آزمایش، میانگین شاخص رنگ زرده در تیمارهای دریافت‌کننده رنگدانه (A20، A30 و L35) به‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمار پایه (C) بود ($P < 0.0001$). بیشترین شاخص رنگ زرده در تمامی هفته‌ها مربوط به تیمار L35 (رنگدانه تجاری لوکانتین) بود اما تیمار A30 که حاوی دُز بالاتر رنگدانه کاروتنوئیدی یونجه بود، نیز عملکرد مطلوبی از خود نشان داد و در تمام هفته‌ها به‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد قرار گرفت. این روند افزایشی وابسته به دُز، به ویژه در هفته ششم، شدت بیشتری داشت که در آن تیمارهای A30 و L35 به ترتیب نمراتی معادل ۷/۵ و ۱۱/۴۳۷ کسب کردند، در حالی که تیمار شاهد تنها شاخص ۴/۶۲۵ را نشان داد. این نتایج مؤید



شکل ۱- تأثیر نوع حلال (اتیل استات، اتانول و هگزان) و دمای استخراج (۲۵، ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد) بر میزان کاروتنوئید کل (گرم) استخراج شده از نمونه یونجه

Figure 1- Effect of solvent type (ethyl acetate, ethanol, and hexane) and extraction temperature (25, 40, and 60 °C) on total carotenoid content (g) extracted from alfalfa samples

اثر مثبت منابع کاروتنوئیدی طبیعی و مصنوعی در بهبود رنگ‌پذیری زرده تخم‌مرغ است. اگرچه رنگدانه تجاری عملکرد بهتری نشان داد، اما عصاره یونجه نیز به‌عنوان منبع طبیعی لوتئین و زی‌زانتین توانست بهبود قابل توجهی در کیفیت رنگ زرده ایجاد کند. یافته‌های این مطالعه با نتایج گزارش شده توسط کاراداس و همکاران (Karadas et al., 2006) و عبدل‌آل و همکاران (Abdel-Aal et al., 2017) که بر اثربخشی منابع گیاهی حاوی کاروتنوئید در افزایش رنگ زرده تأکید دارند، هم‌راستا است. بر اساس نتایج این مطالعه، بهبود رنگ زرده را می‌توان به افزایش رسوب کاروتنوئیدهای لیپوفیل در تخمدان

و زرده نسبت داد. این موضوع با نتایج (Grčević et al., 2019) همخوان است که بیان نمودند افزودن منبع طبیعی لوتئین سبب افزایش محتوای رنگدانه و ارتقای شدت رنگ زرده می‌گردد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که منابع طبیعی کاروتنوئید نقش قابل توجهی در بهبود ویژگی‌های بازاری و کیفی تخم‌مرغ دارند.

جدول ۲- اثر سطوح مختلف کاروتنوئیدهای استخراجی از یونجه و رنگدانه مصنوعی لوکانتین بر شاخص رنگ زرده تخم‌مرغ در طی دوره آزمایشی
Table 2- Effects of different levels of Alfalfa-derived carotenoids and synthetic pigment (Lucantin®) on egg yolk color index during the experimental period

هفته آزمایشی Experimental week	جیره‌های آزمایشی Experimental diets				P value
	C ¹ جیره پایه	A 20 ² g 20 کاروتنوئید یونجه	A 30 ³ g 30 کاروتنوئید یونجه	L 35 ⁴ g 35 لوکانتین	
هفته دوم	4.19 ± 0.11 ^c	4.75 ± 0.12 ^b	5.13 ± 0.11 ^b	10.19 ± 0.11 ^a	<0.0001
هفته چهارم	4.50 ± 0.20 ^d	5.50 ± 0.12 ^c	6.38 ± 0.24 ^b	10.56 ± 0.18 ^a	<0.0001
هفته ششم	4.63 ± 0.12 ^d	6.00 ± 0.11 ^c	7.50 ± 0.18 ^b	11.44 ± 0.10 ^a	<0.0001
هفته هشتم	4.13 ± 0.11 ^d	5.88 ± 0.15 ^c	6.56 ± 0.15 ^b	10.56 ± 0.29 ^a	<0.0001

مقادیر به صورت (میانگین ± خطای استاندارد (SE)) حاصل از چهار تکرار مستقل گزارش شده‌اند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد. ^{a-d} میانگین‌هایی که در هر ردیف دارای حروف متفاوت هستند، تفاوت آماری معنی‌دار را در سطح $P < 0.05$ نشان می‌دهند.

C = شاهد (بدون افزودن منبع کاروتنوئیدی)، A20 = جیره حاوی ۲۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از گیاه یونجه در هر تن جیره، A30 = جیره حاوی ۳۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از گیاه یونجه در هر تن جیره، L35 = جیره حاوی ۳۵ گرم لوکانتین به‌عنوان منبع تجاری کاروتنوئید

Values are expressed as mean ± standard error (SE) based on four independent replicates. Mean comparisons were performed using Duncan's multiple range test at a 95% confidence level.

