نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۳۶، پاییز ۱۳۹۹
ص‌ص: ۲۷~۳۶

بررسی تأثیرات سطوح مختلف ویتامین D3بر کیفیت تخم‌مرغ و میزان کوله کلسیفرول زرده و فراسنجه‌های بیوشیمیایی

- **مهزاد ایراندوست** (نویسنده مسئول)
کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
- **هاشم نیری**
استادیار ، گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
- **حسین ایراندوست**
استادیار پژوهشی بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان ایران

تاریخ دریافت : فروردین ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۳۹۹
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۳۱۳۴۴۷۰۹۵۰
Email: mahzad2016.iran@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/aasrj.2020.342599.1198

چکیده:

هدف از این مطالعه بررسی تأثیرسطوح مختلف ویتامین D_3 بر عملکرد تولیدی مرغ تخم‌گذار و کیفیت زرده و همچنین سطح کوله کلسیفرول زرده تخم‌مرغ توسط تکنیک HPLC بود؛ همچنین در این مطالعه، میزان فعالیت آنزیم‌های مرغ تخم‌گذار از جمله پاراکسوناز، آریل استراز و میزان غلظت مالون دی‌آلدئید با روش اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. در این آزمایش از ۱۸۰ عدد مرغ تخم‌گذار سویه شیور با طول عمر ٦٦ تا ٦٩ هفته‌ای در قالب یک طرح کاملا تصادفی با ۳ تیمار، ۵ تکرار و ۱۲ مرغ در تکرار به مدت ٤ هفته استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل رژیم غذایی پایه با مقادیر ۳۳۰۰، ۱٦۵۰۰ و ۳۳۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D_3 به ازای هر کیلوگرم خوراک بود. برای بررسی نتایج از روش آزمون آماری دانکن استفاده شد. نتایج نشان دادکه هیچ یک از شاخص‌های عملکرد تولید، تفاوت معناداری با گروه شاهد نداشتند. نتایج صفات کیفی تخم‌مرغ نشان دادکه کیفیت تخم مرغ، زرده تخم‌مرغ، درصد استحکام پوسته تحت تأثیر تیمارهای رژیم غذایی نبود، اما بالاترین غلظت مکمل ویتامین D_3 باعث بهبود سلامتی پوسته شد و در مقایسه با گروه شاهد معنادار بود ($p<۰/۰۵$). همچنین میزان کوله کلسیفرول زرده تخم‌مرغ نسبت به گروه شاهد به طور معناداری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). در فعالیت آنزیم‌های پاراکسوناز و آریل استراز تغییرات معناداری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد و تفاوت معناداری در غلظت مالون دی‌آلدئید سرم نیز نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: کوله کلسیفرول، زرده تخم مرغ، پاراکسوناز، آریل‌استراز، مالون‌دی‌آلدئید

Applied Animal Science Research Journal No 36 pp: 27-36

Investigating the Effects of Different Levels of Vitamin D3 on Egg Quality and the Amount of Yolk Cholecalcifrol and Biochemical Parameters

1*- Mahzad Irandoust, M.Sc, Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2- Hashem Nayeri, Assistant Professor, Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3- Hossein Irandoust, Assistant Professor of Animal Science Research, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Training Center, Research Organization, Agricultural education and promotion, Isfahan, Iran.

The aim of this study was to investigate the effect of different levels of vitamin D_3 on egg production and egg quality, as well as the level of egg yolk cholecalcipherol by HPLC technique. The spectrophotometer was measured. In this experiment, 180 laying hens with a lifespan of 66 to 69 weeks were used in a completely randomized design with 3 treatments, 5 repetitions and 12 hens in repetition for 4 weeks. The experimental treatments included a basic diet with 3300, 16500 and 33000 international units of vitamin D_3 per kilogram of feed. The Duncan statistical test method was used to evaluate the results. The results showed that none of the production performance indicators differed significantly from the control group. The results of egg quality attributes showed that egg quality, egg yolk percentage and shell strength were not affected by dietary parameters, but the highest concentration of vitamin D_3 supplementation improved shell health and was significant compared to the control group ($P < 0.05$). Also, the amount of egg yolk cholecalcipherol increased significantly compared to the control group ($P < 0.05$). No significant changes were observed in the activity of paraoxonase and arylstrase enzymes compared to the control group and no significant difference was observed in the concentration of malondialdehyde serum compared to the control group.

Key words: Cholecalcifrol, Egg yolk, Paraoxonase, arile esterase, Malondialdehyde

مقدمه

طبق اطلاعات سازمان سلامت جهانی ارتباط مثبتی بین میزان کوله کلسیفرول بدن و جلوگیری از پوکی استخوان وجود دارد (Bischoff-Ferrari et al., 2004). تولید تخم‌مرغ با کیفیت یکی از موضوعات مهم در صنعت تولید تخم‌مرغ است. دو ماده مغذی اصلی که اندازه تخم‌مرغ و ضخامت پوسته تخم‌مرغ را کنترل می‌کنند، ویتامین D_3 و کلسیم هستند و توجه ناکافی به مقادیر کلسیم و ویتامینD_3 باعث کاهش کیفیت پوسته شده و خسارات زیادی به همراه دارد. طیور میزان مصرف خوراک خود را بر اساس انرژی تنظیم می‌کنند. هر گونه تغییر در مصرف انرژی می‌تواند بر جذب خوراکی، عملکرد و هزینه خوراک تأثیر بگذارد (Nascimento et al., 2014). ویتامین D گروهی از پیش‌سازهای هورمونی محلول در چربی است. در کل دو شکل مهم ویتامین به نام‌های ارگوکلسیفرول و ویتامین D_3 (کوله کلسیفرول) وجود دارد. منابع غذایی این ویتامین شامل ماهی سالمون و ساردین، روغن کبد ماهی، زرده تخم‌مرغ (به میزان کمتری) و لبنیات است. پوست تخم‌مرغ حاوی سه گرم کلسیم است (Irandoust et al .,2020) بنابراین رژیم غذایی مرغ باید مقادیرکافی کلسیم داشته باشد تا به طور مؤثر استفاده شود. شواهد متناقضی در مورد استفاده از منابع ذره‌ای کلسیم وجود دارد. اما طبق گفته اکثر متخصصان تغذیه، ۵۰ تا ۷۰ درصد کلسیم باید به شکل متراکم باشد (قطر دو تا پنج میلیمتر) و مابقی باید به شکل پودر باشد. ویتامین‌هایی مانند ویتامین D برای متابولیسم کلسیم مورد نیازهستند و باید در رژیم غذایی مورد توجه قرارگیرند. عوامل زیادی می‌توانند بر نیاز مرغ به ویتامین D_3 تأثیر بگذارند. بسیاری ازگزارش‌ها نشان می‌دهدکه ۱۱ تا ۴۵ دقیقه در روز قرارگرفتن در معرض آفتاب برای جلوگیری ازپوکی استخوان در مرغ درحال رشدکافی است

