

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Vliv výživy slepic na oxidační stabilitu vajec

Bakalářská práce

Autor práce: Ellen Novotná

Obor studia: Živočišná produkce

Vedoucí práce: doc. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Vliv výživy slepic na oxidativní stabilitu vajec“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 4. 2017

Ellen Novotná

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. MVDr. Evě Skřivanové, Ph.D. za odborné vedení práce a Ing. Michaele Englmaierové, Ph.D. za její cenné rady a připomínky, které mi pomohly při vypracování této práce.

Vliv výživy slepic na oxidační stabilitu vajec

Souhrn:

Předložená bakalářská práce pojednává o jednotlivých antioxidantech, jejich bezpečnosti a možnostech jejich uplatnění ve výživě slepic. Byly zpracovány výsledky experimentu na nosnicích, který trval 14 týdnů. Cílem bylo sledovat vliv přídatku vitamínu C a vojtěškových úsušků v krmné směsi na užitkovost nosnic a kvalitu vajec. Pokus byl realizován na 240 nosnicích Hisex Brown ve věku 39 - 53 týdnů. Slepice byly rozděleny po 10 kusech v obohacených klecích a zařazeny do 6 skupin se 4 opakováními podle množství přidaného vitamínu C (0, 100 a 200 mg/kg) a vojtěškových úsušků (0 a 40 g/kg). Kontrolní skupina byla bez přídatku aditivních komponent, druhá skupina byla s přídatkem vitamínu C 100 mg/kg a třetí skupina měla ve směsi vitamín C v množství 200 mg/kg krmiva. Čtvrtá, pátá a šestá skupina měla stejné množství vitamínu C jako skupina jedna, dva a tři spolu s přídatkem 40 g vojtěškových úsušků na kg krmiva. Zjištěné výsledky byly statisticky zpracovány programem SAS. Výsledky ukázaly, že vitamín C ($P=0,017$) i vojtěškové úsušky ($P<0,001$) výrazně snížily intenzitu snášky slepic. Vojtěškové úsušky zvýšily ($P<0,001$) spotřebu krmiva (kg) na kg vaječné hmoty. Nejvyšší hmotnost vajec (67,9 g) byla zaznamenána u nosnic krměných krmnou směsí s přídatkem vitamínu C v množství 100 mg/kg. Nejlehčí vejce (65,4 g) měla skupina se 40 g/kg vojtěškových úsušků a 100 mg/kg vitamínu C. Vitamín C zvýšil index bílku ($P<0,001$), Haughovy jednotky ($P<0,001$) i index žloutku ($P<0,001$), nejvýrazněji při dávce vitamínu C 200 mg/kg krmné směsi. Vojtěškové úsušky zvýšily podle stupnice La Roche sytost barvy žloutku ($P<0,001$) a snížily pevnost skořápky ($P=0,003$). Nejtvrdší skořápku (46,7 N) měla vejce nosnic s dietou s vitamínem C (200 mg/kg) bez přídatku vojtěškových úsušků. Vitamín C samostatně ($P<0,001$) i v kombinaci s vojtěškovými úsuškami ($P=0,002$) zvýšil obsah zeaxanthinu ve žloutku. Obsah luteinu ve žloutku nejvíce ovlivnily vojtěškové úsušky ($P<0,001$) a i vitamín C ($P=0,021$). Obsah vitamínu A zvýšily vojtěškové úsušky ($P<0,001$), zatímco vitamín C, ve skupinách, kde byly přidány vojtěškové úsušky, množství vitamínu A ve žloutku snížil ($P=0,002$). Oxidační stabilita, ve srovnání s hodnotami čerstvých vajec, u vajec skladovaných 28 dní nebyla jednotlivými přídatky ovlivněna. Z výsledků pokusu vyplývá, že obě zvolená aditiva měla negativní vliv na užitkovost slepic. Kvalita vaječného obsahu byla příznivě ovlivněna přídatkem vitamínu C, zatímco přídatek vojtěškových úsušků měl za následek tmavší barvu žloutků a zvýšení obsahu karotenoidů a oxidační stability čerstvých žloutků. Synergický efekt

vitaminu C a vojtěškových úsušků byl zaznamenán u obsahu zeaxanthinu ve vaječných žloutcích.

Klíčová slova:

Antioxidant, oxidační stabilita, slepice, vejce, vojtěška

The effect of hen nutrition on oxidative stability of eggs

Summary:

This bachelor thesis deals with the various antioxidants and their security options for their application in nutrition of hens. The thesis includes the experimental part, where an experiment on laying hens, a duration of 14 weeks, was carried out. The aim of the experiment was to monitor the influence of addition of vitamin C and lucerne in the diet on performance of laying hens and egg quality. An attempt was conducted on 240 laying hens Hisex Brown at the age of 39 - 53 weeks. The hens were divided into groups of 10 hens in enriched cages in 6 groups with 4 repeats of the quantity of added vitamin (0, 100 and 200 mg/kg) and lucerne (0 and 40 g/kg). The control group was without addition of vitamin C and lucerne, the second group was supplemented with vitamin C 100 mg/kg and the third group was done fodders added vitamin C in an amount of 200 mg/kg feed. Fourth, fifth and sixth group had the same amount of vitamin C as a group one, two and three, together with the addition of 40 g per kg of lucerne in diet. The results were processes by the statistical program SAS. The results showed that vitamin C ($P=0.017$) and dried lucerne ($P<0.001$) significantly reduced the egg production of hens. Dried lucerne increased ($P<0.001$) feed consumption (kg) per kg of egg mass. The highest egg weight (67.9 g) was recorded in hens fed feed mixture enriched with vitamin C at 100 mg/kg. Lightest eggs (65.4 g), had the group with combination 40 g/kg dried lucerne and 100 mg/kg of vitamin C. Vitamin C has increased albumen index ($P<0.001$), Haugh unit ($P<0.001$) and yolk index ($P<0.001$), with the most vitamin C (200 mg/kg) of feed. Dried lucerne increased the scale La Roche yolk color density ($P<0.001$) and lowers the shell strength ($P=0.003$). The highest value of shell strength (46.7 N) had eggs of hens fed diet with vitamin C (200 mg/kg) without the addition of the dried lucerne. Vitamin C alone ($P<0.001$) and in combination with dried lucerne ($P=0.002$) increased zeaxanthin content in egg yolk. The content of lutein in the yolk most affected dried lucerne ($P<0.001$) and vitamin C ($P=0.021$). Dried lucerne ($P<0.001$) increased content of vitamin A, while the vitamin C, in groups where dried lucerne was added, reduced quantity of vitamin A in the yolk ($P=0.002$). Oxidative stability, compared to the values for fresh eggs, eggs at 28 days of storage was not affected by the additives. From the results of experiment is evident that both the selected additives negatively influenced the performance of hens. The egg content quality was favourably influenced by the addition of vitamin C, while addition of dried lucerne resulted in darker colour of yolks, and increased carotenoids

content and oxidative stability of fresh yolks. The synergistic effect of vitamin C and dried lucerne was recorded in zeaxanthin content in egg yolks.

Keywords:

Antioxidants, oxidative stability, hens, eggs, lucerne

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Antioxidanty	3
3.2	Charakteristika jednotlivých antioxidantů.....	6
3.2.1	Glutathion peroxidaza	6
3.2.2	Superoxid-dismutaza	7
3.2.3	Vitamin C.....	8
3.2.4	Vitamin A.....	8
3.2.5	Vitamin E.....	9
3.2.6	Katalasa	9
3.2.7	Karoteny.....	10
3.2.8	Flavonoidy.....	10
3.2.9	Glutathion	10
3.2.10	Kyselina močová	11
3.2.11	Selen.....	11
3.2.12	Bilirubin.....	11
3.3	Uplatnění antioxidantů ve výživě drůbeže	12
3.4	Uplatnění vitamínu C ve výživě slepic	13
3.5	Uplatnění karotenoidů ve výživě slepic	14
3.5.1	Syntetické zdroje karotenoidů.....	15
3.5.2	Přírodní zdroje karotenoidů.....	16
4	Metodika práce.....	17
4.1	Teoretická část:	17
4.2	Praktická část:	17
4.2.1	Slepice, krmné směsi, ustájení.....	17
4.2.2	Technologická hodnota vajec	19
4.2.3	Chemické analýzy.....	20
4.2.4	Statistická analýza.....	21
5	Výsledky a diskuze	22
6	Závěr	27
7	Použitá literatura	28

1 Úvod

Živočišná výroba je ovlivněna řadou vnějších a vnitřních faktorů. Slepice, některé křepelky a řada domestikovaných plemen hus za účelem rozmnožování snášejí vejce i bez přičinění samce. Neustálou cílevědomou selekcí, plemenitbou vybraných jedinců a křížením se podařilo vyšlechtit nosné hybridy, kteří jsou schopni snést 300 vajec ročně i více.

Kvalita vajec je včetně jejich počtu a hmotnosti důležitou součástí produkce. Z vnitřních faktorů nejvíce ovlivňuje kvalitu vajec fyziologické období nosnice, intenzita a perzistence snášky, genotyp, hmotnost, věk, pohlavní dospělost a zdravotní stav nosnice, délka tvorby vejce a barva skořápky. Mezi vnější faktory ovlivňující kvalitu vajec patří vlivy prostředí (především teplota, světelný režim, vlhkost a skladování po snášce), systém ustájení nosnic, s ním související stresové faktory a také výživa.