^{a-d} Means in each row with different superscript letters indicate statistically significant differences at $P < 0.05$.

C¹ = Control (no supplemental carotenoid source). A20² = Diet supplemented with 20 mg/kg alfalfa-derived carotenoid extract. A30³ = Diet supplemented with 30 mg/kg alfalfa-derived carotenoid extract. L35⁴ = Diet supplemented with 35 mg/kg lucantin (commercial carotenoid source)

فراسنجه‌های خون

در هفته هشتم آزمایش، بررسی شاخص‌های خون مرتبط با وضعیت اکسیداتیو در مرغ‌های تخم‌گذار، تحت تأثیر تیمارهای مختلف مکمل‌سازی شده با رنگدانه کاروتنوئیدی یونجه، تفاوت‌های قابل توجهی را در برخی شاخص‌ها نشان داد (جدول ۳). مقدار مالون‌دی‌آلدئید در تیمار شاهد (C) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۲ و ۳ بود ($P = 0.0233$)؛ به‌طوری که کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید در این دو تیمار، بیانگر بهبود وضعیت اکسیداتیو و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی است (An et al., 2019). این یافته‌ها با نتایج صالح و همکاران (Saleh et al., 2021) همخوانی دارد؛ آنها گزارش کردند که مصرف رنگدانه‌های طبیعی مانند پاپریکا یا ترکیب آن با رنگدانه شیمیایی موجب افزایش امتیاز رنگ زرده و افزایش ویتامین E زرده همراه با کاهش غلظت MDA می‌شود. هم‌سویی نتایج نشان می‌دهد که منابع رنگدانه طبیعی علاوه بر نقش رنگ‌زایی، دارای اثر آنتی‌اکسیدانی مؤثر نیز هستند که می‌تواند به بهبود پایداری لیپیدها و کیفیت تغذیه‌ای تخم‌مرغ منجر شود. این یافته با نتایج مطالعه هنگ و همکاران (Heng et al., 2021) که بیان داشتند استفاده از منابع غنی از آنتی‌اکسیدان، سطح مالون‌دی‌آلدئید را در طیور کاهش می‌دهد، هم‌راستا بود. یافته‌های حاضر با نتایج لی و همکاران (lee et al., 2014)

جدول ۳- اثر تیمارهای مختلف جیره غذایی حاوی کاروتنوئید یونجه و لوکانتین تجاری بر شاخص‌های خونی مرتبط با تنش اکسیداتیو در مرغ‌های تخم‌گذار در هفته هشتم دوره آزمایش

Table 3 – Effects of dietary treatments containing Alfalfa carotenoid and commercial Lucantin on oxidative stress-related blood parameters in laying hens at week 8 of the experiment

Treatment	MDA ¹ (nmol/ml)	TAC ² (μmol/L)	SOD ³ (U/ml)	GPx ⁴ (U/ml)	CAT ⁵ (U/ml)
C	8.94±0.19 ^a	301.38±16.44	269.00±13.60	212.63±5.81	124.13±11.64
A 20	7.50±0.07 ^b	314.38±10.83	312.38±30.62	194.00±8.27	138.63±17.95
A 30	7.84±0.34 ^b	286.00±5.72	315.88±18.76	189.38±8.67	161.13±12.22
L 35	8.14±0.41 ^{ab}	332.25±9.72	319.38±13.56	208.13±9.38	129.50±5.33
P value	0.0233	0.0732	0.3063	0.1904	0.2244

داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار (Mean ± SE) ارائه شده‌اند. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند. ^{a-b} میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف متفاوت هستند، تفاوت آماری معنی‌دار را در سطح $P < 0.05$ نشان می‌دهند.

C = شاهد (بدون افزودن منبع کاروتنوئیدی)، A20 = جیره حاوی ۲۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از گیاه یونجه در هر تن جیره، A30 = جیره حاوی ۳۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از گیاه یونجه در هر تن جیره، L35 = جیره حاوی ۳۵ گرم لوکانتین به‌عنوان منبع تجاری کاروتنوئید

¹MDA: مالون‌دی‌آلدئید؛ ²TAC: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام؛ ³SOD: سوپراکسید دسموتاز؛ ⁴GPx: گلوکاتین پراکسیداز؛ ⁵Catalase: کاتالاز.

Values are expressed as mean ± standard error (SE) based on four independent replicates. Mean comparisons were performed using Duncan's multiple range test at a 95% confidence level. ^{a-b} Means in each column with different superscript letters indicate statistically significant differences at $P < 0.05$.