(Browning and coweison., 2013). یک مطالعه توسط ژائو در سال ۲۰۱۱ به مدت ۴۰ روز انجام شد و مرغ‌های تخم‌گذار در معرض رژیم غذایی سرشار ازکوله کلسیفرول قرارداده شدند و مشاهده شد که سطح ویتامین D_3 در زرده تخم‌مرغ مرغ‌هایی که در معرض آفتاب قرار گرفته بودند به طور قابل توجهی افزایش پیدا کرده است (Zhao et al., 2011).

ازآنجا که در ایران هیچ مطالعه ای در مورد میزان کوله کسیفرول در رژیم غذایی مرغ‌تخم‌گذار انجام نشده است، بنابراین هدف از این مطالعه، ارزیابی سطوح مختلف کوله کلسیفرول در رژیم غذایی بر عملکرد تولیدی مرغ تخم‌گذار و ویژگی‌های کیفی تخم‌مرغ بود. در این تحقیق برای اولین بار در ایران، میزان کوله کلسیفرول زرده تخم‌مرغ با روش HPLC اندازه‌گیری شد همچنین طبق تحقیقاتی که صورت گرفت همبستگی مثبتی بین فاکتورهای آنتی اکسیدانی و میزان ویتامین D_3 مشاهده گردید (Saedisomeolia., 2013). در این تحقیق تأثیر رژیم‌غذایی با سطوح مختلفی ازکوله کلسیفرول برفعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی مرغ از جمله پاراکسوناز و آریل‌استراز و غلظت فاکتور مالون دی‌آلدئید در سرم خون بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در یک مرغداری در نزدیکی روستای قارنه از توابع شهرستان جرقویه واقع در استان اصفهان انجام شد. مدت زمان آزمون ۴ هفته بود (در سنین ۶۶ تا ۶۹ هفته). مرغ‌های تخم‌گذار در سن ۶۶ هفته به اتاق آزمایش منتقل شدند و سپس مرغ‌ها جیره‌های آزمایشی مربوطه را به مدت ۱ هفته (سن ۶۵ هفتگی) جهت عادت‌پذیری دریافت نمودند و پس از یک دوره تنظیم و سازگاری با محیط جدید، این آزمایش در سن ۶۹ هفتگی به پایان رسید (Yao et al., 2013). جیره‌های آزمایشی با ۳ سطح ۳۳۰۰، ۱۶۵۰۰ و ۳۳۰۰۰ واحد بین‌المللی مکمل ویتامین D_3 به ازای هرکیلوگرم خوراک بر طبق راهنمای پرورش این سویه مرغ، با مقدار دوز پایه ۳۳۰۰ واحد بین‌الملل ویتامین D_3، تهیه شد (Commercial Product Guide-Shaver White., 2018). مرغ‌ها به آب و غذا اختیاری دسترسی داشتند و برنامه نوردهی در طول آزمایش ۱۶ ساعت از نور راشامل می‌شد. جیره‌های آزمایشی از نظر ترکیب و مواد مغذی یکسان بودند و تنها مقدار ویتامین D_3 در آن‌ها متفاوت بود (جدول ۱)

جدول۱- ترکیب اجزاء تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره آزمایشی پایه

اجزاء متشکله	مقدار (درصد)
ذرت	۵۵
کنجاله سویا	۱۱
کنجاله کلزا	۶
پودر گوشت	۵
سبوس گندم	۱۰
کربنات کلسیم گرانوله	۴/۵
صدف معدنی	۶/۴۳
روغن سویا	۰/۸
مکمل ویتامینی[۱]	۰/۲۵
مکمل معدنی[۲]	۰/۲۵

نمک	۰/۲۷
دی کلسیم فسفات	۰/۳
کولین	۰/۱
دی ال- متیونین	۰/۰۵
سولفات سدیم	۰/۰۵
مواد مغذی محاسبه شده	
انرژی قابل سوخت و ساز (کیلو کالری در کیلوگرم)	۲۵۵۵
پروتئین خام (درصد)	۱۶/۲۸
کلسیم (درصد)	۴/۷۳
فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/۳۹
متیونین + سیستئین (درصد)	۰/۵۷
لیزین (درصد)	۰/۸۱

۱- هر ۲/۵ کیلوگرم مکمل ویتامینی حاوی ۱۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۳۳۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D_3، ۲۰۰۰۰ میلی گرم ویتامین E، ۳۰۰۰ میلی گرم ویتامین K_3، ۲۲۰۰ میلی گرم B_1، ۶۵۰۰ میلی گرم B_2، ۱۰۰۰۰میلی گرم B_5، ۴۰۰۰۰میلی گرم نیاسین، ۱۰۰۰ میلی گرمB_9، ۲۰ میلی گرم B_{12}، ۲۰۰ میلی گرم بیوتین ، ۲۰۰۰۰۰ میلی گرم کولین و ۲۵۰۰ میلی گرم آنتی اکسیدان بود.

۲- هر ۲/۵ کیلوگرم مکمل معدنی حاوی: ۷۰۰۰۰ میلی گرم منگنز، ۷۰۰۰۰ میلی گرم روی، ۶۰۰۰۰ میلی گرم آهن ،۸۰۰۰ میلی گرم مس، ۱۰۰۰ میلی گرم ید و ۲۵۰ میلی گرم سلنیوم و ۲۰۰۰۰۰ میلی گرم کولین بود.