Krmné směsi jsou souborem krmných surovin s přídavkem či bez přídavku doplňkových látek. Jednotlivé komponenty a doplňkové látky v krmných směsích jsou vybírány podle jejich specifických účinků tak, aby pozitivně ovlivňovaly kvalitu výživy, zdraví zvířat a kvalitu a nutriční hodnotu výsledných živočišných produktů. Krmné směsi jsou vyráběny podle zákona o krmivech č. 91/1996 Sb., ve znění pozdějších změn a doplňků a příslušné prováděcí vyhlášky. Mláďata potřebují jiné složení krmiva než dospělí jedinci. Slepice, které snášejí konzumní vejce, musí být krmeny jinak, než slepice, které snášejí vejce násadová.

Radikál je chemické označení pro prvek nebo sloučeninu, která má v molekule jeden či více nepárových elektronů. Radikál je nestabilní a získává elektrony z jiných sloučenin a tím poškozuje buňky organismu. Při nerovnováze mezi toxickými formami kyslíku a sloučeninami, které brání vzniku těchto forem, vzniká tzv. oxidační stres. Volné radikály hrají roli při vzniku aterosklerozy, poruch imunity, očních chorob, neurodegenerativních chorob a karcinomů.

Antioxidanty se řadí v krmivech mezi technologická aditiva. Jsou to látky, které snadno přijímají kyslík a tak předcházejí oxidativním reakcím nebo je zpomalují.

2 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce je popis vlivu složení diety slepic na kvalitu vajec, se zaměřením na jejich oxidační stabilitu. Jde o literární rešerši, která bude sloužit jako podklad pro navazující studium přidavku antioxidantů do diety slepic. Bude pojednáno o jednotlivých antioxidantech, jejich bezpečnosti a možnostech jejich uplatnění ve výživě slepic. Budou zpracovány výsledky experimentu na nosnicích, jehož cílem bude sledovat vliv přidavku vitamínu C a vojtěškových úsušků v krmné směsi na užitkovost nosnic a kvalitu vajec. Práce přispěje k poznání v oblasti vlivu diety na užitkovost, zdravotní stav slepic a kvalitu vajec.

3 Literární rešerše

3.1 Antioxidanty

Antioxidanty jsou chemické látky, které chrání před škodlivými účinky volných radikálů, vznikajících v probíhajících oxidačních procesech (Marounek, 2006). Předpokládá se, že antioxidanty zpomalují proces stárnutí a preventivně působí proti srdečním onemocněním a infarktu (Regenermelová, 2010).

Reaktivní formy kyslíku poškozují nukleové kyseliny, biopolymery a buněčné membrány. Soustřeďují se hlavně na nenasycené mastné kyseliny v lipidech membrán. Reagují s dvojnými vazbami za vzniku peroxidů a aldehydů, zatímco membrány ztrácejí své funkce (Skřivan et al., 2015).

Mají však i pozitivní účinky. Například radikál oxid dusnatý s volným nepárovým elektronem působí na hladké svalstvo, na svalstvo trávicí trubice a na erekci. Reaktivní formy kyslíku také napomáhají fagocytujícím leukocytům při tzv. respiračním vzplanutí, za vzniku peroxidu vodíku a superoxidového radikálu. Ionty Cl^- a Br^- se mění na kyslíkaté kyseliny HClO a HBrO , což vede k usmrcení bakterie absorbované leukocytem (Skřivan et al., 2015).

Za normálních podmínek jsou antioxidanty a volné radikály v organismu v rovnováze. Ve výživě hospodářských zvířat chrání složky krmiva náchylné k oxidaci. V případě selenu a vitamínu E zároveň obohacují živočišné produkty o tyto látky. Zvyšují tak jejich oxidační stabilitu (Marounek, 2006).

Není jednoduché najít vhodné kritérium pro třídění antioxidantů. V literatuře je několik hledisek, podle nichž se rozdělují (Racek, 2003). Dle Marounka (2006) lze antioxidanty rozdělit dle reakce v prostředí na hydrofilní, lipofilní a amfofilní. Podle způsobu účinku na:

- Antioxidanty neenzymové povahy

Patří sem například vitamin E, vitamin C, flavonoidy, karoteny, kyselina ferulová, kyselina fytová, kyselina močová, glutathion. Dále do této kategorie zahrnuje i prvky, které souvisí s enzymy, konkrétně měď, selen a zinek (Marounek, 2006).

- Antioxidanty enzymové povahy

Patří sem glutathion peroxidaza, katalaza a superoxid-dismutaza (Marounek, 2006).

Dle Racka (2003) se antioxidanty rozdělují do několika skupin.

1. Dle původu

- Endogenní

Syntetizují se v těle organismu.

- Exogenní

Přichází do těla organismu zvenčí, skrze přijímanou potravu. Dělíme je dále na:

- a) Přirozené

Tuto skupinu tvoří nejvíce vitaminy.

- b) Umělé

Patří sem i přirozené látky, které jsou chemicky nebo jinak modifikovány a mají tak požadované vlastnosti. Například glutathion získá esterifikací lepší schopnost pronikat membránami. Také sem patří látky užívané jako léky, například manitol; nebo látky užívané jako činidla jako je například butylhydroxytoluen.

2. Dle lokalizace v buňce nebo mimo buňku

- Extracelulární

Nacházející se mimo buňku.

- Intracelulární

Pro ochranu před volnými radikály významnější, protože působí uvnitř buňky.

3. Dle rozpustnosti v prostředí

➤ Hydrofilní

Rozpustné ve vodě. Dobře se dostávají do organismu. Přes buněčnou membránu se dostávají hůře.

a) Intracelulární

- Enzymové: kataláza, superoxiddismutáza, peroxidázy.
- Neenzymové: glutathion

b) Extracelulární

- Vysokomolekulární.
- Nízkomolekulární.

➤ Lipofilní

Rozpustné v tucích. Na místo, kde působí, se dostávají pomaleji. Jsou to membránové antioxidanty, které účinkují v lipoproteinech a membránách. Například vitamin E, estrogeny, karotenoidy, atd.

➤ Amfofilní

Mají hydrofilní i lipofilní část molekuly, proto mají vlastnosti obou předchozích skupin. Patří sem například melatonin.

4. Dle velikosti molekuly

➤ Vysokomolekulární

Albuminy a další bílkoviny, které obsahují skupinu –SH. Tato skupina zahrnuje transferin, ceruloplasmin, méně antioxidantní enzymy.

➤ Nízkomolekulární

Například bilirubin, vitamin C nebo kyselina močová.

5. Dle ovlivnění tvorby volných radikálů.

➤ Primární

Brání vzniku volných radikálů. Například chelatační látky, oxidázy nebo inhibitory adheze neutrofilů.

➤ Sekundární

Likvidují vzniklé volné radikály. Patří sem látky s redukčním účinkem a i katalyzátory, jako například enzym superoxiddismutáza.

➤ Terciární

Opravují nebo eliminují molekuly poškozené volnými radikály. Do této skupiny se řadí například enzymy zajišťující opravu poškozené DNA.

6. Dle mechanismu účinku

➤ Chelatační látky

Brání přechodným kovům, jako je například Fe nebo Cu, v jejich uplatnění ve Fentonově reakci.

➤ Katalyzátory

➤ Inhibitory enzymů (Racek, 2003).

3.2 Charakteristika jednotlivých antioxidantů

3.2.1 Glutathion peroxidáza

Hlavní selenoenzym katalyticky aktivní v redoxních reakcích. V aktivním centru všech selenoenzymů je aminokyselina selenocystein. Katalyzuje redukci peroxidu vodíku a organických hydroperoxidů a tím chrání před jimi způsobeným oxidačním poškozením (Marounek, 2006).

Glutathion peroxidáza se vyskytuje v cytoplazmě buněk, v krevní plazmě neboli v extracelulárním prostředí a v membránách buněk (Racek, 2003).

Je známo 5 glutathion peroxidaz:

- První identifikovaný selenoprotein cytosolická glutathion peroxidaza.

V rozdílné aktivitě přítomná téměř ve všech tkáních. Nejnižší aktivitu má v mozku a v kosterním svalstvu, nejvyšší aktivitu má v játrech a erythrocytech. Koreluje s vitamínem E. Při nedostatečném množství selenu v krmné dávce je aktivita glutathion peroxidazy nízká, ale k patologickým projevům dojde jen při současném deficitu vitamínu E.

- Gastrointestinální glutathion peroxidaza.

V epitelu trávicího traktu má podobnou aktivitu jako cytosolická glutathion peroxidaza. Má význam jako ochrana před kolorektálním karcinomem.

- Glykoprotein plasmatická glutathion peroxidaza.

Syntetizuje se hlavně v ledvinách. Má nízkou aktivitu, protože v krvi je nízká koncentrace glutathionu. Ten však může být v roli donoru elektronů zastoupen thioredoxinem.

- Glutathion peroxidaza redukující hydroperoxydy fosfolipidů a cholesterolu.

Má význam pro ochranu biologických membrán před oxidačním poškozením. Také usměrňuje zánětlivé reakce a zánik buněk. Působí také u spermatogeneze.

- Glutathion peroxidaza ve spermatu.

V organismu se vyskytuje od období pubescence. Má význam pro plodnost a pro zrání spermií (Marounek, 2006).