C = Control (no supplemental carotenoid source). A20 = Diet supplemented with 20 mg/kg alfalfa-derived carotenoid extract. A30 = Diet supplemented with 30 mg/kg alfalfa-derived carotenoid extract. L35 = Diet supplemented with 35 mg/kg lucantin (commercial carotenoid source)

¹MDA: malondialdehyde; ²TAC: total antioxidant capacity; ³SOD: superoxide dismutase; ⁴GPx: glutathione peroxidase;

⁵CAT: catalase.

هم‌راستا بود؛ آن‌ها نیز کاهش معنی‌دار مالون‌دی‌آلدئید و بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی را در مرغ‌های دریافت‌کننده لوکانتین گزارش کردند. شاخص‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دیس‌موتاز، گلوکاتین پراکسیداز و کاتالاز نیز بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشتند. در مورد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام، تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($P = 0.0732$). لازم به ذکر است به دلیل عدم بروز تفاوت‌های معنی‌دار در سنین ابتدایی‌تر، نتایج بر اساس نمونه‌گیری انجام شده در هفته هشتم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در پژوهش حاضر، افزودن رنگدانه طبیعی سبب کاهش مالون‌دی‌آلدئید زرده شد، اما تغییری در شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی مشاهده نگردید. این نتیجه با گزارش (Gao et al., 2020) همسو نیست؛ آن‌ها نشان دادند که آستاگزانتین طبیعی علاوه بر کاهش MDA، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیز می‌شود. این اختلاف می‌تواند از نوع و قدرت فعالیت آنتی‌اکسیدانی رنگدانه، میزان و مدت زمان مصرف، پایداری مولکول در جیره و ساختار لیپیدی زرده ناشی شود. در واقع، رنگدانه‌های با ساختار اکسی کاروتنوئیدی مانند آستاگزانتین دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به گزانتوفیل‌های معمولی هستند و به دلیل تفاوت در توان جذب رادیکال آزاد و قرارگیری در لایه‌های لیپیدی زرده، می‌توانند اثرات بیولوژیکی متفاوتی نشان دهند. لذا بهبود رنگ زرده و کاهش پراکسیداسیون چربی لزوماً با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی همراه نیست و این موضوع به ساختار شیمیایی و قدرت آنتی‌اکسیدانی منبع رنگدانه وابسته است.

شاخصه‌های کیفی تخم‌مرغ

شاخص واحد هاو در هفته‌های دوم و هشتم تحت تأثیر نوع رنگدانه قرار گرفت ($P < 0.05$). در هفته دوم، تیمارهای دریافت‌کننده عصاره کاروتنوئیدی یونجه با دز بالاتر (۳۰ گرم کاروتنوئید) و لوکانتین (۳۵ گرم لوکانتین) کاهش معنی‌داری نسبت به کنترل و تیمار A 20 داشتند. این یافته ممکن است ناشی از اثرات منفی مصرف بالای رنگدانه‌ها، بر کیفیت سفیده تخم‌مرغ باشد. در هفته هشتم نیز، تیمار لوکانتین به‌طور معنی‌داری پایین‌ترین مقدار واحد هاو را نشان داد، در حالی که

جدول ۴- اثر تیمارهای مختلف جیره غذایی حاوی کاروتنوئید یونجه و لوکانتین تجاری بر شاخص‌های کیفی تخم‌مرغ در طول دوره آزمایشی

Table 4 – The effect of different dietary treatments containing Alfalfa carotenoid and commercial Lucantin on egg quality traits during the experimental period