در این تحقیق ۱۸۰ مرغ تخم‌گذار سویه ی شیور با سن ۶۶ هفته و وزن بدن ۱۴ ± ۱۶۸۷ گرم در سالنی با شرایط محیطی کنترل شده قرار داده شدند و به طور تصادفی در ۴۵ قفس (۵۰×۵۰×۴۵ cm)، به گروه‌های ۴ قطعه‌ای تقسیم شدند و قفس ها به طور تصادفی به ۳ تیمار غذایی اختصاص داده شدند (هر تیمار دارای ۵ تکرار و هر تکرار شامل ۳ قفس با ۴ قطعه مرغ بود- در کل ۵ قفس برای هر تیمار که در هر قفس، ۳ گروه ۴ تایی موجود بود به هر تیمار اختصاص داده شد. در طول دوره‌ی آزمایش،آب و خوراک آزادانه در اختیار مرغ ها قرار گرفته شد و از برنامه ی نوری پیوسته ۱۶ ساعت روشنایی در شبانه روز و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۳±۲۱ درجه سانتی‌گراد ثابت استفاده می‌شد.

در ابتدای آزمایش، مرغ‌های موجود در هر قفس به صورت انفرادی توزین و میانگین وزن بدن مرغ‌های هر تکرار از تقسیم مجموع وزن مرغ‌های هر ۳ قفس بر تعداد آن‌ها (۱۲ قطعه) بدست آمد. در پایان آزمایش نیزهمین کار تکرارشد و به عنوان وزن بدن پایان دوره آزمایش گزارش گردید. خوراک‌های آزمایشی به صورت هفتگی تهیه و پس از توزین در سطل‌های درب‌دار کددار نگهداری می‌شد و روزانه در دو نوبت صبح و عصر در اختیار مرغ‌ها قرار می‌گرفت. مصرف خوراک هفتگی هر تکرار از تفاضل کل خوراک داده شده و مقدار دان باقیمانده در کف دان-خوری در انتهای هفته اندازه‌گیری شد. میانگین مصرف خوراک روزانه هر مرغ از تقسیم کل خوراک مصرفی هفتگی ۳ قفس بر تعداد مرغ موجود در طول هفته محاسبه گردید. تعداد تخم‌مرغ-های تولید شده روزانه هر تکرار (شامل تخم‌مرغ سالم، شکسته و لمبه) آماربرداری شد و درصد تولید تخم مرغ از تقسیم تعداد کل تخم‌مرغ تولید شده در یک فاصله زمانی مشخص (هفته) بر تعداد مرغ موجود در آن دوره زمانی به صورت درصد محاسبه شد. وزن تخم‌مرغ با توزین تخم‌مرغ‌های تولید شده در ۲ روزپایانی هر هفته (۴ مرتبه در هر دوره) با استفاده از ترازوی دیجیتالی بادقت ۱ گرم اندازه‌گیری شد. میانگین وزن تخم‌مرغ در هر تکرار از تقسیم مجموع وزن تخم‌مرغ‌های تولید شده طی ۲ روز آخر هر هفته بر تعداد آن‌ها بدست آمد و میانگین این اوزان برای تجزیه‌های

آماری بعدی استفاده شد. میانگین وزن توده تخم‌مرغ از حاصل ضرب میانگین وزن تخم‌مرغ در درصد تولید تخم‌مرغ در هر هفته یا هر مرحله آزمایش محاسبه شد. ضریب تبدیل خوراک از تقسیم میانگین خوراک مصرفی روزانه به میانگین وزن توده تخم‌مرغ تولید شده هر مرغ محاسبه شد و مقدارآن به صورت کیلوگرم خوراک مصرف شده به ازای هر کیلوگرم تخم‌مرغ تولید شده گزارش گردید. تلفات به صورت روزانه شمارش، ثبت و حذف می‌گردید. در دو هفته اول عادت‌پذیری تلفات هر تکرار جایگزین گردید ولی بعد از شروع آزمایش، تلفات احتمالی قابل گزارش بود.

ویژگی¬های کیفی تخم‌مرغ طی دو نوبت و در پایان آزمایش (هفته¬های۲ و ۴ پس از شروع آزمایش) انجام شد ولی میانگین کل دوره‌های آزمایشی گزارش گردید. در هر مرحله، از هر تکرار ۶ تخم مرغ سالم به طور تصادفی انتخاب و با ثبت شماره هر تکرار بر روی آن¬ها، برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

در ابتدا، میانگین وزن تخم‌مرغ¬ها با استفاده از ترازوی دقیق سارتریوس با دقت ۰/۰۱ گرم توزین گردید. پس از شکستن تخم مرغ، ابتدا وزن زرده اندازه¬گیری شد. پس از خارج کردن محتویات تخم‌مرغ و تمیز کردن پوسته ، به مدت ۴۸ ساعت در هوای اتاق قرار داه شد تا خشک شود و پس از آن، وزن پوسته اندازه‌گیری گردید. وزن سفیده از تفاضل وزن تخم مرغ و مجموع وزن زرده و پوسته به دست آمد. در پایان، اوزان بدست آمده برای زرده، سفیده و پوسته به وزن تخم مرغ مربوطه تقسیم و به صورت درصدی از وزن تخم‌مرغ اولیه برای تجزیه آماری داده¬های مربوطه استفاده شد.

هر تخم مرغ به صورت افقی در محل مربوطه دستگاه اندازه¬گیری استحکام تخم مرغ قرار گرفت و به تدریج نیروی فشاری از بالا به پایین روی محیط کوچک تخم‌مرغ وارد شد تا تخم‌مرغ شکسته شود. میزان نیروی وارده جهت شکسته شدن پوسته تخم‌مرغ بر حسب کیلوگرم بر سانتی متر مربع اندازه¬گیری و ثبت گردید.