3.2.2 Superoxid-dismutaza

Základní antioxidační enzym. Vzniká jednoelektronovou redukcí kyslíku, při autooxidaci flavinů, hydrochinonů, katecholaminů, thiolů, tetrahydropterinů a hemoproteinů (Racek, 2003).

Je účinný proti reaktivním formám kyslíku u aerobních a anaerobních organismů. Brání vzniku nebezpečnějších hydroxylových radikálů tím, že katalyzuje rozklad superoxidových iontů. V aktivním centru enzymu se nachází atom kovu. Komplexy aminokyselin s mědí a v menší míře i ionty manganu mají Superoxid-dismutazovou aktivitu. Superoxid-dismutazy obsahující Fe nebo Mn nejsou citlivé ke kyanidu. Superoxid-dismutazy s Cu a Zn jsou ke kyanidu vnímavější (Marounek, 2006).

Mitochondrie živočichů mají superoxid-dismutazy, s Fe a Mn, necitlivé na kyanid. Tyto superoxid-dismutazy jsou nejlépe popsány u bakterií, například u fakultativně anaerobní bakterie *Escherichia coli*. Superoxid-dismutaza hraje důležitou roli při metabolismu kyslíku, procesech stárnutí, působení herbicidů, je dávana do souvislosti s radiačním poškozením živočišných tkání a působením kancerogenních látek (Marounek, 2006).

3.2.3 Vitamin C

Chemicky kyselina L-askorbová. Působí jako kofaktor řady enzymů, např. při hydroxylaci prolinu a lyzinu při biosyntéze kolagenu. Je potřebná při tvorbě karnitinu, noradrenalinu, cholesterolu, atd. Také má významnou úlohu jako antioxidant (Racek, 2003).

Látka, dobře rozpustná ve vodě, působící v cytosolu buňky. Většina živočichů jej dokáže syntetizovat. Zbylá část živočichů jej ale syntetizovat nedokáže, protože jim chybí enzym katalyzující poslední krok syntézy. U člověka, který potřebný enzym také nemá, je fyziologická potřeba vitamínu asi 50 – 70 mg/den, což je více než u ostatních vitamínů (Marounek, 2006). Nejvyšší koncentrace kyseliny askorbové je v polymorfonukleárech, které chrání před oxidačním stresem, a v nadledvinách, kde se uplatňuje při tvorbě noradrenalinu (Racek, 2003).

Působíštěm vitamínu C je vodná fáze buněčného prostředí a extracelulárních tekutin. Umí reagovat přímo se superoxidovým radikálem, singletovým kyslíkem a hydroxylovým radikálem, za vzniku kyseliny dehydroaskorbové. Z výsledného produktu se vitamin C může regenerovat prostřednictvím působení dehydroaskorbát reduktázy. U osob s koncentrací vitamínu C v plasmě menší než 50 $\mu\text{mol/l}$ je oxidační poškození DNA, lipidů a proteinů významně vyšší. Vitamin C má důležitou roli i při syntéze kolagenu (Marounek, 2006).

3.2.4 Vitamin A

Najdeme jej především v zelené a žluté zelenině a v ovoci. Jeho antioxidační aktivita je zajištěna hydrofobním řetězcem polyenových jednotek, které mohou uhasit singletový kyslík. Spolu s karotenoidy je hlavním komponentem pro snížení výskytu onemocnění srdce (Palace et al., 1999). Je potřebný pro vývoj sliznic, buněčnou diferenciaci,

reprodukcí, vývoj kostí, funkce imunitního systému, kontroluje expresi některých genů (Skřivan a kol., 2015).

3.2.5 Vitamin E

Chemicky je to směs osmi izomerů tokoferolu (Racek, 2003). Přerušují řetězové reakce volných radikálů, čímž brání oxidaci lipidů a tak působí jako antioxidanty (Englmaierová, 2013). Vitamin E je lipofilní, neboť jeho izoprenový řetězec způsobuje jeho nerozpustnost ve vodě (Racek, 2003).

Působí v membránách a lipoproteinech. Tokoferoly vitaminu E se označují jako α , β , γ , δ . Za vzniku oxidovaného tokoferolového radikálu, přerušují řetězové reakce volných radikálů svou schopností přenášet vodík fenolové skupiny na volný peroxylový radikál peroxidované polynenasycené mastné kyseliny a tak působí jako antioxidanty. Část vzniklého tokoferolu se regeneruje redukcí na tokoferol za pomoci vitaminu C nebo glutathionu. Za vzniku látky typu chinonu zbaveného nepárového elektronu, může tokoferolový radikál reagovat s dalším peroxylovým radikálem (Marounek, 2006).

Oxidační produkt α -tokoferolu je v játrech vázán na kyselinu glukuronovou a je vylučován do žluče. U člověka je fyziologická spotřeba vitaminu E asi 20 mg/den. Hlavním zdrojem je rostlinná strava. Přidává se i do rostlinných olejů. Například hlavním tokoferolem sojového oleje je derivát γ (Marounek, 2006).

Literatura ukazuje, že vitamin E má antioxidační aktivitu ve vaječném žloutku, chrání efektivně embryonální tkáň během inkubace a kuře v prvních dnech života (Rocha, 2010). Má význam pro plodnost a imunitní systém. Detoxikuje oxidy dusíku. Působí synergicky v kombinaci se selenem. Najdeme jej například v sojovém oleji (Skřivan a kol., 2015).

3.2.6 Katalasa

Enzym s největší rychlostí přeměny substrátu má v aktivním centru v hemu vázané Fe (Marounek, 2006). Chrání buňky, především hepatocyty a erytrocyty, před toxickým vlivem vyšší koncentrace peroxidu vodíku (Racek, 2003).

Rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík a oxiduje peroxidem vodíku různé toxiny, např. formaldehyd. V reakcích koreluje se superoxid-dismutazou. Působením superoxid-dismutazy vzniká peroxid vodíku a katalasa jej likviduje (Marounek, 2006).

3.2.7 Karoteny

Provitaminy A nacházející se v rostlinách. Díky konjugovaným trans-dvojným vazbám absorbujícím světlo, jsou zodpovědné za oranžové zbarvení (Marounek, 2006). Spolu s xanthofyly tvoří podskupinu karotenoidů (Skřivan a kol., 2015). Je to normální složka krve a tkání řady živočichů a člověka. Například s funkcí antioxidantu jsou v pigmentu oční sítnice lutein a zeaxanthin. U člověka s přiměřeně pestrou stravou se 80 - 85 % karotenoidů nachází v tukové tkáni, 8 – 12 % v játrech, 2 – 3 % ve svalové tkáni a zbylé množství v ostatních tkáních. Karoteny jsou látky rozpustné v tucích. Ve studiích se nejvíce zkoumal nejvýznamnější z nich, β -karoten. Při nízkém parciálním tlaku O_2 , vychytává volné kyslíkové radikály ve tkáních. Tuto schopnost mají i ostatní karotenoidy (Marounek, 2006).

3.2.8 Flavonoidy

Jsou to sekundární rostlinné metabolity. Nachází se v ovoci, zelenině, čaji a vínu (Štípek et al., 2000). Například v pohance je obsažen rutin, jehož aglykon tvoří flavonoid kvercetin. Je to velká skupina polyfenolických antioxidantů. Při oxidaci na radikálové sloučeniny se rozpadají, ale mezitím dokáží navázat všechny volné radikály. Játra je stahují z krevního oběhu a detoxikují konjugační reakci (Marounek, 2006).

3.2.9 Glutathion

Thiolová sloučenina složená ze tří peptidů, a sice z cysteinu, glycinu a kyseliny glutamové. Dokáže reaktivovat oxidačně poškozené enzymy. Oxidovaný glutathion se regeneruje prostřednictvím účinku glutathion reduktázy, využívající vodík redukovaných pyridinových nukleotidů (Marounek, 2006). Nejvíce působí v cytoplazmě a v buněčném jádře, kde chrání DNA před oxidačním poškozením (Racek, 2003).

Vyskytuje se jako thiol (GSH) v redukované formě a jako disulfid (GSSG) v oxidované formě. Aby nedošlo k narušení antioxidantní stability buněk, organismus se snaží udržet rovnovážný stav mezi GSH a GSSH. Redukovaný glutathion je v organismu nejvíce v erytrocytech, kde ho je asi 500 krát více než oxidovaného (Racek, 2003).

Velké množství glutathionu je v oční sítnici. Reaktivní formy kyslíku vznikají v oční sítnici snadněji než v jiných tkáních (Marounek, 2006).

3.2.10 Kyselina močová

Nízkomolekulární antioxidant endogenního původu. Produkt degradace purinových bází (Marounek, 2006). Racek (2003, str. 60) cituje Davies et al. (1986) a tvrdí, že kyselina močová ve formě pevného chelátu váže ionty železa a tím brání produkci hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí.

3.2.11 Selen

Obsahuje selenoenzym glutation peroxidázu, jejíž aktivací se podílí na buněčné antioxidační ochraně tak, že selenoenzym katalyzuje redukci peroxidu vodíku a organických hydroperoxidů. Obohacení vajec selenem snižuje náchylnost vaječného žloutku k peroxidaci lipidů při skladování a zlepšuje vnitřní kvalitu vajec (Englmaierová, 2013). Přídavek selenu zvyšuje obsah vitamínu E ve žloutku (Skřivan a kol., 2015).