تیمار treatment	ارتفاع زرده Yolk height (mm)	میانگین قطر زرده Yolk Diameter (mm)	شاخص زرده Yolk index	وزن مخصوص Specific gravity	ضخامت پوسته Shell thickness (μm)	واحد هاو Haugh unit
هفته ۲ آزمایش Experimental Week 2						
C ¹	19.49 ± 0.589	41.51 ± 0.798	0.47 ± 0.013	1.093 ± 0.002	463.25 ± 2.926	98.42 ± 1.030 ^a
A 20 ²	19.19 ± 0.515	41.64 ± 0.203	0.46 ± 0.012	1.094 ± 0.002	461.5 ± 3.663	98.84 ± 0.377 ^a
A 30 ³	19.35 ± 0.125	43.16 ± 0.565	0.45 ± 0.006	1.092 ± 0.002	468.25 ± 2.562	94.43 ± 1.106 ^b
L 35 ⁴	19.09 ± 0.274	43.54 ± 0.699	0.44 ± 0.010	1.092 ± 0.002	456.5 ± 6.384	94.15 ± 1.627 ^b
P value	0.9161	0.0793	0.2231	0.8626	0.3025	0.0179
هفته ۴ آزمایش Experimental Week 4						
C	18.45 ± 0.290	42.74 ± 0.570	0.43 ± 0.003	1.096 ± 0.003	426.92 ± 17.100	95.45 ± 1.240
A 20	19.15 ± 0.480	42.11 ± 0.440	0.46 ± 0.015	1.092 ± 0.004	448.08 ± 17.820	97.19 ± 1.440
A 30	17.83 ± 0.410	41.72 ± 0.530	0.43 ± 0.010	1.092 ± 0.001	455.08 ± 11.040	95.39 ± 0.810
L 35	18.57 ± 0.310	42.81 ± 0.490	0.43 ± 0.010	1.091 ± 0.002	437.58 ± 17.140	96.50 ± 1.050
P value	0.1638	0.4082	0.252	0.5871	0.6321	0.6496
هفته ۶ آزمایش Experimental Week 6						
C	16.74 ± 0.170 ^b	43.97 ± 0.240	0.38 ± 0.005 ^b	1.093 ± 0.002	434.50 ± 5.430	90.71 ± 1.880
A 20	16.71 ± 0.320 ^b	43.28 ± 0.500	0.39 ± 0.004 ^b	1.093 ± 0.001	427.83 ± 11.860	90.07 ± 1.950
A 30	18.22 ± 0.330 ^a	43.89 ± 0.470	0.41 ± 0.010 ^a	1.095 ± 0.001	444.50 ± 7.780	86.71 ± 2.180
L 35	17.74 ± 0.380 ^{ab}	43.03 ± 0.630	0.41 ± 0.008 ^a	1.096 ± 0.002	435.83 ± 13.130	88.20 ± 2.710
P value	0.0313	0.4636	0.016	0.5565	0.7117	0.5803
هفته ۸ آزمایش Experimental Week 8						
C	14.47 ± 0.390	45.30 ± 0.830	0.32 ± 0.010	1.10 ± 0.000	431.25 ± 2.230	76.96 ± 1.510 ^{ab}
A 20	14.95 ± 0.600	45.65 ± 1.040	0.33 ± 0.020	1.10 ± 0.000	421.50 ± 11.870	80.83 ± 0.980 ^a
A 30	15.19 ± 0.650	45.91 ± 0.300	0.33 ± 0.020	1.10 ± 0.000	433.42 ± 5.360	79.14 ± 1.190 ^a
L 35	14.51 ± 0.350	46.42 ± 0.170	0.31 ± 0.010	1.09 ± 0.000	430.42 ± 10.000	72.82 ± 2.670 ^b
P value	0.713	0.7099	0.7727	0.2539	0.7544	0.0329

مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد ($n = 4$) ارائه شده‌اند. ^{a-b} حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ هستند.

C¹ = شاهد (بدون افزودن منبع کاروتنوئیدی)، A20^۲ = جیره حاوی ۲۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از گیاه یونجه در هر تن جیره، A30^۳ = جیره حاوی ۳۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از گیاه یونجه در هر تن جیره، L35^۴ = جیره حاوی ۳۵ گرم لوکانتین به‌عنوان منبع تجاری کاروتنوئید

Values are expressed as mean ± standard error ($n = 4$). ^{a-b} Means in each column with different superscript letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

C¹ = Control (no supplemental carotenoid source). A20² = Diet supplemented with 20 mg/kg alfalfa-derived carotenoid extract. A30³ = Diet supplemented with 30 mg/kg alfalfa-derived carotenoid extract. L35⁴ = Diet supplemented with 35 mg/kg lucantin (commercial carotenoid source)

تیمارهای حاوی رنگدانه طبیعی یونجه شاخص هاو نسبتاً بهتری داشتند. در هفته‌های چهارم و ششم تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. یافته‌های حاصل از این تحقیق با نتایج حاصل از متاآنالیز یانیتاساری و همکاران (Yunitasari et al., 2023) هم‌راستا است؛ که بر اساس بررسی ۴۷ مطالعه انجام شده، گزارش کردند افزودن مکمل طبیعی کاروتنوئیدی به جیره مرغ‌های تخم‌گذار باعث افزایش معنی‌دار واحد هاو به میزان ۰/۲۶ واحد می‌شود.