پس از شکستن هر تخم‌مرغ و خشک شدن آن¬ها، از سه ناحیه (دو انتها و وسط) پوسته تخم مرغ نمونه-گیری انجام شد و ضخامت هر نمونه از پوسته با استفاده از میکرومتر اندازه¬گیری شد. میانگین اعداد ضخامت این سه ناحیه به عنوان ضخامت پوسته تخم‌مرغ محاسبه و بر حسب میلی¬متر گزارش شد.

تخم‌مرغ¬ها به صورت انفرادی توزین شدند و حجم آن¬ها با استفاده از یک استوانه¬ی مدرج حاوی آب اندازه¬گیری شد و وزن مخصوص از تقسیم وزن به حجم تخم‌مرغ به دست آمد.

اندازه گیری کیفیت داخلی تخم‌مرغ بر اساس روش هاو صورت گرفت. متداولترین روش اندازه گیری کیفیت سفیده تخم مرغ واحد هاو می باشد که اولین بار توسط ریموندهاو ارائه گردیده است. ابتدا کلیه تخم مرغ‌ها با ترازوی حساس و دقیق وزن کشی و سپس با استفاده از دستگاه ارتفاع سنج، ضخامت سفیده غلیظ انداه گیری گردید. سپس با استفاده از فرمول واحد هاو محاسبه شد.

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

H: ارتفاع سفیده غلیظ

W: وزن تخم مرغ بر حسب گرم

ارتفاع و قطر زرده با استفاده از دستگاه کولیس بر حسب میلی متر اندازه¬گیری شد. شاخص زرده از تقسیم نسبت ارتفاع به قطر محاسبه گردید.

سنجش میزان کوله کلسیفرول

برای سنجش میزان کوله کلسیفرول زرده ابتدا به صورت تصادفی از هر تکرار ۶ عدد تخم‌مرغ انتخاب شد و زرده‌ها جدا شده و با همدیگر مخلوط شدند و سپس برای انجام آزمایش تکنیک HPLC مورد استفاده قرار گرفت. مقدار کوله کلسیفرول زرده توسط HPLC و استفاده از روش۱۳۵۷۹ دستورالعمل ISIRI که یک روش استاندارد بین‌الملل جهت انجام تکنیک HPLC انجام می‌شود تعیین شد. به طور خلاصه،۵۰ میلی‌گرم زرده، ۶ میلی‌لیتر اتانول، ۰/۵ میکروگرم استاندارد داخلی (۰/۵ میکروگرم ویتامین D_2 در میلی‌لیتر محلول اتانول) و ۵ میکرولیتر اسید اسکوربیک به عنوان آنتی‌اکسیدان (۱/۶ میلی گرم در میلی‌لیترآب) در یک لوله‌ی ۵۰ میلی لیتری ریخته شد و به مدت ۳۰ ثانیه در سرعت بالا همگن (هموژن) شد. مخلوط حاصله در g ۱۲۰۰ به

مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سوپرناتانت جمع‌آوری شد. پلت حاصله مجدد در ۴ میلی‌لیتر اتانول همگن شد و سانتریفوژ شد. سوپرناتانت تحت نیتروژن ۶۰ °C تبخیر شد. نمونه‌ی خشک در ۲ میلی‌لیتر متانول حل و ورتکس شد و در ۱۲۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس لایه شفاف رویی جمع‌آوری شد. فاز متحرک شامل متانول و آب (۹۸:۲) با سرعت ۱ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه در دستگاه HPLCبا ستون C_{18}و دتکتور UV با طول موج ۲۶۵ نانومتر تزریق و آنالیز انجام شد (Hamilton.,. 1980)

اندازه گیری فراسنجه‌های بیوشیمیایی

فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون از جمله مالون‌دی‌آلدئید، پاراکسوناز و آریل استراز نیز در این تحقیق اندازه گیری شد به این صورت که در روزهای پایانی آزمایش، از هرتکرار (قفس) دو قطعه مرغ به صورت تصادفی انتخاب و نمونه های خون با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری از ورید بال تهیه گردید. در آزمایشگاه، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گشته، تا سرم ها جدا شدند. سپس میزان فعالیت آنزیم-های پاراکسوناز و آریل‌استراز و همچنین مقدار مالون‌دی‌آلدئید سرم توسط دستگاه اسپکتروفتومتر شیمادزو UV2600 مدل TCC240A اندازه‌گیری شد و میانگین اعداد هر ۲ مرغ به عنوان یک داده برای هر تکرار آزمایشی تجزیه آماری شد (Khan et al., 2012).

فعالیت پاراکسوناز با استفاده از یک سوبسترای سینتیک مورد سنجش قرار گرفت. از سوبسترای پاراکسون (دی اتیل پارا نیتروفنیل فسفات)، برای تعیین فعالیت PON-1 نسبت به پاراکسون استفاده شد. اندازه‌گیری میزان هیدرولیز سوبسترای اولیه نسبت به P-nitrophenol، با اندازه‌گیری میزان جذب در ۴۱۲ نانومتر در مخلوط سنجش ۷۰۰ میکرولیتر که حاوی ۲ میلی‌مول پاراکسون ، ۲ میلی مول$CaCl_2$ در ۱۰۰ میلی‌مولار بافر Tris-HCL با(pH= 8) با ۲۰۰ میکرولیتر از سرم مرغ انجام شد. نمونه بلانک حاوی مخلوط انکوبه شده بدون سرم و به طور همزمان برای اصلاح شکستن خود به خودی سوبسترا استفاده شد. فعالیت آنزیم آریل استراز نسبت به فنیل استات با اندازه گیری میزان اولیه هیدرولیز سوبسترا در مخلوط آزمایشی (۳ میلی لیتر) حاوی ۲ میلی‌مولار سوبسترا، ۲ میلی مولار $CaCl_2$ و ۲۰۰ میکرولیتر سرم در ۱۰۰ میلی مولار بافرTris-HCL با (pH=8)، جذب به مدت ۲ دقیقه در ۲۷۰ نانومتر بررسی شد(Khan et al ., 2012).

