

## Research Article

Vol. 18, No.1, 2026, p. 75-89



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

Soraya Ayatollahi<sup>1</sup>, Hassan Kermanshahi<sup>1\*</sup>, Reza Majidzadeh Heravi<sup>1</sup>

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

\*Corresponding Author's Email: [kermansh@um.ac.ir](mailto:kermansh@um.ac.ir)

Received: 28-07-2025

Revised: 02-11-2025

Accepted: 22-11-2025

Available Online: 04-04-2026

**How to cite this article:**Ayatollahi, S., Kermanshahi, H., & Majidzadeh Heravi, R. (2026). Effect of different levels of alfalfa carotenoids on yolk color, egg quality, and indicators of oxidative stress in laying hens. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 18(1), 75-89. (in Persian with English abstract).<https://doi.org/10.22067/ijasr.2025.94640.1263>

**Introduction:** Carotenoids, particularly lutein and  $\beta$ -carotene, are natural pigments with strong antioxidant properties, widely recognized for their role in improving yolk pigmentation and mitigating oxidative stress in poultry. The growing consumer demand for natural feed additives has prompted the exploration of plant-based sources rich in carotenoids. Alfalfa (*Medicago sativa* L.), a commonly cultivated forage crop, is a particularly promising source due to its high xanthophyll content, including lutein and zeaxanthin, which contribute to both pigmentation and antioxidant defense. While synthetic carotenoid products, such as Lucantin®, are widely utilized in commercial poultry production for yolk pigmentation, there is increasing interest in natural alternatives that can provide comparable efficacy while potentially enhancing consumer acceptance and sustainability. The present study was designed to evaluate the effects of different inclusion levels of alfalfa carotenoid extract in comparison with commercial Lucantin® on egg quality parameters and oxidative stress indicators in laying hens.

**Materials and Methods:** A total of 128 laying hens were randomly assigned to four dietary treatments using a completely randomized design, with four replicates of eight birds per replicate. The experimental treatments were as follows: C) control diet based on corn-soybean, A20) control diet supplemented with 20 g/ton alfalfa extract, A30) control diet supplemented with 30 g/ton alfalfa extract, and L35) control diet supplemented with 35 g/ton Lucantin®. Carotenoids were extracted from fresh alfalfa through a sequential solvent extraction method using ethanol, ethyl acetate, and hexane at three different temperatures (25°C, 40°C, and 60°C). The extract was subsequently filtered, subjected to rotary evaporation, and saponified using 40% potassium hydroxide to remove lipids. Total carotenoid content was quantified using UV-Vis spectrophotometry according to standard lutein protocols. Egg quality traits, including shell thickness, specific gravity, yolk color (assessed using DSM YolkFan™), yolk diameter, yolk height, yolk index (ratio of yolk height to diameter), and Haugh unit, were measured at weeks 2, 4, 6, and 8. Plasma samples collected at week 8 were analyzed for oxidative stress markers, including malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation indicator, as well as the activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and total antioxidant capacity (TAC). Statistical analyses were performed using the General Linear Model (GLM) procedure of SAS 9.4, and differences among treatment



Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)

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

means were evaluated by Duncan's multiple range test.

**Results and Discussion:** Dietary supplementation with both alfalfa carotenoid extract and Lucantin® significantly improved yolk pigmentation compared to the control group ( $P < 0.0001$ ), with the Lucantin®-supplemented group exhibiting the highest color index among all treatments. Malondialdehyde (MDA) levels, representing the extent of lipid peroxidation and oxidative damage, were significantly lower in A20 and A30 compared to the control ( $P = 0.0233$ ), indicating enhanced systemic antioxidant status. Although no statistically significant differences were observed in the activities of antioxidant enzymes (SOD, GPx, and CAT) among the treatment groups ( $P > 0.1$ ), upward trends were evident in the carotenoid-supplemented groups, suggesting potential improvements in enzymatic antioxidant defense. The yolk index, an important indicator of internal yolk quality reflecting the ratio of yolk height to diameter, did not differ significantly among treatments during the first two weeks of supplementation ( $P > 0.2$ ). However, by week six, both A30 and L35 treatments exhibited significantly higher yolk index values compared to the control and A20 groups ( $P = 0.016$ ), with A30 achieving the highest yolk index overall. These findings indicate that both natural alfalfa-derived carotenoids and synthetic Lucantin® can improve yolk structural integrity, likely due to the antioxidant properties of lutein and zeaxanthin, which stabilize yolk microstructure and reduce lipid oxidation. Shell thickness remained unaffected across all treatments during the experimental period ( $P > 0.3$ ), and specific gravity, an indicator of internal egg quality and water-to-dry matter ratio, also showed no significant differences among dietary groups ( $P > 0.25$ ). Similarly, yolk diameter was not significantly altered by dietary supplementation ( $P > 0.05$ ), indicating that carotenoid addition primarily influenced yolk pigmentation and consistency rather than gross yolk size.

**Conclusion:** The current study demonstrates that dietary supplementation with alfalfa-derived carotenoids at a level of 30 g/ton effectively enhances egg yolk pigmentation and supports systemic antioxidant defense in laying hens. These effects were comparable to, and in some parameters even superior to, those observed with synthetic Lucantin®. The results highlight the potential of alfalfa as a sustainable, natural alternative to synthetic carotenoids in poultry diets, providing both functional benefits in oxidative stress mitigation and improvements in egg quality traits. Incorporating alfalfa carotenoid extract into layer diets represents a promising strategy for producing high-quality eggs with enhanced consumer acceptance, supporting both health-promoting and economically viable poultry production practices.