نتایج مربوط به ارتفاع زرده نشان داد که در هفته دوم آزمایش، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P = 0.9161$). با این حال، روند تغییرات در طول دوره نشان‌دهنده‌ی پاسخ تدریجی زرده به ترکیب‌های متفاوت جیره بود. در هفته ششم، تیمار حاوی عصاره کاروتنوئید یونجه (A_{30}) افزایش معنی‌داری در ارتفاع زرده نسبت به تیمارهای شاهد و A_{20} نشان دادند ($P = 0.0313$). تیمار A_{30} با میانگین ارتفاع $18/22 \pm 0/33$ میلی‌متر، بالاترین مقدار را به خود اختصاص داد. در هفته هشتم نیز، با وجود کاهش کلی ارتفاع زرده در تمام تیمارها، تیمار A_{30} همچنان در بالاترین سطح باقی ماند ($15/19 \pm 0/65$ mm). افزایش ارتفاع زرده در تیمارهای حاوی کاروتنوئید ممکن است به نقش محافظتی این ترکیبات در برابر اکسیداسیون لیپیدهای زرده مرتبط باشد (Jang et al., 2014; Yunitasari et al., 2023) که به حفظ ساختار فیزیکی آن کمک می‌کند. همچنین، احتمال دارد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره یونجه موجب بهبود انتقال مواد مغذی به زرده و حفظ ساختار میکرونی آن شده باشند. افزایش نرخ تولید تخم‌مرغ با بهبود وضعیت اکسیداتیو در مرغ‌های تغذیه‌شده با کانتاکساتین گزارش شده است (Chen et al., 2025).

شاخص زرده که نمایانگر نسبت ارتفاع به قطر زرده است و کیفیت داخلی آن را مشخص می‌کند، در دو هفته ابتدایی تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد ($P > 0.2$). با این حال، در هفته ششم، تیمارهای حاوی ۳۰ گرم عصاره یونجه و ۳۵ گرم لوکانتین به‌طور معنی‌داری مقادیر بالاتری نسبت به دو تیمار دیگر داشتند ($P = 0.016$). این نتیجه نشان می‌دهد که هر دو نوع کاروتنوئید (طبیعی و تجاری) می‌توانند در بهبود قوام زرده موثر باشند، اما تیمار A_{30} که از عصاره‌ی طبیعی یونجه استفاده کرده بود، بالاترین شاخص زرده را نشان داد. در هفته هشتم، علی‌رغم ثبات نسبی مقادیر، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، اما روند حفظ شاخص در تیمارهای کاروتنوئیدی ادامه داشت. این یافته‌ها با نتایج شفچنکو و همکاران (Shevchenko et al., 2021) همسو است؛ آن‌ها گزارش کردند که استفاده از رنگدانه‌های طبیعی مانند لیکوپن و آستاگزانتین، با وجود ایجاد تغییرات جزئی در متابولیت‌های سرمی، موجب افزایش محتوای کاروتنوئید زرده و تقویت رنگ آن بدون اثرات نامطلوب فیزیولوژیک می‌شود.

ترکیبات موجود در عصاره‌ی یونجه مانند لوتئین و زی‌زانتین ممکن است نقش کلیدی در حفظ کیفیت فیزیکی زرده ایفا کنند. مکانیسم اثر این ترکیبات ممکن است شامل تثبیت ساختار میکرونی زرده، کاهش اکسیداسیون لیپیدها و افزایش قوام غشای زرده باشد. در جیره‌های مبتنی بر سورگوم، جایگزینی رنگدانه‌های سنتتیک با منابع طبیعی، گزینه‌ای پایدارتر و سازگارتر با سلامت محصول نهایی تلقی شده است (Chaves et al., 2022). افزایش شاخص زرده در تیمارهای حاوی کاروتنوئید، با یافته‌های کوجیما و همکاران (Kojima et al., 2022) که افزایش شاخص زرده و فعالیت ضد اکسیدانی (مهار اکسیژن سینگلت^۱) در زرده در اثر مکمل‌های کاروتنوئیدی را نشان دادند، هم‌راستا بود. همچنین یافته‌های ما مبنی بر افزایش شاخص زرده تحت تأثیر کاروتنوئید یونجه با نتایج انگلمااروا و همکاران (Englmaierová et al., 2013) هم‌راستا هستند، جایی که بیان شده استفاده از لوتئین طبیعی، پایداری زرده و شاخص زرده را بهبود می‌بخشد.