U nás jej najdeme především v obilovinách. Obsah selenu v rostlinách a následných produktech je závislý na obsahu selenu v půdě (Skřivan a kol., 2015).

Z výzkumů Skřivana a kol. (2015) přídavek selenové řasy *Chlorelly* podpořil u nosnic nejvíce intenzitu snášky a hmotnost vajec.

Selen se v anorganické formě vyskytuje nejčastěji jako seleničnan a selenát. Použití seleničitanu v experimentu zlepšilo pevnost skořápky (Skřivan a kol., 2015).

Použití biologicky dostupných zdrojů selenu v dietě může snížit celkovou hladinu vitamínu E v potravě (Zduńczyk et al., 2013).

3.2.12 Bilirubin

Nízkomolekulární antioxidant endogenního původu. Produkt degradace hemoglobinu (Marounek, 2006). Je to lineární tetrapyrrol inhibující peroxidaci lipidů (Štípek a kol., 2000).

Bylo zjištěno, že biliverdin reduktáza poskytuje antioxidační redoxní amplifikační cyklus, díky němuž nízké koncentrace fyziologického bilirubinu poskytují silnou antioxidační ochranu prostřednictvím recyklace biliverdinu z oxidované biliverdin reduktázy. V současnosti je tento antioxidační redukční cyklus stále zkoumán (Jansen et Daiber, 2012).

3.3 Uplatnění antioxidantů ve výživě drůbeže

Je známo, že environmentální stresory, jako jsou například vysoké teploty prostředí nacházející se především v drůbežářském průmyslu, jsou škodlivé pro životní podmínky zvířat. Tepelný stres způsobuje oxidační poškození, což zvyšuje úmrtnost a negativně ovlivňuje produkční užitkové vlastnosti zvířat. Tyto negativní změny souvisí s nástupem oxidačního stresu, jako je například snížení koncentrací cirkulujících antioxidantů vitamínu A a vitamínu E. Antioxidační suplementace zeslabuje odezvu slepice na oxidační stres. Doplňkové antioxidanty mohou zlepšit stav slepice spojený s fyzikálním a fyziologickým poškozením vznikajícím v důsledku tepelného stresu (Felver-Gant et al., 2014).

Drůbež a drůbeží maso jsou zvláště náchylné na oxidační reakce (Estévez, 2015). Vejce „ve skořápce“ jsou považována za rezistentní k oxidačnímu žluknutí, nicméně studie ukázaly, že lipidy žloutku u konzumních vajec oxidují během skladování a tato oxidace je ovlivněna délkou trvání a teplotou skladování a stupněm nenasycenosti mastných kyselin žloutku. Požití živin s antioxidačními vlastnostmi, jako je například vitamin E, C a karotenoidy, pomáhají enzymatickému obrannému systému kontrolovat škody způsobené volnými radikály v buňkách (Rocha et al., 2010).

Antioxidanty se běžně přidávají do krmných směsí z důvodu zvýšení oxidační stability živočišných produktů a udržení stability labilních sloučenin (Marounek, 2006). V membránách, hlavním odstraňovačem volných radikálů je α -tokoferol neboli vitamin E (Rocha et al., 2010). Tokoferoly jsou přírodní antioxidanty, které předchází oxidativnímu poškození lipidů (Pal et al., 2002)). β -tokoferol, γ -tokoferol a σ -tokoferol jsou formy méně důležité, protože jsou hůře vstřebatelné. Tokoferoly odstraní peroxylové radikály, změní atom vodíku tak, že ho přemění na peroxid (Rocha et al., 2010).

V případě některých látek, například u vitamínu E nebo selenu je jejich vyšší množství v krmné směsi žádoucí i pro celkové zlepšení nutričních hodnot konečných potravinových produktů. Maximální množství všech antioxidantů v kompletní krmné směsi je 150 mg/kg (Marounek, 2006).

Selen se do krmiv drůbeže přidává za účelem zvýšení obsahu selenu v masu a vejcích. Nejčastěji v méně účinné, ale ve srovnání s organickým zdrojem levnější formě seleničitanu sodného. Selenem obohacené kvasnice získané kultivací *Saccharomyces cerevisiae* s anorganickým zdrojem selenu obsahují více než 90 % selenu ve formě

selenometioninu. Suplementace krmiva selenem obohacenými kvasnicemi prokazatelně ovlivnila hmotnost vajec, hmotnost žloutku a Haughovy jednotky (Englmaierová, 2013).

Masný a drůbežářský průmysl hledá zdroje přírodních antioxidantů jako náhradu za syntetické antioxidanty. Vzhledem k vysokému obsahu fenolových sloučenin, ovoce a další rostlinný materiál poskytuje dobré alternativy; švestka, brusinky, granátové jablko, extrakt z borové kůry, rozmarýn, oregano a další koření mají potenciál jako antioxidanty v masných a drůbežích produktech. Granátové jablko, extrakt z borové kůry, skořice a hřebíček vykazují silnější antioxidační účinky než některé ze syntetických antioxidantů používaných v současné době (Karre et al., 2013).

V Evropské unii je používání antioxidantů regulováno směrnicí Evropského parlamentu a Rady č. 95/2/ES ze dne 20. února 1995 o potravinářských přídatných látkách jiných než barvy nebo umělá sladidla. Další organizací, která upravuje používání antioxidantů je Codex Alimentarius, což je sbírka mezinárodně přijatých norem vztahujících se k bezpečnosti potravin (Karre et al., 2013).

3.4 Uplatnění vitamínu C ve výživě slepic

Drůbež potřebuje vitamin C při stresových situacích spojených se změnou prostředí, změnou v krmení, napájení, ve světelném režimu, manipulací se zvířaty, při tepelném stresu vyvolaném vysokými teplotami v letním období či při různých infekcích. Je nezbytný pro optimální růst, produkci vajec a plodnost (Englmaierová, 2013). Také pro syntézu hormonů, např. testosteron, a pro minerální a aminokyselinový metabolismus. Drůbež si jej dokáže syntetizovat sama. Ale toto množství nepokryje veškerou fyziologickou potřebu vitamínu (Skřivan, 2012). A to především v intenzivních chovech (Englmaierová, 2013). Navíc v prvních týdnech života není syntéza plně vyvinuta a přídavek 100 – 300 mg/kg směsi může zvýšit intenzitu růstu a podpořit reprodukční schopnosti a imunitu zvířete (Skřivan, 2012).

Nejzajímavější vlastnost kyseliny askorbové neboli vitamínu C, je jeho schopnost působit jako redukční činidlo, a sice donor elektronů. Činidlo rychle reaguje s volnými radikály a působí synergicky s vitaminem E, který usnadňuje regeneraci v biologických systémech (Rocha et al., 2010).

Při regeneraci vitamínu E, po jeho přeměně na tokoferoxylový radikál, vitamín C spolupracuje s glutathionem a jinými antioxidanty (Racek, 2003).

Vitamín C je poměrně stabilní (Anderson et Sunderland, 2002). Při skladování se jeho stabilita snižuje a proto je dobré jej drůbeži podávat v peletovaných směsných krmivech (Skřivan et al., 2012). Při extruzi, která je považována za agresivní metodu zpracování vitaminů a karotenoidů, se v důsledku působení vysokých teplot množství vitaminů v krmivech významně snižuje (Anderson et Sunderland, 2002).

V chovech se vitamín C v krystalické podobě běžně přidává do pitné vody nebo krmných směsí. Byly zaznamenány pozitivní účinky vitamínu C u chovné drůbeže v době vysokých teplot vzduchu a i po celý rok. Po přidání 50 – 100 mg/kg slepicím masného typu se signifikantně zvýšila produkce násadových vajec, jejich oplozenost a následná líhivost. Oxidaci vitamínu C katalyzuje vzdušný kyslík, světlo, vlhkost, teplo nebo ionty kovů, především železo a měď (Skřivan, 2012).

Některé farmaceutické společnosti nabízí stabilizovaný vitamín C, s kterým Skřivan a kol. (2012) udělali několik pokusů. V jednom pokusu s brojlerovými kuřaty ROSS ve věku od 1. dne do 5 týdnů bylo zjištěno, že vlivem granulace klesl obsah vitamínu C v základní krmné směsi z průměrné hodnoty o 65 % původní koncentrace. Pokus byl ukončen ve stáří kuřat 35 dní a z výsledků je zřejmé, že při nižším přídávku vitamínu C 280 mg/kg byl ve srovnání s vyšším přídávkem (560 mg/kg) vyšší úbytek vitamínu (Skřivan, 2012).

Keshavarz (1996) cituje historický dokument Perek et Kendler (1962) a tvrdí, že výzkumníci zaznamenali, že vitamín C zlepšuje kvalitu skořápky a produkci vajec.

Perek et Kendler (1963) při krmení nosnic dietami o třech různých úrovních vitamínu C (25, 75 a 400 p. p. m.) zjistili, že vitamín zvyšuje také hmotnost vajec.

3.5 Uplatnění karotenoidů ve výživě slepic

Karotenoidy jsou látky s antioxidační aktivitou, které se ve výživě drůbeže používají ke zvýšení sytosti barvy žloutku, k ovlivnění barvy kůže a ke zvýšení oxidační stability lipidů masa a vajec. Rozdělují se na karoteny a xanthofyly. Karoteny jsou provitaminy A. Na vznik 1 mg vitamínu A je třeba 12 mg β -karotenu nebo dvojnásobek α - a γ -karotenu (Skřivan a kol., 2015).