روش آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی، با ۳ تیمار و ۵ تکرار و ۱۲ مرغ در تکرار به مدت ۴ هفته انجام شد. تعداد ۱۸۰ قطعه مرغ تخمگذار به ۳ تیمار غذایی اختصاص داده شدند به طوری که هر تکرار شامل ۳ قفس حاوی ۱۲ قطعه مرغ تخمگذار (مجموعا ۶۰ مرغ در هر تکرار) بود.برای تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی تأثیر تیمارها بر صفات مختلف از نسخه ۲۲ نرم افزار آماری SPSS استفاده شد.ازآزمون آنالیز واریانس یک طرفه در جهت مقایسه بین گروه‌ها و از آزمون چند دامنه ای دانکن برای مقایسه جفت میانگین‌ها استفاده گردید.

نتایج

مطابق جدول ۲، ویتامین D_3 تأثیر معنی‌داری در میزان مصرف خوراک مرغ‌های‌تخم‌گذار نداشته و تفاوت معنی‌داری بین وزن اولیه و وزن ثانویه مرغ‌های‌تخم‌گذار وجود نداشت. درصد تولید تخم‌مرغ در گروه شاهد و گروه‌های تحت تیمار تفاوت معنی‌داری نداشت و بین وزن توده تخم مرغ در تیمارهای مختلف نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول۲- تأثیر سطوح مختلف مکمل ویتامین D3 بر عملکرد تولیدی مرغ تخم‌گذار در کل دوره

تیمار / متغیر	شاهد (n=۵)	۵ برابر (n=۵)	۱۰ برابر (n=۵)	آماره F	سطح معناداری
	میانگین±انحراف‌معیار	میانگین±انحراف‌معیار	میانگین±انحراف‌معیار		
وزن اولیه (گرم)	۱۶۴۶/۴۰±۲۸/۳۸	۱۷۱۰/۰۰±۶۵/۸۷	۱۷۰۳/۲۰±۴۰/۹۸	۲/۶۸۱	۰/۱۰۹
وزن ثانویه (گرم)	۱۶۸۱/۲۰±۳۰/۲۹	۱۷۴۷/۲۰±۵۳/۶۴	۱۷۴۲/۶۰±۴۸/۷۰	۲/۷۳۳	۰/۱۰۵
تخم‌مرغ سالم (درصد)	۹۱/۲۲±۲/۲۱	۹۱/۵۲±۳/۸۹	۹۳/۷۲±۲/۲۱	۱/۱۲۲	۰/۳۵۷
تخم‌مرغ شکسته(درصد)	۷/۹۶±۲/۷۲	۷/۸۰±۳/۸۴	۵/۳۸±۲/۳۹	۱/۱۲۳	۰/۳۵۷
مصرف خوراک(گرم در روز)	۱۰۸/۴۰±۲/۰۷	۱۰۶/۲۰±۳/۹۰	۱۰۵/۸۰±۲/۸۶	۱/۰۶۱	۰/۳۶۸
درصد تولید تخم‌مرغ	۸۶/۳۰±۱/۵۳	۸۷/۲۶±۲/۹۵	۸۷/۰۲±۲/۵۹	۰/۲۱۱	۰/۸۱۳
وزن تخم‌مرغ (گرم)	۵۸/۹۲±۱/۲۵	۵۹/۰۴±۱/۶۶	۶۰/۳۲±۱/۴۸	۱/۳۸۵	۰/۲۸۸
وزن توده تخم‌مرغ (گرم در روز)	۵۰/۸۴±۰/۴۰	۵۱/۵۴±۲/۸۸	۵۲/۴۶±۰/۳۶	۱/۱۵۴	۰/۳۴۸
ضریب تبدیل خوراک	۲/۱۳±۰/۰۳	۲/۰۶±۰/۱۴	۲/۰۲±۰/۰۵	۲/۰۳۸	۰/۱۷۳

۱- سطوح ۳۳۰۰، ۱۶۵۰۰ و ۳۳۰۰۰ واحد بین‌المللی مکمل ویتامین D_3 در هر کیلوگرم خوراک

۲- میانگین خطای استاندارد (تعداد نمونه=۵)

جدول۳- تأثیر سطوح مختلف مکمل ویتامین D_3 بر صفات کیفی تخم‌مرغ در کل دوره

تیمار / متغیر	شاهد (n=۵)	۵ برابر (n=۵)	۱۰ برابر (n=۵)	آماره F	سطح معناداری
	میانگین±انحراف‌معیار	میانگین±انحراف‌معیار	میانگین±انحراف‌معیار		
وزن مخصوص (گرم)	۵۸/۳۴±۲/۰۶	۵۸/۸۷±۲/۰۴	۵۹/۸۱±۲/۲۴	۰/۶۲۶	۰/۵۵۱
حجم توده تخم‌مرغ	۵۴/۹۰±۲/۰۷	۵۳/۹۶±۱/۲۵	۵۵/۸۹±۱/۸۶	۱/۴۹۹	۰/۲۶۲
چگالی (گرم برسانتی متر مکعب)	۱/۰۶±۰/۰۱	۱/۰۹±۰/۰۲	۱/۰۷±۰/۰۲	۳/۰۵۱	۰/۰۸۵
شاخص شکل	۷۷/۴۷±۰/۷۶	۷۷/۹۴±۳/۰۵	۷۷/۵۹±۰/۹۴	۰/۰۸۳	۰/۹۲۰
استحکام پوسته(میلی متر)	۲/۴۹±۰/۳۲[a]	۲/۹۴±۰/۱۳[b]	۲/۸۸±۰/۲۳[b]	۵/۱۷۸	۰/۰۲۴
ارتفاع سفیده(میلی متر)	۶/۶۷±۰/۸۸	۶/۵۹±۰/۶۲	۶/۵۵±۰/۴۷	۰/۰۴۰	۰/۹۶۱
شاخص زرده	۰/۴۳±۰/۰۱	۰/۳۳±۰/۱۸	۰/۴۲±۰/۰۱	۱/۳۴۰	۰/۲۹۸
رنگ زرده	۵/۵۳±۰/۳۶	۵/۶۱±۰/۴۶	۵/۵۳±۰/۲۲	۰/۰۷۵	۰/۹۲۹
ضخامت پوسته(میلی متر)	۰/۴۰±۰/۰۱	۰/۴۱±۰/۰۰	۰/۴۲±۰/۰۲	۲/۴۳۸	۰/۱۲۹
واحد هاو	۸۱/۱۱±۵/۵۴	۸۰/۱۷±۴/۴۱	۷۹/۸۶±۳/۵۹	۰/۱۰۱	۰/۹۰۵
درصد زرده(درصد)	۲۸/۵۶±۰/۷۴	۲۹/۰۸±۱/۱۵	۲۸/۶۶±۰/۹۲	۰/۴۱۶	۰/۶۶۹
درصد سفیده(درصد)	۶۳/۰۹±۰/۹۱	۶۲/۳۷±۱/۱۹	۶۲/۶۶±۰/۸۵	۰/۶۵۶	۰/۵۳۷
درصد پوسته(درصد)	۸/۳۵±۰/۵۲	۸/۵۵±۰/۱۹	۸/۶۸±۰/۴۴	۰/۸۵۸	۰/۴۴۸