^۱singlet oxygen quenching

در طول دوره آزمایشی، ضخامت پوسته در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0.05$). بنابراین، مصرف سطوح مختلف کاروتنوئید منجر به تغییر قابل استناد در این صفت نشد. وزن مخصوص هم که به عنوان شاخصی از کیفیت داخلی و نسبت آب به ماده خشک تخم مرغ در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه، در طول هفته‌های مختلف به صورت معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای غذایی قرار نگرفت ($P>0.25$). در طی بررسی‌های به عمل آمده در این آزمایش، میانگین قطر زرده در تمامی تیمارها روند افزایشی نشان داد که بیانگر تاثیر سن و بلوغ تدریجی دستگاه تولیدمثلی طیور تخم‌گذار است (Johnson, 2015)، اگرچه اختلاف آماری معناداری بین تیمارها مشاهده نشد ($P>0.05$).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از منابع کاروتنوئیدی، به‌ویژه عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از یونجه، می‌تواند کیفیت داخلی تخم مرغ را در مرغ‌های تخم‌گذار بهبود بخشد. در این تحقیق، افزایش معنی‌دار ارتفاع زرده و شاخص زرده در تیمارهای حاوی سطوح بالاتر کاروتنوئید در مقایسه با گروه شاهد ($P<0.05$)، بیانگر ارتقای ساختار زرده و بهبود خصوصیات فیزیکی آن بود؛ موضوعی که اهمیت زیادی در پذیرش محصول از سوی مصرف‌کننده دارد. از سوی دیگر، کاهش معنی‌دار مالون‌دی‌آلدئید در تیمارهای دریافت‌کننده کاروتنوئید ($P<0.05$) در سطح ۳۰ گرم در تن خوراک نشان داد که این ترکیبات با کاهش تنش اکسیداتیو، موجب تقویت وضعیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شوند و در نتیجه می‌توانند با حفظ تعادل اکسایش-کاهش^{۲۲} در بدن پرنده، سلامت فیزیولوژیک آن را تحت تاثیر مثبت قرار دهند.

بر این اساس، افزودن کاروتنوئیدهای طبیعی مشتق از منابع گیاهی همچون یونجه می‌تواند به عنوان یک راهکار تغذیه‌ای مؤثر توصیه شود. با توجه به بهبود شاخص‌های کیفی زرده (افزایش ارتفاع، شاخص و رنگ زرده) و کاهش مالون‌دی‌آلدئید در تیمار دریافت‌کننده رنگدانه طبیعی یونجه، به‌کارگیری سطح ۳۰ میلی‌گرم رنگدانه طبیعی در هر کیلوگرم جیره (معادل ۳۰ گرم در هر تن خوراک) در شرایط پرورش تجاری مرغ‌های تخم‌گذار قابل توصیه است. استفاده از این سطح رنگدانه علاوه بر حفظ سلامت اکسیداتیو تخم مرغ، موجب بهبود رنگ و جذابیت ظاهری زرده و افزایش پذیرش مصرف‌کننده می‌گردد. با این حال، به منظور دستیابی به نتایج نهایی و تعیین دوز بهینه مصرف، انجام مطالعات گسترده‌تر با سطوح مکملی بیشتر، دوره‌های نگهداری طولانی‌تر و بررسی شاخص‌های مولکولی، بافتی و اقتصادی ضروری به نظر می‌رسد.

References

1. Abdel-Aal, E.-S. M., Akhtar, H., Chambers, J. R., & Khalid, Z. (2017). Lutein and zeaxanthin carotenoids in eggs. In P. Y. Hester (Ed.), *Egg innovations and strategies for improvements* (pp. 199–206). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00019-6>
2. Ahizi, A. E., Ngolube, B. C., Udoye, M. C., Nzeoma, C., Okonkwo, I. J., & Anyikwa, S. O. (2022). Comparative Analysis of Methanol, Acetone, Ethanol and N-hexane Used in the Extraction of Oil from Neem Seeds (Response Surface Methodology). *International Journal of Science and Engineering Investigations*, 11(122). <https://www.researchgate.net/publication/385242407>
3. Akyurek, H., & Okur, A. A. (2009). Effect of storage time, temperature and hen age on egg quality in free-range layer hens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(10), 1953–1958.
4. An, B.-K., Choo, W.-D., Kang, C.-W., Lee, J., & Lee, K.-W. (2019). Effects of dietary lycopene or tomato paste on laying performance and serum lipids in laying hens and on malondialdehyde content in egg yolk upon storage. *Journal of Poultry Science*, 56(1), 52–57. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0170118>
5. Arvayo-Enríquez, H., Mondaca-Fernández, I., Gortáez-Moroyoqui, P., López-Cervantes, J., & Rodríguez-Ramírez, R. (2013). Carotenoids extraction and quantification: A review. *Analytical Methods*, 5(12), 2916–2924. <https://doi.org/10.1039/C3AY26295b>