Využití karotenoidů a schopnost pohybovat pigmentací se liší druh od druhu. Přežvýkavci hromadí hlavně karoten a ptáci oxykarotenoidy (Dunne et al., 2009). Ptáci karotenoidy nemohou syntetizovat, pigmentace kůže nebo vajec je tak přímo závislá na jednotlivých složkách potravy a polaritě karotenoidů (Na et al., 2004).

Karotenoidy ztrácí své pigmentační vlastnosti, když se metabolizují na vitamin A; tuto vlastnost mají všechny karotenoidy mající podobnou strukturu, která je podobná β -karotenu (Lietz et al., 2010). Přesto působí jako systém odstraňující volné radikály, absorbující a rozptylující přebytečnou energii vysoce reaktivních chemických látek (Rocha et al., 2010).

U ptáků je na vitamin A přeměněn jen α -karoten, β -karoten a kryptoxanthin nacházející se v přírodních krmných surovinách (Rocha et al., 2010). Karotenoidy představují skupinu téměř 600 sloučenin, ale pouze 50 z nich má aktivitu provitaminu A (Palace et al., 1999).

Z výsledků studie Skřivana a kol. (2015) vyplývá, že konverze karotenoidů z krmiva do vajec je vysoká. Pouze β -karoten se z krmiva do žloutku dostává v malém množství (Skřivan a kol., 2015).

3.5.1 Syntetické zdroje karotenoidů

Anorganické sloučeniny jsou toxičtější než ty organické (Suchý et al., 2014).

Skřivan a kol. (2015) ve své studii při srovnávání vlastních experimentů, tvrdí, že nosnice s dietou se syntetickými karotenoidy měly nejlepší konverzi krmiva a největší produkci vajec.

V intenzivních chovech se používají k barvení vaječného žloutku zejména syntetické karotenoidy jako je ethyl-ester kyseliny β -apo-8'-karotenové a kantaxanthinu, známé jako Carophyll Red a Carophyll Yellow. Ale právě kantaxanthin je považován za jednu z potenciálně nebezpečných látek pro lidské zdraví. Evropská agentura pro bezpečnost potravin proto omezila koncentraci kantaxanthinu v krmných směsích pro nosnice na 8 mg/kg, protože extrémně vysoké dávky mohou být spojovány s výskytem krystalických usazenin na sítnici (Skřivan a kol., 2015).

3.5.2 Přírodní zdroje karotenoidů

Přírodní karotenoidy na rozdíl od syntetických nejsou stálé a jejich použití je omezeno i jejich cenou (Englmaierová et al., 2014). Nachází se v tkáních zelených rostlin, obvykle se pojí s chlorofylem v chloroplastech. Množství karotenu a jiných karotenoidů prekurzorů vitamínu A v trávě se liší podle druhu rostliny a stadiu růstu (Bauernfeind et al., 1981).

Jako přírodní zdroj xanthofylů, především luteinu, je komerčně dostupný extrakt z květu afrikánu (Skřivan et al., 2015). Skřivan a kol. (2015) zjistili, že přidavek extraktu zvyšuje intenzitu snášky a produkci hmoty vajec, zvyšuje barvu žloutku a snižuje jeho světlost. Také čím větší přidavek extraktu, tím větší obsah luteinu a zeaxanthinu ve žloutku. Na konverzi a příjem krmiva nemá vliv (Skřivan a kol., 2015).

Z výzkumu Englmaierové et al. (2013) lze říci, že pro zvýšení koncentrace zdravích prospěšných karotenoidů ve žloutku lze namísto syntetických zdrojů použít lutein nebo sprejově sušenou řasu *Chlorella*. Tyto aditiva ve směsi zvyšují produkci a kvalitu vajec (Englmaierová et al., 2013).

Pastva je také jednou z možností přídavku antioxidantů do diety (Skřivan a kol., 2015). Je to přírodní metoda krmení zvířat (Skřivan et al., 2013). Skřivan a kol. (2015) zjistili, že nosnice z pastvy mají větší podíl žloutku. Vzrostl obsah karotenoidů a alfa-tokoferolu a zvýšila se sytost zbarvení žloutku.

Ale přestože je pastva přirozeným způsobem výživy drůbeže, z pohledu kvality výsledného produktu není ideální, neboť chovatel má menší vliv na obsah živin v dietě nosnice (Skřivan a Englmaierová, 2015).

Dalším zdrojem karotenoidů může být například mrkev (Englmaierová et al., 2014). β -karoten je zde zastoupen z 85 % (Racek, 2003). Karotenoidy nalezneme také v čiroku nebo v kukuřici. Oxykarotenoidy jsou primárně zodpovědné za žlutou barvu kukuřice (Bauernfeind et al., 1981).

4 Metodika práce

4.1 Teoretická část:

V teoretické části této bakalářské práce byl proveden systematický přehled zahrnující poznatky obecně o antioxidantech, jejich rozdělení a charakteristice jednotlivých antioxidantů, uplatnění jednotlivých antioxidantů ve výživě drůbeže, zejména vitamínu C a karotenoidů. Relevantní zdroje byly hledány v databázích Web of Science, Science Direct a Google Scholar. K vyhledávání byla primárně použita tato klíčová slova: antioxidanty, oxidační stabilita, drůbež, nosnice, vejce a pastva (v anglickém jazyce: antioxidants, oxidative stability, poultry, laying hens, eggs, feed).

4.2 Praktická část:

4.2.1 Slepice, krmné směsi, ustájení

Pokus byl zaměřen na sledování vlivu přídatku vitamínu C a vojtěškových úsušků do krmné směsi na jejich užitek a kvalitu vajec nosnic. Pokus se realizoval v pokusné stáji Výzkumného ústavu živočišné výroby, v.v.i v Praze v Uhříněvsi. Do pokusu bylo zařazeno 240 nosnic Hisex Brown ve věku 39 – 53 týdnů. Pokus trval 14 týdnů včetně 2 týdnů přípravného období. Slepice byly ustájeny po deseti kusech v obohacených klecích a zařazeny do 6 skupin se 4 opakováními podle množství přidaného vitamínu C (0, 100 a 200 mg/kg) a vojtěškových úsušků (0 a 40 g/kg) do krmné směsi. Kontrolní skupina byla bez přídatku vitamínu C a vojtěškových úsušků, druhá skupina byla s přídatkem 100 mg/kg krmné směsi vitamínu C. Třetí skupině byl podáván vitamin C v množství 200 mg/kg krmiva. Čtvrtá, pátá a šestá skupina měla množství vitamínu C shodná se skupinou jedna, dva a tři a navíc přídatek 40 g vojtěškových úsušků na kg krmné směsi. Schéma pokusu je uvedeno v Tabulce 1.

Krystalická kyselina askorbová byla získána od firmy Trouw Nutrition Biofaktory s.r.o., Praha. Askorbyl monofosfát, Lutavit ® C monofosfát 35, vyrábí Orffa Nederland Feed BV, Giessen, Nizozemsko a v ČR distribuuje Trouw Nutrition Biofaktory s.r.o. Lutavit obsahuje minimálně 350 g/kg kyseliny askorbové, aktivní složkou je L-askorbová kyselina-2-monofosfát-vápenato-sodná sůl $\times 3\text{H}_2\text{O}$. Velikost: 98 % částí je <0,5 mm. Vitamin C byl přidán nejdříve do vitamino-minerálního doplňku Aminovitan a poté zamíchán do krmné směsi.

Tabulka 1. Schéma pokusu

Skupina	Vitamin C	Vojtěškové úsušky
	(mg/kg)	(g/kg)
I	0	0
II	100	0
III	200	0
IV	0	40
V	100	40
VI	200	40

Technologické a mikroklimatické podmínky ustájení odpovídaly technologickému postupu daného hybridu. Délka světelného dne byla 16 hodin (02:30 – 18:30). Slepice byly krmeny *ad libitum*. Složení krmné směsi je v Tabulce 2. Vzorky krmných směsí, vojtěškových úsušků a zdroje vitaminu C byly jedenkrát za období realizace pokusu odebrány k analýze obsahu vitaminu C a karotenoidů (lutein, zeaxanthin, β -karoten). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3. Spotřeba krmné směsi byla zaznamenávána týdně na klec. Snáška a zdravotní stav slepic byly zjišťovány denně.