۱- سطوح ۳۳۰۰، ۱۶۵۰۰ و ۳۳۰۰۰ واحد بین‌المللی مکمل ویتامین D_3 در هر کیلوگرم خوراک

۲- میانگین خطای استاندارد (تعداد نمونه=۵)

۳- میانگین ها با حروف بالانویس متفاوت اختلاف معنی داری دارند ($P<0.05$)

مطابق جدول شماره ۳، استفاده از سطوح مختلف ویتامین D_3 در جیره مرغ تخم‌گذار هیچ تأثیری بر وزن مخصوص، حجم شاخص شکل نداشت، اما در مقاومت پوسته تخم‌مرغ بین سه تیمار تفاوت معناداری وجود دارد. طبق جدول (۳)، استحکام پوسته تخم‌مرغ در گروه شاهد به طورمعنی‌داری کمتر از ۵ برابر و ۱۰ برابر نیاز پرنده بود ($p<۰/۰۵$). اما تفاوت معنی‌داری بین مقاومت پوسته در تیمارهای ۵ و ۱۰ مشاهده نشد. ارتفاع و درصد سفیده، شاخص رنگ و درصد زرده، ضخامت و درصد پوسته وسفیده و واحد هاو در مرغ‌های تخم‌گذار تحت تأثیر سطوح مختلف کوله کلسیفرول در جیره قرار نگرفت.

اثرات تیمارهای آزمایشی بر محتوای ویتامین D_3 زرده تخم‌مرغ در کل آزمایش در جدول ۴ نشان داده شده است. میانگین ویتامین D_3 زرده تخم‌مرغ در گروه شاهد ۹/۷۰، در ۵ برابر ۳۹/۰۸ و در ۱۰ برابر ۷۳/۴۸ بود و با هم اختلاف معنی داری داشتند ($p<۰/۰۰۱$).

جدول٤-تأثیر سطوح[1] مختلف مکمل ویتامین D_3 جیره بر میزان ویتامین D_3 زرده تخم‌مرغ (میکروگرم در ۱۰۰ گرم زرده)

تیمار	تعداد	میانگین	انحراف‌معیار	آماره F	سطح معناداری
۱ برابر	۵	۹/۷۰[a]	۱/۸۳		
۵ برابر	۵	۳۹/۰۸[b]	۴/۴۵	۲۷۳/۲۷۳	P <۰/۰۰۱
۱۰ برابر	۵	۷۳/۴۸[c]	۶/۴۲		

۱- سطوح ۳۳۰۰، ۱۶۵۰۰ و ۳۳۰۰۰ واحد بین‌المللی مکمل ویتامین D_3 در هر کیلوگرم خوراک

۲- میانگین ها با حروف بالانویس متفاوت اختلاف معنی داری دارند ($P<0.05$)

نتایج تأثیر تیمارهای آزمایشی بر میزان غلظت MDA سرم مرغ-تخم گذار در کل دوره آزمایش مزرعه‌ای درجدول ۵ آورده شده است. میانگین غلظت مالون دی آلدئید سرم خون مرغ در گروه شاهد۰/۰۷۴±۰/۵۴۴، در تیمار ۵ برابر۰/۰۹۹±۰/۴۶۳ و در تیمار ۱۰ برابر۰/۰۹۶±۰/۴۴۳ بوده است و با هم تفاوت معنی داری نداشتند.

جدول ۵-تأثیر سطوح[1] مختلف ویتامین D_3 (IU/kg) بر غلظت مالون دی‌آلدئید سرم خون مرغ تخم‌گذار در کل دوره

تیمار	تعداد	میانگین	انحراف‌معیار	آماره F	سطح معناداری
۱ برابر	۵	۰/۵۴۴	۰/۰۷۴		
۵ برابر	۵	۰/۴۶۳	۰/۰۹۹	۱/۷۳۰	۰/۲۱۹
۱۰ برابر	۵	۰/۴۴۳	۰/۰۹۶		

۱- سطوح ۳۳۰۰، ۱۶۵۰۰ و ۳۳۰۰۰ واحد بین‌المللی مکمل ویتامین D_3 در هر کیلوگرم خوراک

میزان فعالیت پاراکسونازی و آریل‌استرازی

میزان فعالیت آنزیم پاراکسوناز در سرم مرغ‌تخم‌گذار تحت تأثیر تیمارهای غذایی نشان می دهد که هیچگونه فعالیت پاراکسونازی و آریل‌استرازی در سرم مرغ‌های‌تخم‌گذار وجود ندارد و به دلیل عدم مشاهده هیچ‌گونه تغییرات اعدادی، جدول و نموداری برای آن رسم نشده است.