^{۲۲} Redox balance

6. Bagheri, S., Gilan, A., Nasiri-Moghaddam, H., & Rezghi, J. (2020). Effect of energy density and dietary nutrients on performance and egg quality of post-molt laying hens. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 12(2), 197–209. DOI:10.22067/ijas.v12i2.73162
7. Bédécarrats, G. Y., & Leeson, S. (2006). Dietary lutein influences immune response in laying hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 15(2), 183–189. <https://doi.org/10.1093/japr/15.2.183>
8. Bednarik, P. (2013). Influence of sample processing on the analysis of carotenoids in maize: A comparative study using hexane, ethyl acetate and ethanol. *Molecules*, 17(9), 11255–11270. <https://doi.org/10.3390/molecules170911255>
9. Britton, G. (1995). UV/visible spectroscopy. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids volume 1B: Spectroscopy* (pp. 13–62). Birkhäuser Verlag.
10. Chaves, C.A.R., Miranda, D.A., Geraldo, A., Machado, L.C., Valentim, J.K., & Garcia, R.G. 2022. Natural and synthetic pigments in sorghum-based diets for laying hens. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 44: e53060.
11. Chen, J., Yu, S., Zhang, X., Song, Y., Zhou, X., Xiao, M., Liu, W., and An, L. 2025. Dietary canthaxanthin improves egg production rate through regulating hepatic lipid metabolism and redox status in indigenous chickens. *Frontiers in Veterinary Science*. 12: 1607039. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1607039>
12. Dansou, D. M., Zhang, H., Yu, Y., Wang, H., Tang, C., Zhao, Q., Qin, Y., & Zhang, J. (2023). Carotenoid enrichment in eggs: From biochemistry perspective. *Animal Nutrition*, 14, 315–333. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.05.012>
13. Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains—Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173–289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>
14. Englmaierová, M., Skřivan, M., & Vít, T. (2019). Alfalfa meal as a source of carotenoids in combination with ascorbic acid in the diet of laying hens. *Czech Journal of Animal Science*, 64, 17–25. <https://doi.org/10.17221/116/2018-CJAS>
15. 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. <https://doi.org/10.17221/6941-CJAS>
16. Gao, S., Li, R., Heng, N., Chen, Y., Wang, L., Li, Z., Guo, Y., Sheng, X., Wang, X., Xing, K., Ni, H., & Qi, X. (2020). Effects of dietary supplementation of natural astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* on antioxidant capacity, lipid metabolism, and accumulation in the egg yolk of laying hens. *Poultry Science*, 99(11), 5874–5882. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.029>
17. Grčević, M., Kralik, Z., Kralik, G., & Galović, O. (2019). Effects of dietary marigold extract on lutein content, yolk color and fatty acid profile of omega-3 eggs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2292–2299. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9425>
18. Heiman, V., & Carver, J. S. (1936). The albumen index as a physical measurement of observed egg quality. *Poultry Science*, 15(2), 141–148. <https://doi.org/10.3382/ps.0150141>
19. Heng, N., Gao, S., Chen, Y., Wang, L., Li, Z., Guo, Y., et al. (2021). Effects of dietary supplementation with astaxanthin-rich *Phaffia rhodozyma* on antioxidant enzyme activity, free radical scavenging ability, and gene expression of antioxidant enzymes in laying hens. *Poultry Science*, 100(5), 101045. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101045>
20. Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2017). First line defence antioxidants – superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
21. 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(1), 58–65. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0130017>
22. Jiang, Y., Ye, J., Hu, Y., Zhang, J., Li, W., Zhou, X., Yu, M., Yu, Y., Yang, J., Yang, W., Jiang, J., Cui, J., & Hu, Y. (2024). Extraction and synthesis of typical carotenoids: Lycopene, β -carotene, and astaxanthin. *Molecules*, 29(19), Article 4549. <https://doi.org/10.3390/molecules29194549>
23. Johnson, A. L. (2015). Reproduction in the female. In G. C. Whittow (Ed.), *Sturkie's Avian Physiology* (6th ed., pp. 635–665). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407160-5.00028-2>
24. Jones, D. R., & Musgrove, M. T. (2005). Effects of extended storage on egg quality factors. *Poultry Science*, 84(11), 1774–1777. <https://doi.org/10.1093/ps/84.11.1774>
25. 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. <https://doi.org/10.1080/00071660600962976>