Tabulka 2. Složení krmné směsi¹

Komponenta (%)	KS I	KS IV
Pšenice	31,00	30,00
Kukuřice	25,12	25,35
SEŠ	26,50	25,00
Vojtěškové úsušky	0,00	4,00
Celulóza	1,70	0,00
Řepkový olej 00	4,00	4,00
Dihydrogenfosforečnan vápenatý	1,03	1,00
Vápenec drcený	9,50	9,50
Chlorid sodný	0,30	0,30
L-Lys hydrochlorid	0,20	0,20
DL-Met	0,15	0,15
Aminovitan	0,50	0,50

¹Další experimentální krmné směsi byly obohaceny vitaminem C v množství 100 a 200 mg/kg

Tabulka 3. Obsah vitamínu C a karotenoidů v krmných směsích, vojtěškových úsušcích a zdroji vitamínu C

Krmná směs/doplněk	Vitamin C (mg/kg)	Lutein (mg/kg)	Zeaxantin (mg/kg)	β-karoten (mg/kg)
I	1,50	0,88	0,69	0,103
II	67,40	0,91	0,71	0,097
III	142,51	0,81	0,65	0,089
IV	7,45	2,91	2,60	2,344
V	69,41	3,40	3,09	2,675
VI	146,85	3,35	3,18	2,348
Vojtěškové úsušky	77,60	86,3	90,3	24,8
Vitamin C	671150,50	-	-	-

4.2.2 Technologická hodnota vajec

Vejsce pro stanovení technologické hodnoty vajec byla odebírána ve 28 denním intervalu. Vejce byla sbírána v 7:00. Ihned následovalo stanovení ukazatelů technologické hodnoty vajec. Celkem bylo zanalyzováno 620 ks vajec. Hmotnost vejce se zjišťovala na běžných elektronických laboratorních váhách. Kvalita bílku byla vyjádřena pomocí Haughových jednotek a indexu bílku. Haughovy jednotky byly spočítány dle vzorce (Haugh, 1937). Index bílku byl vypočten takto: $IB = (VB/((\check{S}B+DB)/2)) * 100$, kde VB je výška tuhého bílku změřená mikrometrickou hlavicí (Mitutoyo, Kawasaki, Japan). Šířka ($\check{S}B$) a délka tuhého bílku (DB) byly měřeny kolmo na sebe posuvným měřítkem. Žloutek byl hodnocen na základě indexu žloutku a barvy žloutku. Index žloutku byl spočten pomocí vzorce $IZ = (VZ/((\check{S}\check{Z}+\check{S}\check{Z})/2)) * 100$, ve kterém výška žloutku (VŽ) byla změřena mikrometrickou hlavicí (Mitutoyo, Kawasaki, Japan) a rozměry šířky žloutku ($\check{S}\check{Z}$) byly měřeny kolmo na sebe posuvným měřítkem. Barva žloutku byla stanovena pomocí škály barev DSM (DSM Nutritional Products, Basel, Switzerland). Pevnost skořápky byla vyhodnocena přístrojem Instron 3360 (Instron, Canton, USA).

4.2.3 Chemické analýzy

Vejce pro stanovení vitamínu A a karotenoidů ve žloutcích byla sbírána v 6. týdnu pokusu (3 vejce na vzorek, $n = 8$) a pro stanovení oxidační stability lipidů ve žloutcích v 8. týdnu (3 vejce na vzorek, $n = 6$).

Obsah vitamínu A ve žloutcích byl stanoven dle evropské normy EN 12823-1 (2000). Obsah luteinu a zeaxanthinu v krmivu a ve vejcích byl měřen v souladu s metodou kapalinovou chromatografií (HPLC) dle metody Froescheis et al. (2000). Jeden gram homogenizovaného vzorku byl umístěn do plastové zkumavky spolu s 20 ml acetonu. Po mixování ve vortexu (2 minuty) se vzorek chladil v ledu po dobu 10 minut a odstředil se při 13000 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Supernatant byl přenesen do skleněné baňky a zbytek se extrahoval ještě jednou postupem popsáním výše. Spojené extrakty byly odpařeny do sucha při teplotě 50 °C s profouknutím N₂, zbytek se rozpustil ve 2 ml směsi ethanol-voda (1:1, v/v) a extrahoval se dvakrát s hexanem (4 a 2 ml). Každý krok extrakce se provedl mixováním ve vortexu po dobu 2 minut s následným odstředěním při 13000 g (10 min, 4 °C). Po odpaření spojených organických fází do sucha při 50 °C a profouknutí N₂ byl zbytek rozpuštěn v 1 ml směsi hexan/dichlormethan (1:1, v/v). Alikvotní část 60 ml byla analyzována HPLC (VP series, Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Byla použita kolona Kinetex C18 (100 x 4,6 mm, 2,6 μm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Gradientová eluce zahrnovala jako mobilní fázi A acetonitril:voda:ethylacetát (88:10:2) a jako mobilní fázi B acetonitril:voda:ethylacetát (88:0:15).

Obsah β-karotenu v krmné směsi, vojtěškových úsušcích a ve vejcích byl stanoven v souladu s evropskou normou EN 12823-2 (2000) systémem HPLC (VP series, Shimadzu, Kyoto, Japonsko) vybaveným detektorem s diodovým polem. Vzorky byly podrobeny alkalickému zmýdelnění pomocí 60% hydroxidu draselného, následně se směs extrahovala diethyletherem. Byl použit standard β-karoten (čistota >97,0 %, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).

Modifikovaná evropská norma EN 14130 (2004) byla použita ke stanovení obsahu vitamínu C (kyselina askorbová a kyselina dehydroaskorbová). Vzorky krmiva a doplňků krmných směsí byly homogenizovány, a vitamin C byl extrahován za použití 2% kyseliny metafosforečné (MPA). Vzorky byly filtrovány přes membránový filtr (0,22 μm) a byly analyzovány pomocí HPLC s použitím Synergi 4 μ Fusion-RP 80A kolony (Phenomenex,

Torrance, CA, USA) a gradientové eluce (25 mM KH₂PO₄:acetonitril). Hodnota pH 25 mM KH₂PO₄ byla upravena na 3 pomocí 20% MPA. Jako standard byl použit L (+)-Ascorbic acid puriss (čistota ≥99,7 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).

Peroxidace lipidů ve žloutcích byla měřena u čerstvých vajec a vajec, která byla skladována po dobu 28 dní při teplotě 18 °C. Byla použita modifikovaná metoda Konieczka et al. (2014). Půl gramu vzorku (vaječného žloutku) bylo zmýdelněno působením 5 ml 1 M KOH a 50 µl 0,02 M 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresolu (BHT) v metanolu. Směs byla v plastové zkumavce umístěna na 1 hodinu do vodní lázně o teplotě 60 °C, kde byla kontinuálně míchána za temna. Poté se nechal výsledný roztok zchladnout a okyselil se koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou přibližně na pH 2. Následně byl okyselený roztok hydrolyzátu 10 min odstředován. K odebranému supernatantu (500 µl) byl přidán roztok 2,4-dinitrophenylhydrazinu (DNPH). Výsledná směs byla intenzivně míchána při teplotě 50 °C po dobu 1 hodiny ve tmě. Čirý roztok byl přenesen do vialky a pak 40 µl roztoku bylo nastříknuto do kolony za účelem chromatografické analýzy (HPLC). Byl použit kapalinový chromatograf (VP series, Shimadzu, Kyoto, Japonsko) vybavený detektorem s diodovým polem. Kolona byla zvolena Phenomenex C₁₈ (Synergi 2.5 µm, Hydro-RP, 100 Å, 100 mm x 3 mm). Vzorky byly analyzovány pomocí binárního gradientu acetonitrilu ve vodě. Solvent A se sestával z voda-acetonitril (95:5, v/v) a solvent B z acetonitrilu. Látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) byly vyjádřeny v miligramech malondialdehydu na kilogram.

4.2.4 Statistická analýza

Zjištěné výsledky byly zpracovány dvoufaktoriální analýzou variance (ANOVA) pomocí general linear modelu (GLM) programem SAS (SAS Institute, 2003). Hlavními faktory byly vitamin C a vojtěškové úsušky a interakce mezi těmito faktory. Pravděpodobnost menší než 0,05 byla považována za průkaznou. Výsledky v tabulkách jsou uvedeny jako průměry se SEM (střední chyba průměru) hodnotami.

5 Výsledky a diskuze

Během experimentu byl sledován vliv přídatku vitamínu C a vojtěškových úsušků do krmné směsi nosnic na jejich užitkovost a kvalitu vajec. Kvalitu vajec lze posuzovat na základě ukazatelů jejich technologické hodnoty.

V Tabulce 4 jsou uvedené výsledky týkající se vlivu přídatku vojtěškových úsušků a vitamínu C do krmiva nosnic na jejich užitkovost. Vitamin C ($P=0,017$) i vojtěškové úsušky ($P<0,001$) prokazatelně snížily snášku. Negativní vliv vojtěškových úsušků byl zaznamenán i u spotřeby krmné směsi na kilogram vaječné hmoty ($P<0,001$). Vliv vitamínu C spolu s vojtěškovými úsuškami na intenzitu snášky i spotřebu krmiva na kilogram vaječné hmoty nebyl průkazný.

K opačnému výsledku u vitamínu C došli Skřivan a kol. (2015), při srovnávání účinků kombinace selenu a vitamínu C. Samotný vitamin C v množství 150 mg/kg krmné směsi, zvýšil snášku a snížil příjem a konverzi krmiva ($P<0,05$). Negativní vliv krmení vojtěškovými lístky ($P<0,05$) na užitkovost nosnic zaznamenali také Al-shami et al. (2011).

Tabulka 4. Ukazatelé užitkovosti slepic

Ukazatel	Vojtěškové úsušky (VU; g/kg)	Vitamin C (C; mg/kg KS)			SEM	Průkaznost		
		0	100	200		C	VU	C*VU
Intenzita snášky (%)	0	88,3	86,9	85,3	0,44	0,017	<0,001	NS
	40	85,2	81,7	82,9				
Spotřeba krmiva (kg)/kg vaječné hmoty	0	2,47	2,52	2,56	0,131	NS	<0,001	NS
	40	2,61	2,63	2,62				

V Tabulce 5 byla zjištěna vysoce průkazná interakce vojtěškových úsušků a vitamínu C u hmotnosti vajec ($P < 0,001$). Nejtěžší vejce byla snesena slepicemi, kterým byla podávána krmná směs se 100 mg/kg vitamínu C (67,9 g). Naopak nejlehčí pocházela od slepic se stejnou úrovní vitamínu C v kombinaci se 40 g/kg vojtěškových úsušků (65,4 g). Individuální vliv přídatku vitamínu C nebo vojtěškových úsušků na hmotnost vajec nebyl zaznamenán.