بحث

در مطالعاتی به منظور غنی‌سازی تخم‌مرغ، ۶ گروه آزمایشی فراهم گردید و هر کدام از این گروه‌ها را با دوزهای متفاوتی از ویتامین D_3وآهن غنی‌سازی کردند گروه C یاT_1 در دوز تیماری معمول ویتامین D و T_2 در دوز تیماری معمول ویتامین D و T_2 در دوز تیماری ۲/۵ mg + ۴۰۰۰IU آهن، گروه T_3 ۵ mg + ۸۰۰۰ IU ، گروه T_4 ۷/۵mg + ۱۲۰۰۰IU، گروهT_5 ۱۰ mg + ۱۶۰۰۰ IU و گروه T_6 ۱۲/۵ mg + ۲۰۰۰IU را شامل می شد که هر کدام از این تیمارها شامل ۵ تکرار برای هر کدام از این گروه ها بود. این آزمایش بر روی مرغ های ۹۶ هفته ای انجام گرفت و این گونه نتیجه گیری شد که واحد هاو در این گروه‌ها هیچ گونه تفاوت معناداری را از خود نشان نداد اما غلظت ویتامین D در زرده تخم مرغ افزایش پیدا کرده بود و به حدود ۲۰ برابر رسیده بود، همچنین ضخامت در پوسته ی تخم مرغ نیز تفاوت چندانی نداشت (Park et al., 2005) . در مطالعه ای دیگر با افزودن ویتامینD_3 به رژیم غذایی مرغ‌تخم‌گذار اظهار داشتند که این ماده در خواص کیفیت تخم‌مرغ تأثیر معنی‌داری ندارد که بر خلاف تحقیق حاضر بود و مطابقت نداشت (Frost et al., 1990). یائو و همکاران (۲۰۱۳) به مدت ۴۰ هفته مرغ‌تخم گذار نژاد های لاین را تحت رژیم غنی از کوله کلسیفرول قرار دادند و مشاهده نمودند که زرده تخم مرغ در مرغ های تحت تیمار بطور معنی داری افزایش میزان ویتامین D_3 را به همراه داشت و از نظر کیفیت، طعم و رنگ هیچ کاهش کیفیتی نسبت به تخم‌مرغ‌های معمولی گزارش نگردید همچنین در ادامه تحقیقات خود اظهار نمودند که رسوب ویتامین D_3 در زرده تخم‌مرغ ها در ۳ هفته اول به سرعت افزایش می یابد و سپس به سطح پایداری رسیده و پس از آن در طول این دوره ۴۰ هفته ای کاهش می‌یابد (Yao et al., 2013) . در تحقیقی دیگر تأثیر دوزهای مختلف جیره ی غذایی از ویتامین D_3 و کلسیم بر روی تخم‌مرغ‌ها بررسی شد. این آزمایش بر روی مرغ‌های ۸۰ هفته ای انجام گرفت و این دوره تیمار جیره‌غذایی طی یک پروسه‌ی ۲۸ روزه انجام گرفت و در چهار روز آخر این دوره ۲۸ روزه کیفیت تخم‌مرغ‌ها سنجیده شد. در مورد واحد هاو طی این آزمایشات هیچ گونه تغییر خاصی مشاهده نشد ولی یک پیشرفت خطی در ضخامت پوسته و وزن تخم‌مرغ مشاهده شد. ویتامین D_3 احتمالاً باعث افزایش ترشح آنزیم‌های مختلف گوارشی وهمچنین بهبود وضعیت آناتومیکی جذب مواد مغذی مختلف از جمله کلسیم و در نتیجه رسوب بیشترکلسیم در پوسته می‌شود (Nascimneto et al., 2014). از طرفی با اضافه‌کردن ویتامین D بر جیره‌غذایی مرغ‌تخم‌گذار و بررسی خواص کیفی تخم مرغ، به این نتیجه رسیده شد که ویتامین D در زرده تخم‌مرغ افزایش معنی‌داری داشته است ولی در راندمان خوراک، وزن و توده تخم‌مرغ اثر معنی‌داری نداشت که با مطالعه حاضر همخوانی دارد (Browning and Coweison., 2013). مالون-دی‌آلدئید یک ترکیب آلی است که به‌عنوان نشانگر تجزیه چربی اکسیداتیو مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مطالعه حاضر میزان مالون‌دی-آلدئید به عنوان یک شاخص اکسیداتیو اندازه‌گیری شد که کاهش MDAرا مشاهده کردیم اما این کاهش در تیمارهای مختلف معنی‌دار نبود. مطالعه رادیکال‌های آزاد بسیارمهم است زیرا باعث پاتوژنز پراکسیداسیون لیپید غشای پلاسما می‌شود (Khan et al. ,2011). پلاسمای خون دارای مقدارقابل توجهی از آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی است که به طور دائمی در برابر رادیکال‌های آزاد مبارزه می‌کنند تا اثرات زیان آورآن‌ها را بر روی بدن خنثی سازند (Khan et al., 2012). در آزمایشی با اضافه‌کردن ویتامین E بعنوان یک آنتی-اکسیدان قوی به جیره‌غذایی مرغ، میزان فعالیت آنزیم‌های آریل‌استراز و پاراکسوناز بطور معنی‌داری افزایش داشته است که از نظر وجود این آنزیم در بدن مرغ برخلاف مطالعه حاضر بود چراکه هیچگونه فعالیت پاراکسونازی و آریل‌استرازی در سرم مرغ مشاهده نشد (Usman Saleem et al., 2018).

از طرفی بیان شده که آنزیم PON1 در پستانداران وجود دارد و این-گونه توجیه نمودند که احتمالاً در محافظت از پراکسیداسیون HDL در پرندگان نسبت به پراکسیداسیون LDL بسیار مقاوم هستند. پس ازاندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پاراکسوناز وآریل استراز، هیچ فعالیتی از این دوآنزیم یا تغییر در عملکرد آن‌ها مشاهده نشد (Mackness et al., 1998). در مطالعه ای دریافتندکه میزان پاراکسوناز و فعالیت آریل‌استراز در اکثر پرندگان ازجمله طیور بسیار پایین بوده وکمتر از ۱ درصد از میانگین آن‌ها در انسان است (Primo-parmo et al., 1996).

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داده است که افزودن ویتامین D_3 به تنهایی تأثیرمعنی‌دار ی در ایجاد استحکام در پوسته تخم‌مرغ‌ها داشته است ($P<0.05$).همچنین اندازه‌گیری سطح ویتامین D_3 با تکنیک HPLC نشان داد که سطح کوله کلسیفرول در هرسه گروه تیماری افزایش

معناداری پیدا کرده است ($P<0.05$). از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ویتامین همچنین می‌توان اظهارداشت که فعالیت پاراکسوناز و آریل-استراز در سرم مرغ تخم‌گذار بسیارکم و حتی غیرفعال بوده و سطح MDA سرم خون مرغ کاهش یافته اما معنی‌دار نبود.