26. King, J. E., & Wang, S.-Y. (2004). Isolation of lutein from alfalfa via saponification with 40% KOH. WO2004080933A2 (Patent).
27. Kojima, S., Koizumi, S., Kawami, Y., Shigeta, Y., & Osawa, A. (2022). Effect of dietary carotenoid on egg yolk color and singlet oxygen quenching activity of laying hens. *The Journal of Poultry Science*, 59(2), 137–142. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0210032>
28. Laudadio, V., Ceci, E., Lastella, N. M. B., Introna, M., & Tufarelli, V. (2014). Low-fiber alfalfa (*Medicago sativa* L.) meal in the laying hen diet: Effects on productive traits and egg quality. *Poultry Science*, 93(7), 1868–1874. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03831>
29. Lee, S. S., Lin, Y. C., Chen, W. C., Wang, S. H., Xia, W. G., & Hu, Y. C. (2014). Effects of dietary lutein sources on lutein-enriched egg production and hepatic antioxidant system in laying hens. *Journal of Poultry Science*, 51(1), 17–23. <https://doi.org/10.2141/jpsa.51.0130017>
30. Nabi, F., Arain, M.A., Rajput, N., Alagawany, M., Soomro, J., Umer, M., Soomro, F., Wang, Z., Ye, R., and Liu, J. 2020. Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry: A review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 104(5): 1809–1818. <https://doi.org/10.1111/jpn.13375>
31. Nimalaratne, C., & Wu, J. (2015). Hen egg as an antioxidant food commodity: A review. *Nutrients*, 7(10), 8274–8293. <https://doi.org/10.3390/nu7105394>
32. Reda, R., El-Saadony, M. T., Abd El-Hack, M. E., et al. (2025). Dietary *Dunaliella salina* microalgae enriches eggs with carotenoids and long-chain omega-3 fatty acids, enhancing the antioxidant and immune responses in heat-stressed laying hens. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1545433. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1545433>
33. Rodríguez-Amaya, D. B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI Press.
34. Rodríguez-Amaya, D. B., & Kimura, M. (2004). Using UV–Vis spectrophotometry for β -carotene determination. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*.
35. Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
36. Saleh, A.A., Gawish, E., Mahmoud, S.F., Amber, K., Awad, W., Alzawqari, M.H., Shukry, M., and Abdel-Moneim, A.E. 2021. Effect of natural and chemical colorant supplementation on performance, egg-quality characteristics, yolk fatty-acid profile, and blood constituents in laying hens. *Sustainability*. 13: 4503. <https://doi.org/10.3390/su13084503>
37. SAS Institute Inc. (2013). SAS/STAT® 9.4 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
38. Shahidan, N., Noriham, A., & Nooraziah, A. A. (2017). The effect of time, temperature and solid to solvent ratio on pumpkin carotenoids extracted using food grade solvents. *Sains Malaysiana*, 46(2), 231–237. <https://doi.org/10.17576/jsm-2017-4602-07>
39. Shaver. (2020). Shaver White Commercial Management Guide. Hendrix Genetics, Boxmeer, The Netherlands. Available at: <https://www.hendrix-genetics.com>.
40. Shevchenko, L.V., Iakubchak, O.M., Davydovych, V.A., Honchar, V.V., Ciorga, M., Hartung, J., and Kolacz, R. 2021. Influence of lycopene and astaxanthin in feed on metabolic parameters of laying hens, yolk color of eggs and their content of carotenoids and vitamin A when stored under refrigerated conditions. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 24(4): 525–535. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2021.139977>
41. Silversides, F. G., & Scott, T. A. (2000). Effect of storage and strain of hen on egg quality. *Poultry Science*, 79(12), 1725–1729. <https://doi.org/10.1093/ps/79.12.1725>
42. Surai, P. F., Fisinin, V. I., & Karadas, F. (2020). Antioxidant systems in poultry biology: Superoxide dismutase activity in poultry biology. *Antioxidants*, 8(7), 235. <https://doi.org/10.3390/antiox8070235>
43. Vidal, T.F., Pereira, A.L.F., Abreu, V.K.G., Freitas, E.R., Sousa Neto, M.A., & Zapata, J.F.F. 2013. Egg quality and yolk lipid composition of laying hens fed diets containing cashew nut meal. *Food Science and Technology*, 33(1): 172–179. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013005000006>
44. Yang, C., Zhang, L., and Tsao, R. (2020). Chemistry and biochemistry of dietary carotenoids: bioaccessibility, bioavailability and bioactivities. *J. Food Bioact.* 000: 000–000. <http://DOI: 10.31665/JFB.20xx.000xx>
45. Yunitasari, F., Jayanegara, A., & Ulupi, N. (2023). Performance, egg quality, and immunity of laying hens due to natural carotenoid supplementation: A meta-analysis. *Food Science of Animal Resources*, 43(2), 282–304. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e76>
46. Zaheer, K. (2017). Hen egg carotenoids (lutein and zeaxanthin) and nutritional impacts on human health: A review. *CyTA - Journal of Food*, 15(3), 474–487. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1266033>
47. Zheng, M., Mao, P., Tian, X., Guo, Q., & Meng, L. (2019). Effects of dietary supplementation of alfalfa meal on growth performance, carcass characteristics, meat and egg quality, and intestinal microbiota in Beijing-you chicken. *Poultry Science*, 98(5), 2250–2259. <https://doi.org/10.3382/ps/pey550>

48. Zhang, J., Mao, Z., Zheng, J., Sun, C., & Xu, G. (2024). The effects of different doses of canthaxanthin in the diet of laying hens on egg quality, physical characteristics, metabolic mechanism, and offspring health. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 7154. <https://doi.org/10.3390/ijms25137154>