**Keywords:** Antioxidant status, Lipid peroxidation, Natural feed additives, Poultry nutrition, Xanthophylls

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

ثریا آیت اللهی<sup>۱</sup>، حسن کرمانشاهی<sup>۱\*</sup>، رضا مجیدزاده هروی<sup>۱</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۰۱

### 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.

**واژه های کلیدی:** افزودنی های طبیعی خوراک، تغذیه طیور، پراکسیداسیون لیپیدها، زانوفیل ها، وضعیت آنتی اکسیدانی

### مقدمه

پرند و بهبود کیفیت فرآورده های حاصل و در نتیجه سلامت مصرف کنندگان مؤثرند (Nimalaratne & Wu, 2015). لوتئین و زی زانتین<sup>۳</sup> موجود در زرده تخم مرغ به دلیل زیست فراهمی بالاتر نسبت به منابع گیاهی، توجه بسیاری را در صنعت غذا و سلامت به خود جلب کرده اند. طبق مرور مطالعات انجام شده، مصرف تخم مرغ غنی از لوتئین و زی زانتین می تواند به بهبود عملکرد بینایی، محافظت از شبکیه چشم در برابر آسیب های نوری و تقویت عملکرد آنتی اکسیدانی بدن کمک کند (Zaheer, 2017).

یونجه<sup>۴</sup> به عنوان یکی از گیاهان غنی از رنگدانه های کاروتنوئیدی، به خصوص لوتئین، بتاکاروتن و زی زانتین شناخته می شود (Englmaierová et al., 2019). این ترکیبات در بافت های برگ و ساقه گیاه تجمع می یابند و از نظر ساختار شیمیایی به خوبی در

در صنعت تولید تخم مرغ، یکی از شاخص های مهم کیفیت محصول که در ترجیح مصرف کننده نقش کلیدی دارد، رنگ زرده است. رنگ زرده عمدتاً ناشی از حضور رنگدانه های طبیعی از جمله کاروتنوئیدها در خوراک طیور می باشد (Abdel-Aal et al., 2017). کاروتنوئیدها، گروهی از ترکیبات طبیعی محلول در چربی هستند که از طریق جیره، قابلیت انتقال به تخم مرغ را دارند (Dansou et al., 2023) و علاوه بر نقش رنگ دهی، به عنوان آنتی اکسیدان های قوی عمل کرده و در کاهش تنش اکسیداتیو<sup>۲</sup>، افزایش سلامت عمومی

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

(\*) نویسنده مسئول: Email: [kermansh@um.ac.ir](mailto:kermansh@um.ac.ir)

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

2- Oxidative stress

3- Zeaxanthin

4- *Medicago sativa*

بازده استخراج و کیفیت عصاره‌های کاروتنوئیدی به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر نوع حلال مورد استفاده قرار می‌گیرد. حلال‌های مختلف مانند اتانول، اتیل‌استات و هگزان به‌دلیل تفاوت در قطبیت و توانایی انحلال ترکیبات لیپوفیلیک، عملکرد متفاوتی در استخراج رنگدانه‌ها از ماتریکس<sup>۱</sup> گیاهی نشان می‌دهند، بنابراین انتخاب نوع حلال می‌تواند بر مقدار رنگدانه‌های بازیابی‌شده 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 زرد متداول است، اما نگرانی‌های مربوط به ایمنی غذایی و اثرات زیست‌محیطی موجب افزایش تمایل به جایگزینی آن‌ها با منابع طبیعی کاروتنوئیدی شده است (Yunitasari et al., 2023). مطالعات نشان می‌دهند که مصرف خوراک‌های حاوی رنگدانه طبیعی می‌تواند ضمن بهبود رنگ زرد موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی (کاهش مالون‌دی‌آلدئید<sup>۲</sup>) و افزایش ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی پلاسما (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام<sup>۳</sup>، افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیس‌موتاز<sup>۴</sup> و کاتالاز<sup>۵</sup>) در طیور تخم‌گذار گردد (Madkour 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 این رو، 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 به‌دست‌آمده بر رنگ زرد 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 هشت هفته در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار

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 زرد 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 علاوه‌بر 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 پرنده و ورود احتمالی فرآورده‌های اکسیداسیون لیپیدی و رنگدانه‌های با پایداری پایین به زنجیره غذایی انسان شود. مصرف طولانی‌مدت یا دوزهای بالای رنگدانه‌های سنتتیک می‌تواند با ایجاد تنش اکسیداتیو، التهاب خفیف بافتی و تغییر در کیفیت چربی زرد همراه باشد که از دیدگاه ایمنی غذایی، مورد توجه مصرف‌کنندگان و نهادهای نظارتی قرار گرفته است. رنگدانه‌های طبیعی به‌دلیل 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 زرد از جمله رنگ، ارتفاع و شاخص زرد شوند (Nabi et al., 2020). در مقابل، رنگدانه‌های سنتتیک اغلب 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 زرد 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.

1- Matrix

2- Malondialdehyde

3- Total antioxidant capacity

4- Superoxide Dismutase

5- Catalase

قطبیت و قدرت حلالیت، نقش بسزایی در بازیابی طیف‌های مختلف کاروتنوئیدها دارند. هگزان به‌عنوان حلال غیرقطبی، توانایی بالایی در استخراج کاروتنوئیدهای لیپوفیلک دارد، اتانول با قطبیت متوسط قادر است ترکیبات قطبی‌تر را استخراج کند و اتیل استات نیز به‌عنوان حلالی با قطبیت نسبی، برای استخراج ترکیبات با قطبیت متوسط مناسب است (Bednarik, 2013; Jiang et al., 2024). استخراج نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دماهای ۲۵، ۴۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا زمانی انجام شد که لایه آلی کاملاً بی‌رنگ گردید، چرا که نشان‌دهنده استخراج کامل بود. نمونه‌ها پس از عبور از فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرون، تحت خلأ و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دستگاه روتاری تبخیر شدند. عصاره به‌دست‌آمده شامل استر لوتئین همراه با اسیدهای چرب بود (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004; King & Wang, 2004).

