

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Mojca PESTOTNIK

**VPLIV DODATKA FOLNE KISLINE V KRMO NA
OPLOJENOST JAJC IN VALILNOST PIŠČANCEV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Mojca PESTOTNIK

**VPLIV DODATKA FOLNE KISLINE V KRMO NA OPLOJENOST
JAJC IN VALILNOST PIŠČANCEV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**THE EFFECT OF DIETARY FOLIC ACID INCLUSION ON
FERTILITY AND HATCHABILITY OF CHICKENS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Znanost o živalih. Delo je bilo opravljeno na Katedri za znanosti o rejah živali – enoti za perutninarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Dušana Terčiča.

Recenzentka: doc. dr. Vida Rezar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Antonija HOLCMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Dušan TERČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Vida REZAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Mojca Pestotnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 636.5.084/.087 (043.2)
KG	perutnina/kokoši nesnice/prehrana živali/krma/ folna kislina/jajca/oplojenost/valilnost
AV	PESTOTNIK, Mojca, dipl. inž. kmetijstva - zootehnik
SA	TERČIČ, Dušan
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2015
IN	VPLIV DODATKA FOLNE KISLINE V KRMO NA OPLOJENOST JAJC IN VALILNOST PIŠČANCEV
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	IX, 48 str., 14 pregl., 13 sl., 37 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Folna kislina (vitamin B ₉) ima v organizmu pomembno vlogo, predvsem je nujno potrebna v tkivih z visoko stopnjo celične delitve in rasti. Pomembna je njena vloga v reprodukciji, zato smo v našem poskusu poskušali ugotoviti, kakšen vpliv ima dodajanje tega vitamina v krmo na nekatere proizvodne in reprodukcijske lastnosti v matični jati kokoši lahkega tipa. V poskus smo vključili 1011 živali iz starševske jate za pridobivanje komercialne nesnice prelux-G (105 petelinov in 906 kokoši), ki smo jih naključno razdelili v dve skupini. V prvi skupini (kontrolni) so živali dobivale popolno krmno mešanico za nesnice lahkega tipa, v drugi skupini (poskusni) so zauživale popolno krmno mešanico za nesnice lahkega tipa v katero smo dodali 50 mg folne kisline/kg krme. Krmljenje je potekalo po volji. Na začetku poskusa so bile kokoši stare 36, na koncu 39 tednov. V dveh zaporednih valjenjih smo v valilnike vložili 11005 jajc, na katerih smo spremljali oplojenost in valilnost. Dodatno smo v matični jati beležili dnevno nesnost in pogin, ter vzorčno tedensko porabo krme in telesno maso živali na začetku in koncu poskusa. Dodatek folne kisline ni vplival ($P > 0,05$) na maso in oplojenost jajc ter valilnost. Telesna masa en dan starih piščancev iz skupine z dodatkom folne kisline je bila značilno večja ($P \leq 0,05$) v primerjavi s telesno maso piščancev iz kontrolne skupine. Živali iz poskusne skupine so bile ob koncu poskusa značilno lažje z značilno manjšo prirejo jajc v primerjavi z živalmi iz kontrolne skupine. Rezultati poskusa kažejo, da dodatek folne kisline v krmne mešanice za kokoši lahkega tipa v koncentraciji nad 0,85 mg/kg krme, ne prispeva k boljši oplojenosti jajc in valilnosti piščancev.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 636.5.084/.087(043.2)

CX poultry/laying hens/animal nutrition/feed/folic acid/eggs/fertility/hatchability

AU PESTOTNIK, Mojca

AA TERČIČ, Dušan (supervisor)

PP SI-1230 Domžale, Groblje 3

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science

PY 2015

TY THE EFFECT OF DIETARY FOLIC ACID INCLUSION ON FERTILITY AND HATCHABILITY OF CHICKENS

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO IX, 48 p., 14 tab., 13 fig., 37 ref.