Přítomnost vitamínu C v krmivu slepic průkazně zvýšila index bílku ($P < 0,001$), Haughovy jednotky ($P < 0,001$) i index žloutku ($P < 0,001$). Všechny tři hodnoty byly nejvyšší u skupiny, která měla ve směsi nejvíce vitamínu C (200 mg/kg KS). Vliv přídatku vojtěškových úsušků na index bílku, Haughovy jednotky a index žloutku nebyl vysledován v porovnání s vitamínem C, stejně jako účinek přídatku obou komponent.

Pro porovnání účinků vitamínu C, Skřivan et al. (2013) ve své studii u samostatného přídatku vitamínu C nezaznamenali žádné průkazné rozdíly u technologických hodnot vajec. Podle výsledků této studie vitamin C pouze významněji snížil žlutost žloutku ($P < 0,05$).

Sytost barvy žloutku se podle stupnice La Roche signifikantně zvýšila vlivem přídatku vojtěškových úsušků ($P < 0,001$). Ke shodnému výsledku ($P < 0,05$) dospěli i Al-shami et al. (2011) a Karadas et al. (2006). Neprůkazné zvýšení hodnot barvy žloutku bylo zaznamenáno po přidání vitamínu C v množství 100 a 200 mg/kg do krmných směsí s vojtěškovými úsušky.

Přídavek vojtěškových úsušků průkazně ($P = 0,003$) snížil pevnost skořápky. Nejtvrďší skořápka (46,7 N) byla u skupiny s nejvyšším přídatkem vitamínu C bez přídatku vojtěškových úsušků. Nejméně pevnou (43,0 N) skořápku měla skupina s přídatkem vojtěškových úsušků a bez přidaného vitamínu C. Po přidání do krmiva proteinového výtažku z vojtěšky, naměřili Grela et al. (2014) stejně nepříznivé hodnoty pro pevnost skořápky.

Tabulka 5. Technologická hodnota vajec

Ukazatel	Vojtěškové		Vitamin C			SEM	Průkaznost		
	úsušky (VU; g/kg)	(C; mg/kg KS)			C		VU	C*VU	
		0	100	200					
Hmotnost vejce (g)	0	65,8 ^{bc}	67,9 ^a	65,9 ^{bc}	0,19	NS	NS	<0,001	
	40	66,8 ^{ab}	65,4 ^c	66,8 ^{ab}					
Index bílku (%)	0	8,6	8,9	9,3	0,07	<0,001	NS	NS	
	40	8,7	8,7	9,4					
Haughovy jednotky	0	82,9	83,9	85,5	0,26	<0,001	NS	NS	
	40	83,3	82,8	85,3					
Index žloutku (%)	0	41,7	42,4	42,5	0,12	<0,001	NS	NS	
	40	41,0	42,5	43,4					
La Roche	0	6,3	6,2	6,2	0,07	NS	<0,001	NS	
	40	8,2	8,4	8,4					
Pevnost skořápky (N)	0	46,3	45,5	46,7	0,32	NS	0,003	NS	
	40	43,0	45,3	44,5					

^{abc}Hodnoty patřící ke stejnému ukazateli označené jiným písmem než předchozí se průkazně liší; NS = neprůkazný.

V Tabulce 6 je zaznamenáno množství jednotlivých karotenoidů a vitamínu A a oxidační stabilita vaječného žloutku. Přídavek vitamínu C ($P < 0,001$) i přídavek vojtěškových úsušků ($P < 0,001$) samostatně i v kombinaci ($P = 0,002$) významně zvýšili obsah zeaxanthinu ve žloutku.

Obsah luteinu nejvíce ovlivnil přídavek vojtěškových úsušků ($P < 0,001$). Zvýšení obsahu luteinu ve žloutku bylo pozorováno i s rostoucí koncentrací vitamínu C v krmivu ($P = 0,021$). Vliv přídavků obou komponent na obsah luteinu nebyl průkazný.

Výsledky vlivu vojtěškových úsušků na obsah karotenoidů jsou shodné s výsledky výzkumu Mattioli et al. (2016) a Karadas et al. (2006), kdy samotný přídavek vojtěšky do směsi významně zvýšil obsah luteinu a zeaxanthinu ve žloutku ($P < 0,05$).

Vojtěškové úsušky signifikantně ($P < 0,001$) zvýšily obsah vitamínu A ve žloutku. Přídavek vitamínu C do krmných směsí s vojtěškovými úsuškami snížil obsah vitamínu A ve žloutku ($P = 0,002$). Nejvyšší obsah vitamínu A (12,01 mg/kg DM) měla skupina s přídavkem vojtěškových úsušků a bez přídavku vitamínu C.

Samostatný vitamin C ve směsi obsah vitamínu A nevýznamně zvýšil. Skřivan et al. (2013) došli ve svém výzkumu k opačnému výsledku. Vitamin C nesignifikantně snížil množství vitamínu A ve žloutku.

Obsah β -karotenu nejvýrazněji zvýšily vojtěškové úsušky ($P < 0,001$). Ke shodnému výsledku došli i Mattioli et al. (2016) a Karadas et al. (2006) po přidání vojtěšky k základní krmné směsi.

Oxidační stabilita žloutků byla hodnocena na základě obsahu reaktivních látek s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS). Nižší hodnoty a tudíž vyšší oxidační stabilita žloutků byla zaznamenána u čerstvých vajec slepic, kterým byly zkrmovány vojtěškové úsušky ($P < 0,001$). Oxidační stabilita žloutků vajec skladovaných 28 dní nebyla ovlivněna testovanými látkami.

Skřivan a kol. (2015) publikoval při srovnávání účinků kombinace selenu a vitamínu C opačné zjištění v případě přídavku vitamínu C. Vitamin C snížil oxidační stabilitu lipidů žloutku.

Skřivan a Englmaierová (2015) v jednom z vlastních pastevních pokusů zaznamenali zvýšení obsahu luteinu, zeaxanthinu a β -karotenu ve vejcích nosnic, jež měli na pastvě neomezený přístup ke krmné směsi. Zjistili, že ad libitní příjem krmné směsi snižuje zájem slepic o pastvu. Pastva zvýšila zabarvení žloutku dle stupnice DSM a zvýšila hmotnost vejce. Zvýšení obsahu vitamínu E ve žloutku snížilo snášku. Druhý pastevní pokus Skřivan a Englmaierová (2015) prováděli na nosnicích z nichž jedna skupina byla ustájena v pevném výběhu bez porostu, ale měla doplněnou krmnou směs, zatímco druhá skupina měla volný přístup do pastevního výběhu. V porovnání s prvním pokusem měla krmná směs koncentrovanější obsah živin a výsledný obsah karotenoidů ve vejcích byl téměř trojnásobně vyšší.

Ve srovnání s publikovanými výsledky Skřivana a Englmaierové (2015) z pastevního výzkumu, použití vojtěškových úsušků mělo podobné výsledky a bylo dobrou náhražkou pastvy za účelem významného zvýšení sytosti barvy žloutku ($P < 0,001$) a zvýšení obsahu luteinu ($P < 0,001$) a vitamínu A ($P < 0,001$) ve vejcích. Na úkor snížení snášky ($P < 0,001$) a zvýšení spotřeby krmiva ($P < 0,001$).

Tabulka 6. Obsah karotenoidů a vitamínu A a oxidační stabilita vaječného žloutku

Ukazatel	Vojtěškové		Vitamin C			SEM	Průkaznost		
	úsušky (VU; g/kg)	(C; mg/kg KS)			C		VU	C*VU	
		0	100	200					
Zeaxantin (mg/kg DM)	0	4,57 ^c	5,40 ^c	5,90 ^c	0,825	<0,001	<0,001	0,002	
	40	14,25 ^b	17,33 ^a	17,25 ^a					
Lutein (mg/kg DM)	0	9,54	11,68	12,53	1,176	0,021	<0,001	NS	
	40	26,49	26,95	27,23					
vitamin A (mg/kg DM)	0	8,61 ^e	9,60 ^d	10,16 ^{cd}	0,219	NS	<0,001	0,002	
	40	12,01 ^a	11,82 ^{ab}	11,05 ^{bc}					
β-karoten (mg/kg DM)	0	<0,01	<0,01	<0,01	0,0094	NS	<0,001	NS	
	40	0,122	0,140	0,120					
TBARS 0. den (mg/kg)	0	0,326	0,323	0,305	0,0054	NS	<0,001	NS	
	40	0,281	0,288	0,230					
TBARS 28. den (mg/kg)	0	0,358	0,340	0,295	0,0067	NS	NS	NS	
	40	0,361	0,354	0,348					

^{abc}Hodnoty patřící ke stejnému ukazateli označené jiným písmem než předchozí se průkazně liší; NS = neprůkazný; DM = sušina; obsah látek reaktivních s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS) byl vyjádřen v miligramech malondialdehydu na kilogram vajec.