#### جداسازی لوتئین

برای تفکیک لوتئین از استرهای اسید چرب، عصاره تغلیظ‌شده با محلول ۴۰ درصد پتاسیم هیدروکسید<sup>۴</sup> به مدت دو ساعت در دمای کنترل‌شده صابونی‌سازی<sup>۵</sup> گردید. پس از صابونی شدن و سانتریفیوژ، فاز روپی استونی با دقت و به‌آرامی روبرداری<sup>۶</sup> 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 سانتی‌گراد قرار گرفت تا کریستال‌های زرد رنگ لوتئین شکل گرفتند. کریستال‌ها جهت اندازه‌گیری و آنالیزهای بعدی حفظ شدند (King & Wang, 2004).

#### تعیین غلظت کاروتنوئید کل و لوتئین

غلظت کاروتنوئید کل و لوتئین توسط اسپکتروفتومتری<sup>۷</sup> در محدوده طول موج ۲۱۰ تا ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. استاندارد لوتئین (۹۵ درصد خلوص، سیگما<sup>۸</sup>، آمریکا) برای رسم منحنی استاندارد و محاسبه غلظت کاروتنوئید کل مورد استفاده قرار گرفت. میزان کاروتنوئید کل با توجه به معادله ۱ محاسبه شد.

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

و چهار تکرار اجرا شد. هر تکرار شامل هشت پرندۀ نگهداری‌شده در قفس بود. در این مطالعه از مرغ‌های تخم‌گذار سویه شیور سفید<sup>۱</sup> در ۵۹ هفتهگی استفاده شد. این سویه از جمله لاین‌های تجاری اصلاح‌شده با عملکرد تخم‌گذاری بالا است که توسط شرکت پرورش طیور شیور<sup>۲</sup> در کانادا توسعه یافته است. جیره پایه براساس ذرت و کنجاله سویا و مطابق با نیازهای تغذیه‌ای سویه شیور سفید در سن ۵۹ هفتهگی تنظیم شد (Shaver, 2020). چهار تیمار آزمایشی به‌شرح زیر در نظر گرفته شدند: ۱- شاهد (بدون افزودن منبع کاروتنوئیدی)، ۲- شاهد + ۲۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از گیاه یونجه، ۳- شاهد + ۳۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از گیاه یونجه و ۴- شاهد + ۳۵ گرم لوکانتین (رنگدانه شرکت جوانه خراسان) به‌عنوان منبع تجاری کاروتنوئید به‌ازای هر تن خوراک بود. به‌منظور سهولت در ارائه نتایج، تیمارها در جداول و ادامه متن به‌صورت اختصاری نشان داده شدند: C: شاهد، A20: شاهد + ۲۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از گیاه یونجه در تن خوراک، A30: شاهد + ۳۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از گیاه یونجه در تن خوراک، L35: شاهد + ۳۵ گرم لوکانتین در تن خوراک تمام جیره‌ها از نظر انرژی قابل متابولیسم و پروتئین خام یکسان‌سازی شده و وزن اولیه پرندگان در هر قفس به‌منظور حذف اثر تفاوت‌های آغازین کنترل گردید. خوراک به‌شکل آردی<sup>۳</sup> تهیه شد و تخصیص خوراک به‌صورت محدود به‌میزان ۱۱۰ گرم به‌ازای هر پرندۀ در روز انجام گرفت. آب آشامیدنی به‌صورت آزاد در دسترس پرندگان قرار داشت. هزینه خوراک به‌ازای تولید یک کیلوگرم تخم‌مرغ 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 ۱۷۰±۱۵ گرم و میانگین وزن تخم‌مرغ ۶۴±۱۱ مورد استفاده قرار گرفتند. تولید تخم‌مرغ اولیه در شروع دوره حدود ۸۶ درصد گزارش شد. ترکیب مواد مغذی جیره‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

#### آماده‌سازی 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 پنج لیتر آب مقطر خیسانده گردید. پس از خیساندن، نمونه تحت فشار مکانیکی فشرده و مایع به‌دست‌آمده 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

4- KOH  
5- Saponification  
6- Decanting  
7- UV-Vis  
8- Sigma-Aldrich

1- Shaver White Strain  
2- Shaver Poultry Breeding Farms  
3- Mash

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

Table 1-The ingredient and nutrient composition of basal diet

| درصد                                     | جیره                                |
|------------------------------------------|-------------------------------------|
| افلام خوراکی (درصد ماده خشک)             | Ingredients (%DM)                   |
| ذرت                                      | Corn                                |
| 51.00                                    |                                     |
| کنجاله سویا (پروتئین خام ۴۴ درصد)        | Soybean meal (CP 44%)               |
| 30.00                                    |                                     |
| سیوس گندم                                | Wheat bran                          |
| 4.00                                     |                                     |
| پودر سنگ آهک                             | Limestone powder                    |
| 9.00                                     |                                     |
| دی کلسیم فسفات                           | Di-calcium phosphate                |
| 1.40                                     |                                     |
| روغن گیاهی                               | Vegetable oil                       |
| 3.25                                     |                                     |
| دی ال-متیونین                            | DL-methionine                       |
| 0.15                                     |                                     |
| ال-لایزین هیدروکلراید                    | L-lysine hydrochloride              |
| 0.10                                     |                                     |
| نمک خوراکی                               | NaCl                                |
| 0.30                                     |                                     |
| بی کربنات سدیم                           | Sodium bicarbonate                  |
| 0.20                                     |                                     |
| کولین کلراید                             | Choline chloride (60%)              |
| 0.10                                     |                                     |
| مکمل ویتامینه <sup>۱</sup>               | Vitamin premix <sup>1</sup>         |
| 0.25                                     |                                     |
| مکمل معدنی <sup>۲</sup>                  | Mineral premix <sup>2</sup>         |
| 0.25                                     |                                     |
| ترکیب شیمیایی جیره پایه                  | Chemical compounds of the Main diet |
| انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوگرم) | Metabolizable Energy (ME) (kcal/kg) |
| 2750                                     |                                     |
| پروتئین خام (درصد)                       | Crude Protein (CP) (%)              |
| 16.50                                    |                                     |
| کلسیم (درصد)                             | Calcium (Ca) (%)                    |
| 4.10                                     |                                     |
| فسفر قابل استفاده (درصد)                 | Available Phosphorus (%)            |
| 0.40                                     |                                     |
| لیزین قابل دسترس (درصد)                  | Digestible lysine (%)               |
| 0.75                                     |                                     |
| متیونین + سیستین (درصد)                  | Digestible methionine + cystine (%) |
| 0.65                                     |                                     |
| سدیم                                     | Sodium                              |
| 0.17                                     |                                     |