LA sl

Al sl/en

AB Folic acid (vitamin B₉) is essential for all tissues with a high rate of cellular division and growth. That is why it has a very important role in reproduction. The present study aimed to study the effects of folic acid supplementation on productive and reproductive performance in layer breeders. One thousand and eleven layer breeders of the Slovenian provenance prelux-G (105 cocks of the sire line and 906 hens of the dam-line) were randomly assigned to receive 1 of 2 dietary treatments: a) basal diet with no supplemental folic acid (control group), b) basal diet + 50 mg/kg of crystalline folic acid (treatment group). Feed was provided for *ad libitum* consumption. Fertility and hatchability were assessed in 11005 hatching eggs which were collected in 2 batches and hatched. In addition, daily mortality and egg production, weekly feed consumption, and body weights at the start and the end of the experiment were recorded. There was no significant difference ($p < 0,05$) in egg weight, fertility and hatchability between dietary treatments. The body weight of the newly hatched chicks was increased with the supplementation of folic acid to the diet when compared with the control group.. The body weight at 39 weeks and egg production during experimental period (36-39 weeks) were significantly ($P < 0,05$) adversely affected by folic acid supplementation as compared to control group. No difference was seen between the treatment groups concerning the mortality. Folic acid at a concentration of 0.85 mg/kg was not limiting for fertility and hatchability in the basal diet.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
SEZNAM GESEL	IX
1 UVOD	- 1 -
2 PREGLED OBJAV	- 3 -
2.1 STRUKTURA IN DELOVANJE FOLATA	- 3 -
2.2 VIRI VITAMINA B ₉	- 5 -
2.3 PRIPOROČENI DNEVNI ODMERKI	- 6 -
2.4 POMANJKANJE FOLATA	- 7 -
2.4.1 Okvare nevralne cevi	- 7 -
2.4.2 Megaloblastna anemija	- 8 -
2.4.3 Oslabljen imunski sistem	- 8 -
2.4.4 Rakava obolenja	- 9 -
2.4.5 Vročinski stres	- 10 -
2.5 OBOGATITEV ŽIT S FOLNO KISLINO TER NJENI UČINKI	- 10 -
2.6 VPLIV FOLNE KISLINE NA POSAMEZNE VRSTE ŽIVALI	- 12 -
2.6.1 Vitamin B ₉ pri prašičih	- 12 -
2.6.2 Vitamin B ₉ pri ovcah	- 12 -
2.6.3 Vitamin B ₉ pri perutnini	- 13 -
2.6.3.1 Pure	- 13 -
2.6.3.2 Kokoši nesnice	- 13 -
3 MATERIALI IN METODE	- 17 -
3.1 KONCENTRACIJA FOLNE KISLINE	- 17 -
3.2 ŽIVALI	- 17 -
3.3 PRIPRAVA IN PORABA KRME	- 19 -
3.4 VALJENJE	- 23 -
3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	- 27 -
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	- 29 -
4.1 OSNOVNI STATISTIČNI PODATKI O REZULTATIH VALJENJ	- 29 -

4.2	STATISTIČNA ZNAČILNOST VPLIVOV	- 31 -
4.3	PORABA KRME IN NESNOST	- 36 -
4.4	TELESNE MASE ŽIVALI V POSKUSU	- 38 -
4.5	POGIN ŽIVALI	- 40 -
5	SKLEPI	- 41 -
6	POVZETEK	- 42 -
7	VIRI	- 44 -

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Priporočeni dnevni odmerki vitamina B ₉ (Suitor in Bailey, 2000: 89).	- 6 -
Pregl. 2: Podatki o poskusnih skupinah kokoši	- 17 -
Pregl. 3: Sestavine in njihov delež v krmni mešanici NSK-1, proizvajalca Jata Emona d.o.o., Ljubljana	- 19 -
Pregl. 4: Izračunana vsebnost hranilnih snovi v krmni mešanici NSK-1	- 20 -
Pregl. 5: Osnovni statistični podatki o rezultatih valjenj	- 29 -
Pregl. 6: Osnovni statistični podatki o parametrih valjenj glede na zaporedno valjenje, genotip mater in poskusno skupino	- 30 -
Pregl. 7: Statistična (ne)značilnost vplivov vključenih v model 1	- 31 -
Pregl. 8: Vpliv dodane folne kisline na rezultate valjenj	- 32 -
Pregl. 9: Vpliv genotipa mater na rezultate valjenj	- 34 -
Pregl. 10: Vpliv zaporednega valjenja na rezultate valjenj	- 35 -
Pregl. 11: Opisna statistika za telesne mase živali v poskusu	- 38 -
Pregl. 12: Statistična (ne)značilnost posameznih vplivov vključenih v model 2	- 38 -
Pregl. 13: Oceni srednjih vrednosti s standardno napako za lastnost telesne mase	- 39 -
Pregl. 14: Pogin živali v času poskusa	- 40 -