6 Závěr

Slepičí vejce patří mezi živinově nejpřírodnější a nejdostupnější potraviny. Proto se těší po celém světě velké oblibě a proto bychom jim měli věnovat zvýšenou pozornost. V EU bylo podle odhadu Evropské komise za rok 2015 vyrobeno 7,6 mil. tun vajec. Celková snáška konzumních vajec v České republice byla v roce 2015 2 174,2 mil. ks a z toho bylo celých 42,7 % sneseno v domácích hospodářstvích.

Cílem této práce byl popis vlivu složení diety slepic na kvalitu vajec, se zaměřením na jejich oxidační stabilitu. Byly popsány jednotlivé antioxidanty, jejich bezpečnost a uplatnění ve výživě slepic. Byly zpracovány výsledky experimentu na nosnicích, jehož cílem bylo sledovat vliv přídatku vitamínu C a vojtěškových úsušků v krmné směsi na užitek nosnic a kvalitu vajec.

U skupin nosnic s přídatkem vitamínu C ve směsi byla sebrána nejtěžší vejce (67,9 g) s nejtvrđší skořápkou (46,7 N). Bylo zaznamenáno významné zvýšení indexu bílku ($P < 0,001$), zvýšení indexu žloutku ($P < 0,001$), zvýšení Haughových jednotek ($P < 0,001$) a zvýšení obsahu luteinu ($P = 0,021$) a zeaxanthinu ($P < 0,001$) ve žloutku.

Vojtěškové úsušky samostatně významně zvýšily spotřebu krmiva ($P < 0,001$), zvýšily dle stupnice La Roche sytost žloutku ($P < 0,001$), zvýšily obsah luteinu ($P < 0,001$) a obsah vitamínu A ($P < 0,001$).

Na úkor zlepšených vlastností vajec se působením vitamínu C ($P = 0,017$) i vlivem vojtěškových úsušků ($P < 0,001$) u nosnic snížila snáška. V kombinaci vojtěškových úsušků s vitamínem C ($P = 0,002$) se ve žloutku snížil obsah vitamínu A. Nejlehčí vejce (65,4 g) pocházela od nosnic s krmnou směsí se 40g/kg vojtěškových úsušků spolu s vitamínem C v množství 100 mg/kg.

Z výsledků realizovaného experimentu vyplývá, že zvolená aditiva zlepšují kvalitu vajec, z toho nejlépe pak vitamin C. Ale působí nepříznivě na užitek, intenzitu snášky a spotřebu krmiva na kg vaječné hmoty.

7 Použitá literatura

- Al-shami, ., Salih, M., Abbas, T. 2011. Effects of dietary inclusion of alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaf meal and Xylam enzyme on laying hens' performance and egg quality. RESEARCH OPINIONS IN ANIMAL & VETERINARY SCIENCES. 2 (1). 14-18. ISSN: 2223-0343.
- Anderson, J., Sunderland, R. 2002. Effect of extruder moisture and dryer processing temperature on vitamin C and E and astaxanthin stability. *Aquaculture*. Elsevier. 207 (17). 137-149.
- Bauernfeind, J., Adams, C., Marusich, W. 1981. Carotenes and other vitamin A precursors in animal feed. Bauernfeind, J. Christopher, C. R. Adams a W. L. Marusich. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors: technological and nutritional applications. Academic Press. New York, N.Y. s. 563-743. ISBN: 0120828502.
- Davies, K., Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S., Hochstein, P. 1986. Uric acid-iron ion complexes: A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem. Journal*. Great Britain. 235 (1). 747-754.
- Dunne, P., Monahan, F., O'Mara, F., Moloney, A. 2009. Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: A review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history. *Meat science*. 81. 28-45.
- Englmaierová, M. 2013. Kombinace selenu s vitamíny E a C u drůbeže. *Veterinářství: Hospodářská zvířata*. 63 (4). 305-307.
- Englmaierová, M., Bubancová, I., Skřivan, M. 2014. Carotenoids and egg quality. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*. 17 (2). 55-57.
- Estévez, M. 2015. Oxidative damage to poultry: from farm to fork. *POULTRY SCIENCE*. 94 (6). 1368-1378.
- Felver-Gant, J., Dennis, R., Zhao, J., Cheng, H. 2014. Effects of Dietary Antioxidant on Performance and Physiological Responses Following Heat Stress in Laying Hens. *International Journal of Poultry Science*. 13 (5). 260-271.

- Grela, E., Ognik, K., Czech, A., Matras, J. 2014. Quality assessment of eggs from laying hens fed a mixture with lucerne protein concentrate. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 23 (237). 236-243.
- Jansen, T., Daiber, A. 2012. Direct antioxidant properties of bilirubin and biliverdin. Is there a role for biliverdin reductase?. *Frontiers in Pharmacology*. 3 (30).
- Karadas, F., Grammenidis, E., Surai, P., Adamovic, T., Sparks, N. 2006. Effect of carotenoid from lucerne, mariagold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. *British Poultry Science*. 47 (5). 561-566.
- Karre, L., Lopez, K., Getty, K. 2013. Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science*. Elsevier. 94 (2). 220-227.
- Keshavarz, K. 1996. The Effect of Different Levels of Vitamin C and Cholecalciferol with Adequate or Marginal Levels of Dietary Calcium on Performance and Eggshell Quality of Laying Hens. *Poultry science*. 75 (1). 1227-1235.
- Lietz, G., Lange, J., Rimbach, G. 2010. Molecular and dietary regulation of β,β -carotene 15,15'-monooxygenase 1 (BCMO1). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 502. 8-16.
- Marounek, M. 2006. Povaha a mechanismus účinku antioxidantů, význam ve výživě zvířat a lidí. VÚŽV Praha Uhřetěves.
- Mattioli, S., Dal Basco, A., Martino, M., Ruggeri, S., Marconi, O., Sileoni, V., Falcinelli, B., Castellini, C., Benincasa, P. 2016. Alfalfa and flax sprouts supplementation enriches the content of bioactive compounds and lowers the cholesterol in hen egg. *Journal of functional foods*. Elsevier. 22 (2). 454-462.
- Na, J., Song, J., Lee, B., Lee, S., Lee, C., An, G. 2004. Effect of polarity on absorption and accumulation of carotenoids by laying hens. *Animal Feed Science and Technology*. 117. 305-315.
- Palace, V., Khaper, N., Quin, Q., Singal, P. 1999. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology & Medicine*. Elsevier. USA. 26 (56). 746-761.
- Pal, L., Dubleczy, K., Husveth, F., Wágner, L., Bartos, Á., Kovács, G. 2002. Effect of dietary fats and vitamin E on fatty acid composition, vitamin A and E content and

oxidative stability of egg yolk. ARCHIV FÜR GEFLÜGELKUNDE. 66 (6). 251-257. ISSN: 0003-9098.

Perek, M., Kendler, J. 1962. Vitamin C supplementation to hen's diets in a hot climate. Poultry science. 41 (1). 677-678.

Perek, M., Kendler, J. 1963. Ascorbic acid as a dietary supplement for White Leghorn hens under conditions of climatic stress. British Poultry Science. 4 (2). 191-200.

Racek, J. 2003. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. 1. vyd. Galén. Praha. Repetitorium. ISBN: 80-726-2231-5.

Regenermelová, L. 2010. Co jsou antioxidanty a v čem se nacházejí. Zdravě.cz [online]. Lucie Regenermelová. [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <<https://zdrava-vyziva.zdrave.cz/co-jsou-antioxidanty-a-v-cem-se-nachazeji/>>

Rocha, J., Lara, L., Baiao, N., Vasconcelos, R., Barbosa, V., Pompeu, M., Fernandes, M. 2010. Antioxidant properties of vitamins in nutrition of broiler breeders and laying hens. WORLDS POULTRY SCIENCE JOURNAL. 66 (2). 261-270.

Skřivan, M., Englmaierová, M., Bubancová, I., Dlouhá, G. 2012. The stability of vitamin C and other vitamins in the diets of breeding hens. Animal Feed Science and Technology. 177. 253-258.

Skřivan, M. 2012. Stabilita vitamínu C a dalších vybraných vitamínů v krmných směsích pro drůbež: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav živočišné výroby. Praha-Uhřetěves. ISBN: 9788074030994.

Skřivan, M., Englmaierová, M. 2015. Chov slepic na pastvě zvyšuje obsah vitamínů a karotenoidů ve vejcích. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhřetěves.

Skřivan, M., Englmaierová, M., Skřivanová, E. 2015. Uplatnění selenu, přírodních a syntetických karotenoidů a vitamínu C ve výživě nosnic a brojlerových kuřat. VÚŽV Praha-Uhřetěves.

Skřivan, M., Marounek, M., Englmaierová, M., Skřivanová, V. 2013. Influence of dietary vitamin C and selenium, alone and in combination, on the performance of laying hens. Czech Journal Animal Science. 58 (2). 91-97.

Štípek, S., Borovanský, J., Čejková, J., Homolka, J. 2000. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. 1. vyd. Grada. Praha. ISBN: 8071697044.

Zduńczyk, Z., Drażbo, A., Jankowski, J., Juśkiewicz, J., Antoszkiewicz, Z., Troszyńska, A. 2013. The effect of dietary vitamin E and selenium supplements on the fatty acid profile and quality traits of eggs. ARCHIV FUR TIERZUCHT-ARCHIVES OF ANIMAL BREEDING. 56. 719-732.