<sup>۱</sup> هر کیلوگرم مکمل ویتامینه شامل ۱۱۰۲۵ واحد بین المللی ویتامین A، ۳۵۲۸ واحد بین المللی ویتامین D<sub>3</sub>، ۳۳ واحد بین المللی ویتامین E، ۰/۹۱ میلی گرم ویتامین K<sub>3</sub>، ۰/۱۸ گرم ویتامین B<sub>1</sub>، ۰/۸۲۵ گرم ویتامین B<sub>2</sub>، ۱/۰۰ گرم ویتامین B<sub>3</sub>، ۳/۰۰ گرم ویتامین B<sub>5</sub>، ۰/۳۰ گرم ویتامین B<sub>6</sub>، ۰/۱۲۵ گرم ویتامین B<sub>9</sub>، ۰/۱۵ گرم ویتامین B<sub>12</sub> و ۵۰ گرم کولین کلراید است.

<sup>۲</sup> هر کیلوگرم مکمل معدنی حاوی ۱/۲۵ میلی گرم ید و ۰/۳ میلی گرم سلنیم است.

<sup>1</sup> Vitamin premix supplied the following, per kilogram of diet: Vitamin A, 11025 IU; vitamin D<sub>3</sub>, 3528 IU; vitamin E, 33 mg; vitamin K<sub>3</sub>, 0.91 mg; vitamin B<sub>1</sub>, 0.18 g; vitamin B<sub>2</sub>, 0.825 g; vitamin B<sub>3</sub>, 1.00g; vitamin B<sub>5</sub>, 3.00 g; vitamin B<sub>6</sub>, 0.30g; vitamin B<sub>9</sub>, 0.125g; vitamin B<sub>12</sub>, 0.15g; choline chloride, 50g

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

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

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

معادله (۴)

که در آن، SG: وزن مخصوص (g/cm<sup>3</sup>)، W: وزن تخم مرغ (گرم) و V: حجم تخم مرغ (سانتی متر مکعب، معادل با میلی لیتر) است.

#### نمونه برداری خون و تعیین شاخص های تنش اکسیداتیو

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

فراسنجه های مورد اندازه گیری شامل مالون دی آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز، گلووتاتیون پراکسیداز<sup>۴</sup>، کاتالاز و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام بودند. انتخاب این شاخص ها به دلیل نقش کلیدی آن ها در تبیین تعادل اکسیداتیو-آنتی اکسیدانی صورت گرفت. مالون دی آلدئید به عنوان یکی از متداول ترین نشانگرهای پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش آن بیانگر آسیب به ساختار غشاء سلولی و تشدید تنش اکسیداتیو است. در مقابل، آنزیم های آنتی اکسیدانی با خنثی سازی گونه های فعال اکسیژن در حفظ پایداری سلولی نقش دارند و فعالیت آن ها شاخصی از توان دفاع آنتی اکسیدانی ارگانسیم محسوب می شود (Ighodaro & Akinloye, 2017). ظرفیت آنتی اکسیدانی تام نیز معیاری ترکیبی برای ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل سرم بوده و نمایانگر تعادل میان تولید رادیکال های آزاد و سامانه های دفاعی بدن است.

که در آن، A: میزان جذب نوری محلول عصاره شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر، V: حجم نهایی عصاره (میلی لیتر) و  $A_{1cm}^{1\%}$ : ضریب جذب ویژه کاروتنوئید (لیتر بر گرم در سانتی متر) است 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 می باشد (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<sup>۱</sup> 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 & Okur, 2009; Silversides & Scott, 2000).

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

معادله (۲)

که در آن، YH: ارتفاع زرده و YD: میانگین قطر زرده است. رنگ زرده تخم مرغ با استفاده از از پنل استاندارد فن سنجش رنگ<sup>۲</sup> (سوئیس) به صورت چشمی و با مقیاس عددی ۱۵ مرحله ای تعیین شد. این پنل که در آزمایشگاه های مرغداری ایران کاربرد دارد، یکی از رایج ترین و معتبرترین روش های ارزیابی رنگ زرده، شامل طیفی از رنگ های استاندارد زرده است که به کمک آن رنگ نمونه ها با معیارهای مرجع مقایسه و درجه بندی می شوند.