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz strukture tetrahidrofolat triglutamata (prirejeno po Stover, 2004: S4)	- 3 -
Slika 2: Presnovne poti v katere je vključen folat (prirejeno po Stover, 2004: S5)	- 4 -
Slika 3: Starševska jata križank provenience prelux–G (foto: M. Pestotnik, 2013)	- 18 -
Slika 4: Embalaža folne kisline uporabljene v poskusu (foto: M. Pestotnik, 2013)	- 20 -
Slika 5: Mešalnik za pripravo predmešanice za krmne mešanice (foto: M. Pestotnik, 2013)	- 21 -
Slika 6: Mešalnik za pripravo poskusne krmne mešanice (foto: M. Pestotnik, 2013)	- 22 -
Slika 7: Pripravljena poskusna krmna mešanica (foto: M. Pestotnik, 2013)	- 22 -
Slika 8: Jajca naložena na voziček predvalilnika (foto: M. Pestotnik, 2013)	- 23 -
Slika 9: Izvaljeni piščanci na lesah izvalilnika (foto: M. Pestotnik, 2013)	- 24 -
Slika 10: Neoplojeno jajce, presvetljeno z ovoskopom (foto: M. Pestotnik, 2013)	- 24 -
Slika 11: Jajce z zgodaj zamrtim zarodkom, viden obroč iz krvi (Ernst in sod., 2004)	- 25 -
Slika 12: Jajce z zamrtim zarodkom; viden skupek tkiv, presvetljeno z ovoskopom (foto: M. Pestotnik, 2013)	- 26 -
Slika 13: Ovoskop, pripomoček za presvetljevanje jajc (foto: M. Pestotnik, 2013)	- 27 -

SEZNAM GESEL

Folna kislina = Vitamin B₉ = Vitamin, ki ima pomembno vlogo v tkivih z visoko stopnjo celične delitve in rasti.

Matična jata = Starševska jata = Skupina kokoši in petelinov, ki jih redimo zato, da pridobimo valilna jajca iz katerih izvalimo komercialne križance.

Ovoskop = Pripomoček, sestavljen iz enostavnega kovinskega ohišja, ki svetlobo močne žarnice usmerja v snop s pomočjo katerega presvetlimo jajce.

Valilnik = Komora, v kateri ob ustrezni temperaturi, relativni vlagi, prezračevanju ter obračanju poteka razvoj piščancev.

Valilnost = Odstotek izvaljenih piščancev glede na število vloženih ali oplojenih jajc.

1 UVOD

Vitamin B₉ je eden izmed vodotopnih vitaminov B skupine. V naravi je prisoten v obliki folatov, medtem, ko je vsem bolj poznana folna kislina, njegova sintetično proizvedena različica. Človeško telo ne more na novo sintetizirati vitamina B₉, prav tako se slednji v telesu ne skladišči, zato moramo dnevno zauživati bodisi folate s prehrano bodisi folno kislino s prehranskimi dodatki.

Vitamin B₉ opravlja v telesu številne pomembne funkcije. Izredno pomembna je njegova vloga pri sintezi in metilaciji DNK ter povrnitvi okvarjene DNK v prvotno stanje. Pomembno vlogo ima pri celični delitvi in rasti, zato je pomemben tako v času nosečnosti kot kasneje v času mladostniškega razvoja. Njegovo pomanjkanje okrne sintezo DNK, kar lahko privede do megaloblastne anemije, zaradi zmanjšane sinteze eritrocitov (Stover, 2004).

Pomanjkanje vitamina B₉ pri ljudeh so najprej začeli raziskovati v povezavi z pojavom okvar nevralne cevi pri otrocih (anencefalija ter *spina bifida*). Z uvedbo obvezne obogatitve žit in žitnih izdelkov s folno kislino v Združenih državah Amerike, se je zmanjšalo tudi število otrok z omenjenima poškodbama živčnega sistema.

V poskusih je bilo ugotovljeno, da ima folna kislina zelo pomembno vlogo v razvoju oziroma preživetju zarodkov pri podganah (Tagbo in Hill, 1977 cit. po Méthot in sod., 2008), hrčkih (Moiij in sod., 1993 cit. po Méthot in sod., 2008) in morskih prašičih (Habibzadeh in sod., 1986 cit. po Méthot in sod., 2008). Pri svinjah in ovcah so s krmljenjem krme obogatene s folno kislino dosegli višjo koncentracijo folatov v krvnem serumu. Dodatek folne kisline ni vplival na reproduktivne lastnosti pri ovcah (Méthot in sod., 2008) pač pa je pri prašičih prispeval k 10 % večji velikosti gnezda ob pravitvi (Matte in sod., 2006).