توصیه ترویجی

تولید تخم‌مرغ با کیفیت یکی ازموضوعات مهم صنعت مرغ تخم‌گذار می باشد؛ چه بسا که تغذیه نابجای مرغ های تخم گذار باعث پایین‌آمدن سطح کیفیت و استحکام پوسته می گردد و بسیاری از تخم‌مرغ‌ها تا زمان رسیدن به بازار دچار شکستگی می شوند از طرفی دو ماده مغذی اصلی که اندازه تخم‌مرغ و ضخامت پوسته تخم‌مرغ راکنترل می‌کنند، ویتامینD_3 وکلسیم هستند، پس لازم است کلسیم و ویتامین D_3 در برنامه خوراک دام و طیور به میزان کافی گذاشته شود و با توجه به نتایج آزمایش استفاده از غلظت های بالاتر از سطح پایه ویتامین D مورد نیاز سویه شیور به ویژه سطح ۱۶۵۰۰ واحد بین المللی ویتامین D میتواند باعث بهبود خصوصیات کیفی تخم مرغ و غنی سازی این ویتامین در زرده آن بدون هیچ گونه مسمومیتی بشود؛ چراکه رژیم‌غذایی مناسب باعث غنی‌شدن زرده تخم‌مرغ از ویتامین D_3 خواهد شد که مغذی بودن تخم‌مرغ و بهبود ارزش غذایی آن و پیشگیری از پوکی استخوان در بزرگسالان و همچنین افزایش رشد کودکان را به دنبال خواهد داشت (Arya et al., 2004).

منابع

Arya, V., Bhambri, R., Godbole, MM., Mithal, A. (2004). Vitamin D status and its relationship with bone mineral density in healthy Asian Indians. Osteoporos Int, 15:56-61.

Bischoff-Ferrari, HA., Dietrich, T., Orav, EJ., Dawson-Hughes, B. (2004). Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. Am J Med, 116:634-9.

Browning, LC and Cowieson AJ. (2013). Vitamin D fortification of eggs for human health. Journal of the Scienceof Food and Agriculture, 94, 1389-96.

Commercial Product Guide-Shaver White. (2018). North American Version, Hendrix Genetic, Boxmee, The Netherlands. Accessed Sept. 2018. https://www.shaver-poultry.com/documents/304/ Shaver_White_cs_product_guide_NA.pdf.

Frost, TJ., Roland, DA., Untawale, GG. (1990). Influence of Vitamin D3, 1α-Hydroxyvitamin D3, and 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 on Eggshell Quality, Tibia Strength, and Various Production Parameters in Commercial Laying Hens. Poultry Science, 69, 2008-16.

Hamilton, RMG. (1980). The Effects of Dietary Phosphorus, Vitamin D3, and 25-Hydroxy Vitamin D3 Levels on Feed Intake, Productive Performance, and Egg and Shell Quality in Two Strains of Force-Molted White Leghorns. Poultry Science, 59, 598-60.

Irandoost M,Nayeri H, Irandoost H.(2020).Average levels of vitamin D in different countries,journal of parathyroid disease.,8:e01

Khan, RU., Nikousefat, Z., Javdani, M., Tufarelli, V., Laudadio, V. (2011). Effect of vitamin E in heat-stressed poultry. World's Poult Sci J, 67,469-478.

Khan, RU., Zia, UR., Javed, I., Muhammad, F. (2012). Effects of vitamins, probiotics, and protein level on semen traits and some seminal plasma macro- and microminerals of male broiler breeders after zinc-induced molting. Biol Trace Elem Res, 148, 44-52.

Mackness B., Durrington P.N., and Mackness MI., (1998). Lack of protection against oxidative modification of LDL by avian HDL. Biochemical and biophysical research communications, 247(2):443-446.

Nascimento, GRd., Murakami AE., Guerra, A., Ospinas-Rojas, IC., Ferreira, MFZ., Fanhani, JC. (2014). Effect of different vitamin D sources and calcium levels in the diet of layers in the second laying cycle. RevistaBrasileira de Ciência Avícola,16, 37-42.

ParkS,W., Namkung, H., AhnH, J., PaikI.,K. (2005).Enrichment of Vitamins D_3, K and Iron in Eggs of Laying Hens.(Asian-Aust. J. Anim. Sci, 18(2): 226-229.

Primo-Parmo, SL., Sorenson, RC., Teiber, J., Du, BNL. (1996). The Human Serum Paraoxonase/Arylesterase Gene (PON1) Is One Member of a Multigene Family. Genomics, 33, 498-507.

Saedisomeolia, A., Taheri, E., Jalali, MD., Jazayeri, MD., Qorbani, M., Rajab, A., Larijani, B. (2013). Vitamin D status and its association with antioxidant profiles in diabetic patients: A cross-sectional study in Iran.Journal of Medical Sciences, 67(1 and 2).

Usman Saleem, M., Masood, S., Zaneb, H., Zameer, Durrani A., Asim Aslam, A., Ashraf, K. (2018). Histophysiological Changes in Broilers Fed on Diet Supplemented with Mannanoligosaccharide and Organic Acid Blend. Pakistan J. Zool, 50(2):473-480.

Yao L1., Wang T., Persia M., Horst RL., Higgins M. (2013). Effects of vitamin D(3) -enriched diet on egg yolk vitamin D(3) content and yolk quality, 8(7). Phytoestrogens in Functional Foods. Taylor & Francis Ltd. pp. 3–5, 210–211. ISBN978-1-57444- 508-4.

Zhao, X., Yang, ZB., Yang, WR., Wang, Y., Jiang, SZ., Zhang, GG. (2011). Effects of ginger root (Zingiber officinale) on laying performance and antioxidant status of laying hens and on dietary oxidation stability. *Poultry Science*, 90, 1720-7.