واحد هاو<sup>۳</sup> که نشان دهنده کیفیت داخلی تخم مرغ است نیز براساس 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

1- Yolk Index

2- YolkFan (DSM Nutritional Products)

3- Haugh Unit

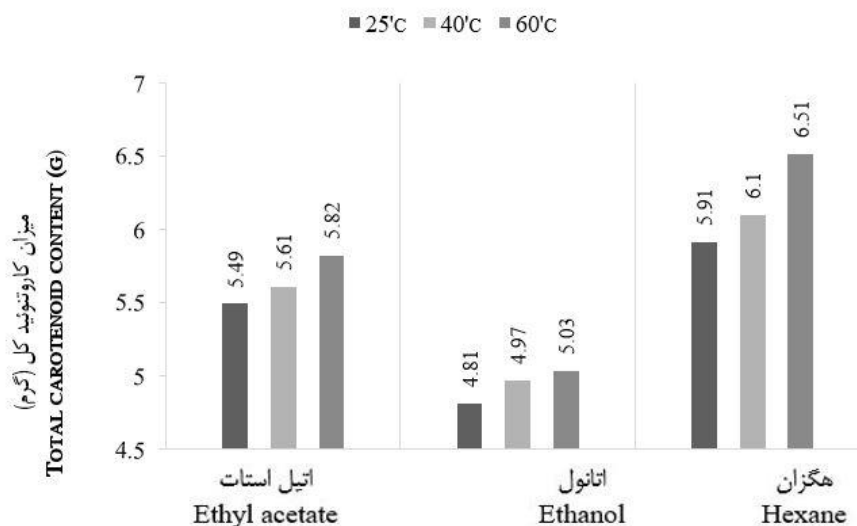
## تحلیل آماری

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

## نتیجه‌گیری و بحث

براساس نتایج به‌دست‌آمده در شکل ۱، بیشترین میزان استخراج کاروتنوئید کل با استفاده از حلال هگزان در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد (مقدار ۶/۵۱ گرم). این نتایج نشان می‌دهد که حلال‌های غیرقطبی مانند هگزان، به دلیل سازگاری با ساختار لیپوفیلک کاروتنوئیدها، بازده استخراج بالاتری داشته‌اند، مطابق با شواهدی که نشان می‌دهند استفاده از حلال‌های غیرقطبی برای استخراج کاروتنوئیدهای غیرقطبی مؤثرتر است و تأکید کرده‌اند که نوع ساختار مولکولی هر کاروتنوئید و ترکیب ماتریکس زیستی تعیین می‌کند که حلال قطبی یا غیرقطبی مناسب‌تر باشد (Saini & Keum, 2018).

علی‌رغم اینکه استفاده از حلال‌های غیرسمی 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 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 (Ebele et al., 2022). بنابراین، هم‌خوانی 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).



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

## رنگ زرده

براساس نتایج ارائه‌شده در جدول ۲ مربوط به تغییرات رنگ زرده طی دوره آزمایش، میانگین شاخص رنگ زرده در تیمارهای دریافت‌کننده رنگدانه (A30، A20 و L35) به طور 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 به طور معنی‌داری

(2006) و عبدل-آل و همکاران (Abdel-Aal et al., 2017) که بر اثربخشی منابع گیاهی حاوی کاروتنوئید در افزایش رنگ زرده تأکید داشتند، هم‌راستا است. براساس نتایج این مطالعه، بهبود رنگ زرده را می‌توان به افزایش رسوب کاروتنوئیدهای لیپوفیل در تخمدان و زرده نسبت داد. این موضوع با نتایج گرسویک و همکاران (Grčević et al., 2019) هم‌خوانی دارد 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.

بالتر از شاهد قرار گرفت. این روند افزایشی وابسته به دُر، به‌ویژه در هفته ششم، شدت بیشتری داشت که در آن تیمارهای A30 و L35 به‌ترتیب نمراتی معادل ۷/۵ و ۱۱/۴۳۷ کسب کردند، درحالی‌که شاهد تنها شاخص ۴/۶۲۵ را نشان داد. این نتایج مؤید 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 گزارش‌شده توسط کاراداس و همکاران (Karadas et al., 2019) هم‌راستا است.

**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<br>Experimental week | جیره‌های آزمایشی<br>Experimental diets |                                            |                                            |                                    | مقدار P<br>P value |
|-----------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
|                                   | جیره پایه<br>C <sup>1</sup>            | g 20 کاروتنوئید یونجه<br>A 20 <sup>2</sup> | g 30 کاروتنوئید یونجه<br>A 30 <sup>3</sup> | g 35 لوکانتین<br>L 35 <sup>4</sup> |                    |
| هفته دوم<br>Week 2                | 4.19 ± 0.11 <sup>c</sup>               | 4.75 ± 0.12 <sup>b</sup>                   | 5.13 ± 0.11 <sup>b</sup>                   | 10.19 ± 0.11 <sup>a</sup>          | <0.0001            |
| هفته چهارم<br>Week 4              | 4.50 ± 0.20 <sup>d</sup>               | 5.50 ± 0.12 <sup>c</sup>                   | 6.38 ± 0.24 <sup>b</sup>                   | 10.56 ± 0.18 <sup>a</sup>          | <0.0001            |
| هفته ششم<br>Week 6                | 4.63 ± 0.12 <sup>d</sup>               | 6.00 ± 0.11 <sup>c</sup>                   | 7.50 ± 0.18 <sup>b</sup>                   | 11.44 ± 0.10 <sup>a</sup>          | <0.0001            |
| هفته هشتم<br>Week 8               | 4.13 ± 0.11 <sup>d</sup>               | 5.88 ± 0.15 <sup>c</sup>                   | 6.56 ± 0.15 <sup>b</sup>                   | 10.56 ± 0.29 <sup>a</sup>          | <0.0001            |

مقادیر به‌صورت (میانگین ± خطای استاندارد (SE)) حاصل از چهار تکرار مستقل گزارش شده‌اند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. <sup>a-d</sup> میانگین‌هایی که در هر ردیف دارای حروف متفاوت هستند، تفاوت آماری معنی‌داری 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.

<sup>a-d</sup> Means in each row with different superscript letters indicate statistically significant differences at  $P < 0.05$ .

C<sup>1</sup>: Control (no supplemental carotenoid source). A20<sup>2</sup>: Diet supplemented with 20 mg/kg alfalfa-derived carotenoid extract. A30<sup>3</sup>: Diet supplemented with 30 mg/kg alfalfa-derived carotenoid extract. L35<sup>4</sup>: Diet supplemented with 35 mg/kg lucantin (commercial carotenoid source)

همراه با کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید می‌شود. هم‌سویی نتایج نشان می‌دهد که منابع رنگدانه طبیعی علاوه‌بر 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) هم‌راستا بود، آن‌ها نیز کاهش معنی‌دار مالون‌دی‌آلدئید و بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی را در مرغ‌های دریافت‌کننده لوتئین گزارش کردند. شاخص‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دیس‌موتاز، گلوکاتایون‌پراکسیداز و کاتالاز نیز بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشتند. در مورد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام، تفاوت آماری

## فراسنجه‌های خون

در هفته هشتم آزمایش، بررسی شاخص‌های خون مرتبط با وضعیت اکسیداتیو در مرغ‌های تخم‌گذار، تحت تأثیر تیمارهای مختلف مکمل‌سازی‌شده با رنگدانه کاروتنوئیدی یونجه، تفاوت‌های قابل توجهی را در برخی شاخص‌ها نشان داد (جدول ۳). مقدار مالون‌دی‌آلدئید در شاهد (C) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۲ و ۳ بود ( $P = 0.0233$ )، به‌طوری‌که 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

معنی‌داری مشاهده نشد ( $P=0.0732$ ).

**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**

| تیمار آزمایشی<br>Treatment | MDA <sup>1</sup><br>(nmol/ml) | TAC <sup>2</sup><br>( $\mu$ mol/L) | SOD <sup>3</sup><br>(U/ml) | GPx <sup>4</sup><br>(U/ml) | CAT <sup>5</sup><br>(U/ml) |
|----------------------------|-------------------------------|------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| C                          | 8.94±0.19 <sup>a</sup>        | 301.38±16.44                       | 269.00±13.60               | 212.63±5.81                | 124.13±11.64               |
| A 20                       | 7.50±0.07 <sup>b</sup>        | 314.38±10.83                       | 312.38±30.62               | 194.00±8.27                | 138.63±17.95               |
| A 30                       | 7.84±0.34 <sup>b</sup>        | 286.00±5.72                        | 315.88±18.76               | 189.38±8.67                | 161.13±12.22               |
| L 35                       | 8.14±0.41 <sup>ab</sup>       | 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  $\pm$  خطای معیار ( $\text{Mean} \pm \text{SE}$ ) ارائه شده‌اند. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح  $P < 0.05$  بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند. <sup>a-b</sup> 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 به عنوان منبع تجاری کاروتنوئید

MDA<sup>1</sup>: مالون‌دی‌آلدئید؛ TAC<sup>2</sup>: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام؛ SOD<sup>3</sup>: سوپراکسید دسموتاز؛ GPx<sup>4</sup>: گلوکاتیون پراکسیداز؛ Catalase<sup>5</sup>: کاتالاز.

Values are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE) based on four independent replicates. Mean comparisons were performed using Duncan's multiple range test at a 95% confidence level. <sup>a-b</sup> 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)

<sup>1</sup>MDA: malondialdehyde; <sup>2</sup>TAC: total antioxidant capacity; <sup>3</sup>SOD: superoxide dismutase; <sup>4</sup>GPx: glutathione peroxidase; <sup>5</sup>CAT: catalase.

(۳۵ گرم لوکانتین) کاهش معنی‌داری نسبت به کنترل و تیمار A 20 داشتند (جدول ۴). این یافته ممکن است ناشی از اثرات منفی مصرف بالای رنگدانه‌ها، بر کیفیت سفیده تخم‌مرغ باشد. در هفته هشتم نیز، تیمار لوکانتین به طور معنی‌داری پایین‌ترین مقدار واحد هاو را نشان داد، در حالی که 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 براساس بررسی ۴۷ مطالعه انجام‌شده، گزارش کردند که 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 ( $P = 0.9161$ ). باین‌حال، روند تغییرات در طول دوره نشان‌دهنده پاسخ تدریجی زرده به ترکیب‌های متفاوت جیره بود. در هفته ششم، تیمار حاوی عصاره کاروتنوئید یونجه (A30) افزایش معنی‌داری در ارتفاع زرده نسبت به شاهد و A20 نشان دادند ( $P = 0.0313$ ). تیمار A30 با میانگین ارتفاع  $18/22 \pm 0/33$  میلی‌متر، بالاترین مقدار را به خود اختصاص داد.

لازم به ذکر است که به دلیل عدم بروز تفاوت‌های معنی‌دار در سنین ابتدایی‌تر، نتایج براساس نمونه‌گیری انجام‌شده 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 گائو (Gao et al., 2020) همسو نیست، آن‌ها نشان دادند که آستاگزانتین طبیعی علاوه بر کاهش مالون‌دی‌آلدئید، 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.

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 دُر بالاتر (۳۰ گرم کاروتنوئید) و لوکانتین

جدول ۴- اثر تیمارهای مختلف جیره غذایی حاوی کاروتنوئید یونجه و لوکانتین تجاری بر شاخص‌های کیفی تخم مرغ 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<br>treatment  | ارتفاع زرده<br>Yolk height<br>(mm) | میانگین قطر زرده<br>Yolk Diameter<br>(mm) | شاخص زرده<br>Yolk index       | وزن مخصوص<br>Specific gravity | ضخامت پوسته<br>Shell thickness<br>( $\mu\text{m}$ ) | واحد هاو<br>Haugh unit          |
|---------------------|------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------|
| هفته ۲ آزمایش       |                                    |                                           |                               |                               |                                                     |                                 |
| Experimental Week 2 |                                    |                                           |                               |                               |                                                     |                                 |
| C <sup>1</sup>      | 19.49 $\pm$ 0.589                  | 41.51 $\pm$ 0.798                         | 0.47 $\pm$ 0.013              | 1.093 $\pm$ 0.002             | 463.25 $\pm$ 2.926                                  | 98.42 $\pm$ 1.030 <sup>a</sup>  |
| A 20 <sup>2</sup>   | 19.19 $\pm$ 0.515                  | 41.64 $\pm$ 0.203                         | 0.46 $\pm$ 0.012              | 1.094 $\pm$ 0.002             | 461.5 $\pm$ 3.663                                   | 98.84 $\pm$ 0.377 <sup>a</sup>  |
| A 30 <sup>3</sup>   | 19.35 $\pm$ 0.125                  | 43.16 $\pm$ 0.565                         | 0.45 $\pm$ 0.006              | 1.092 $\pm$ 0.002             | 468.25 $\pm$ 2.562                                  | 94.43 $\pm$ 1.106 <sup>b</sup>  |
| L 35 <sup>4</sup>   | 19.09 $\pm$ 0.274                  | 43.54 $\pm$ 0.699                         | 0.44 $\pm$ 0.010              | 1.092 $\pm$ 0.002             | 456.5 $\pm$ 6.384                                   | 94.15 $\pm$ 1.627 <sup>b</sup>  |
| P value             | 0.9161                             | 0.0793                                    | 0.2231                        | 0.8626                        | 0.3025                                              | 0.0179                          |
| هفته ۴ آزمایش       |                                    |                                           |                               |                               |                                                     |                                 |
| Experimental Week 4 |                                    |                                           |                               |                               |                                                     |                                 |
| C                   | 18.45 $\pm$ 0.290                  | 42.74 $\pm$ 0.570                         | 0.43 $\pm$ 0.003              | 1.096 $\pm$ 0.003             | 426.92 $\pm$ 17.100                                 | 95.45 $\pm$ 1.240               |
| A 20                | 19.15 $\pm$ 0.480                  | 42.11 $\pm$ 0.440                         | 0.46 $\pm$ 0.015              | 1.092 $\pm$ 0.004             | 448.08 $\pm$ 17.820                                 | 97.19 $\pm$ 1.440               |
| A 30                | 17.83 $\pm$ 0.410                  | 41.72 $\pm$ 0.530                         | 0.43 $\pm$ 0.010              | 1.092 $\pm$ 0.001             | 455.08 $\pm$ 11.040                                 | 95.39 $\pm$ 0.810               |
| L 35                | 18.57 $\pm$ 0.310                  | 42.81 $\pm$ 0.490                         | 0.43 $\pm$ 0.010              | 1.091 $\pm$ 0.002             | 437.58 $\pm$ 17.140                                 | 96.50 $\pm$ 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 $\pm$ 0.170 <sup>b</sup>     | 43.97 $\pm$ 0.240                         | 0.38 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup> | 1.093 $\pm$ 0.002             | 434.50 $\pm$ 5.430                                  | 90.71 $\pm$ 1.880               |
| A 20                | 16.71 $\pm$ 0.320 <sup>b</sup>     | 43.28 $\pm$ 0.500                         | 0.39 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup> | 1.093 $\pm$ 0.001             | 427.83 $\pm$ 11.860                                 | 90.07 $\pm$ 1.950               |
| A 30                | 18.22 $\pm$ 0.330 <sup>a</sup>     | 43.89 $\pm$ 0.470                         | 0.41 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup> | 1.095 $\pm$ 0.001             | 444.50 $\pm$ 7.780                                  | 86.71 $\pm$ 2.180               |
| L 35                | 17.74 $\pm$ 0.380 <sup>ab</sup>    | 43.03 $\pm$ 0.630                         | 0.41 $\pm$ 0.008 <sup>a</sup> | 1.096 $\pm$ 0.002             | 435.83 $\pm$ 13.130                                 | 88.20 $\pm$ 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 $\pm$ 0.390                  | 45.30 $\pm$ 0.830                         | 0.32 $\pm$ 0.010              | 1.10 $\pm$ 0.000              | 431.25 $\pm$ 2.230                                  | 76.96 $\pm$ 1.510 <sup>ab</sup> |
| A 20                | 14.95 $\pm$ 0.600                  | 45.65 $\pm$ 1.040                         | 0.33 $\pm$ 0.020              | 1.10 $\pm$ 0.000              | 421.50 $\pm$ 11.870                                 | 80.83 $\pm$ 0.980 <sup>a</sup>  |
| A 30                | 15.19 $\pm$ 0.650                  | 45.91 $\pm$ 0.300                         | 0.33 $\pm$ 0.020              | 1.10 $\pm$ 0.000              | 433.42 $\pm$ 5.360                                  | 79.14 $\pm$ 1.190 <sup>a</sup>  |
| L 35                | 14.51 $\pm$ 0.350                  | 46.42 $\pm$ 0.170                         | 0.31 $\pm$ 0.010              | 1.09 $\pm$ 0.000              | 430.42 $\pm$ 10.000                                 | 72.82 $\pm$ 2.670 <sup>b</sup>  |
| P value             | 0.713                              | 0.7099                                    | 0.7727                        | 0.2539                        | 0.7544                                              | 0.0329                          |

مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (n = 4) ارائه شده‌اند. <sup>a-b</sup> حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  هستند.

C<sup>1</sup> = شاهد (بدون افزودن منبع کاروتنوئیدی)، A20<sup>2</sup> = جیره حاوی ۲۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از گیاه یونجه در هر تن جیره، A30<sup>3</sup> = جیره حاوی ۳۰ گرم عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از گیاه یونجه در هر تن جیره، L35<sup>4</sup> = جیره حاوی ۳۵ گرم لوکانتین به‌عنوان منبع تجاری کاروتنوئید

Values are expressed as mean  $\pm$  standard error (n = 4). <sup>a-b</sup> Means in each column with different superscript letters indicate significant differences at  $P < 0.05$ .

C<sup>1</sup> = Control (no supplemental carotenoid source). A20<sup>2</sup> = Diet supplemented with 20 mg/kg alfalfa-derived carotenoid extract. A30<sup>3</sup> = Diet supplemented with 30 mg/kg alfalfa-derived carotenoid extract. L35<sup>4</sup> = Diet supplemented with 35 mg/kg lucantin (commercial carotenoid source)

موجب بهبود انتقال مواد مغذی به زرده و حفظ ساختار میکرونی آن شده باشند. افزایش نرخ تولید تخم مرغ با بهبود وضعیت اکسیداتیو در مرغ‌های تغذیه‌شده با کانتاکسانتین 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 ( $P > 0.2$ ). باین حال، در هفته

در هفته هشتم نیز، با وجود کاهش کلی ارتفاع زرده در تمام تیمارها، تیمار A30 همچنان در بالاترین سطح باقی ماند ( $\pm 0.65$ ) ۱۵/۱۹ میلی‌متر). 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 که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره یونجه

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از منابع کاروتنوئیدی، به‌ویژه عصاره کاروتنوئیدی استخراج‌شده از یونجه می‌تواند کیفیت داخلی تخم‌مرغ 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<sup>۲</sup> در بدن پرنده، سلامت فیزیولوژیک آن را تحت تأثیر مثبت قرار دهند. بر این اساس، افزودن کاروتنوئیدهای طبیعی مشتق از منابع گیاهی همچون یونجه می‌تواند به‌عنوان 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 علاوه‌بر حفظ سلامت اکسیداتیو تخم‌مرغ موجب بهبود رنگ و جذابیت ظاهری زرده و افزایش پذیرش مصرف‌کننده می‌گردد. با این حال، به‌منظور 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.

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 مؤثر باشند، اما تیمار A30 که از عصاره 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 عصاره یونجه مانند لوتئین و زی‌زانتین ممکن است نقش کلیدی در حفظ کیفیت فیزیکی زرده ایفا کنند. سازوکار اثر این ترکیبات ممکن است شامل تثبیت ساختار میکرونی زرده، کاهش اکسیداسیون لیپیدها و افزایش قوام غشاء 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 ضداکسیدانی (مهار اکسیژن سینگلت<sup>۱</sup>) 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 انگلمارووا و همکاران (*Englmaierová et al., 2013*) هم‌راستا هستند، به‌طوری‌که بیان شده استفاده از لوتئین طبیعی، پایداری زرده و شاخص زرده را بهبود بخشید.

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 به‌عنوان شاخصی از کیفیت داخلی و نسبت آب به ماده خشک تخم‌مرغ در نظر گرفته می‌شود، در این مطالعه، وزن مخصوص تخم‌مرغ‌ها در طول هفته‌های مختلف به‌صورت معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای غذایی قرار نگرفت ( $P > 0.25$ ). در طی بررسی‌های به‌عمل آمده در این آزمایش، میانگین قطر زرده در تمامی تیمارها روند افزایشی نشان داد که بیانگر تأثیر سن و بلوغ تدریجی دستگاه تولیدمثلی طیور تخم‌گذار است (*Johnson, 2015*). اگرچه اختلاف آماری معناداری بین تیمارها مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).

## References

1. Abdel-Aal, E. M., Akhtar, H., Chambers, J. R., & Zaheer, K. (2016). Lutein and zeaxanthin carotenoids in eggs. In P. Hester (Ed.), *Egg innovations and strategies for improvements* (pp. 199–206). Academic Press: Boston, MA, USA. (Total pages: 646). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00019-6>
2. Ebele, A. A., 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* (IJSEI), 11(122), 1-8. <http://www.ijsei.com/papers/ijsei-1112222-01.pdf>.
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., Gortáñez-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>
6. Bagheri, S., Golian, A., Nasiri Moghaddam, H., & Zarghi, H. (2020). Effect of dietary energy and nutrients density on performance and egg quality in the 2nd production cycle in laying hens. *International Journal of Advanced Scientific Research*, 12(2), 197–209. (in Persian with English abstract) <https://doi.org/10.22067/ijasr.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: Basel, Switzerland.
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., & 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., Sheng, X., Wang, X., Xing, K., Xiao, L., Ni, H., & Qi, X. (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,  $\beta$ -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: San Diego, CA, USA. <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., & 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. Madkour M, Ali SI, Alagawany M, El-Kholy MS, El-Baz FK, Alqhtani AH, Alharthi AS, Pokoo-Aikins A and Elolimy AA (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. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1545433>
33. Rodríguez-Amaya, D. B. (2001). A guide to Carotenoid Analysis in Foods (pp. 1–71). ILSI Press. International Life Sciences Institute: Washington, DC, USA.
34. Rodríguez-Amaya, D. B., & Kimura, M. (2004). Using UV–Vis spectrophotometry for  $\beta$ -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., & 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., & Kołacz, 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> International Life Sciences Institute: Washington, DC, USA.
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. 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>
43. Yang, C., Zhang, L., & Tsao, R. (2020). Chemistry and biochemistry of dietary carotenoids: bioaccessibility, bioavailability and bioactivities. *Journal of Food Bioactives*, 10 . <https://doi.org/10.31665/JFB.2020.10229>
44. 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>
45. 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>
46. 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>
47. 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>