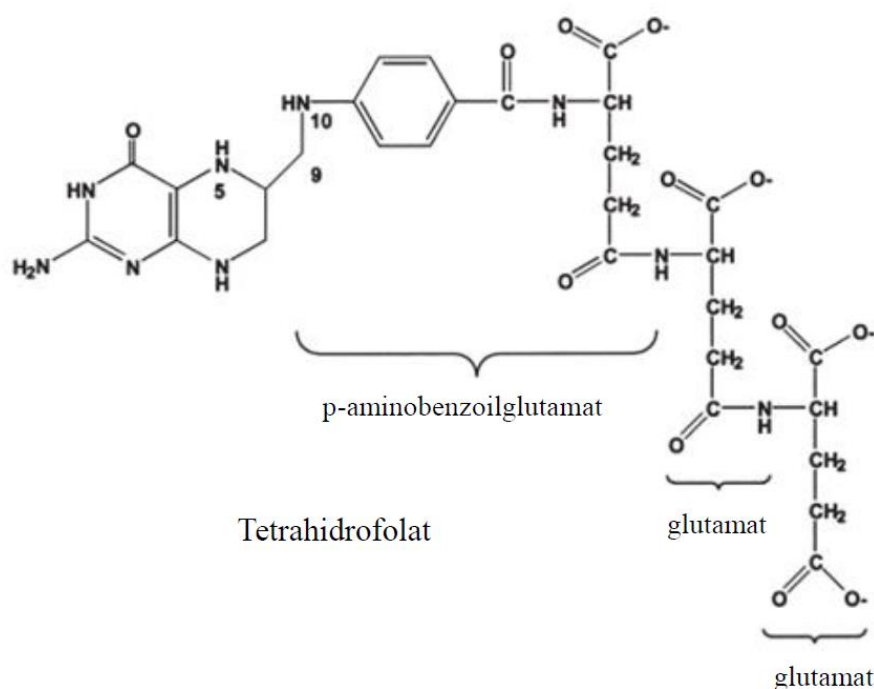
Glede na pomembno vlogo folne kisline v celični delitvi ter razvoju organizma so njen vpliv na reproduktivne lastnosti preizkušali tudi v perutninarstvu. V ta namen je bilo več raziskav opravljenih na kokoših in purah, pri katerih folne kisline niso dodajali le v krmo

temveč so jo injicirali tudi v valilna jajca (Taylor, 1947; Sunde in sod, 1950 cit. po Wilson, 1997; Robel, 1993). Več avtorjev je proučevalo možnosti obogatitve jajc s folno kislino oziroma povezavo med količino folne kisline v krmi in koncentracijo folne kisline v jajcih. Rezultati omenjenih raziskav nakazujejo, da je z dvigom koncentracije folne kisline v krmi nad nivo, ki ga priporoča NRC (0,21-0,31 mg/kg krme), mogoče dvigniti koncentracijo folne kisline v jajcih ter da je učinkovitost prenosa folne kisline iz krme v jajce majhna. Na osnovi poznavanja rezultatov opravljenih raziskav s strani drugih avtorjev smo sklepali, da bi lahko z dodajanjem folne kisline v koncentraciji 50 mg/kg krme dosegli nivo njenega zasičenja v valilnih jajcih, kar bi lahko prispevalo k boljšemu reprodukcijskemu uspehu v matični jati kokoši lahkega tipa. Osnovni namen naše raziskave je bil ugotoviti kako dodatek folne kisline v krmo za nesnice v koncentraciji, ki večkrat presega priporočeno vrednost, vpliva predvsem na reprodukcijske ter tudi na nekatere proizvodne lastnosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 STRUKTURA IN DELOVANJE FOLATA

Folat je sestavljen iz reducirane oblike dela pteridina, ki je povezana s p-aminobenzoil-glutamatom preko metilne skupine (slika 1). V črevesju se razgradi na monoglutamatno obliko, ker je prehod folata v celico možen samo v obliki monoglutamata. Znotraj celice se ti nato ob delovanju encima združijo v poliglutamatne peptide, dolge od 2 do 9 glutamatnih enot, ter služijo kot kofaktorji presnovnih procesov. Eden izmed njih je tetrahidrofolatni poliglutamat, prikazan na sliki št. 1, kateri kemično aktivira in prenaša eno-ogljikne skupine. Vsaka izmed eno-ogljiknih skupin folata ima funkcijo kofaktorja za vsaj eno biosintetsko celično reakcijo, razen 5-formiltetrahidrofolata (levkovorin), ki naj bi bil skladiščna oblika folata (Stover, 2004).



Slika 1: Prikaz strukture tetrahidrofolat triglutamata (prirejeno po Stover, 2004: S4)

Folna kislina je sintetično proizvedena oblika vitamina B₉. Njena biološka vrednost je večja od naravne oblika folata ker je sestavljena samo iz enojnih glutamatov. Slednji se po

prehodu v notranjost celice prav tako povežejo v tetrahidrofolat (THF), ki je kemično identičen tistim, ki izvirajo iz naravnih oz. folatnih oblik vitamina.

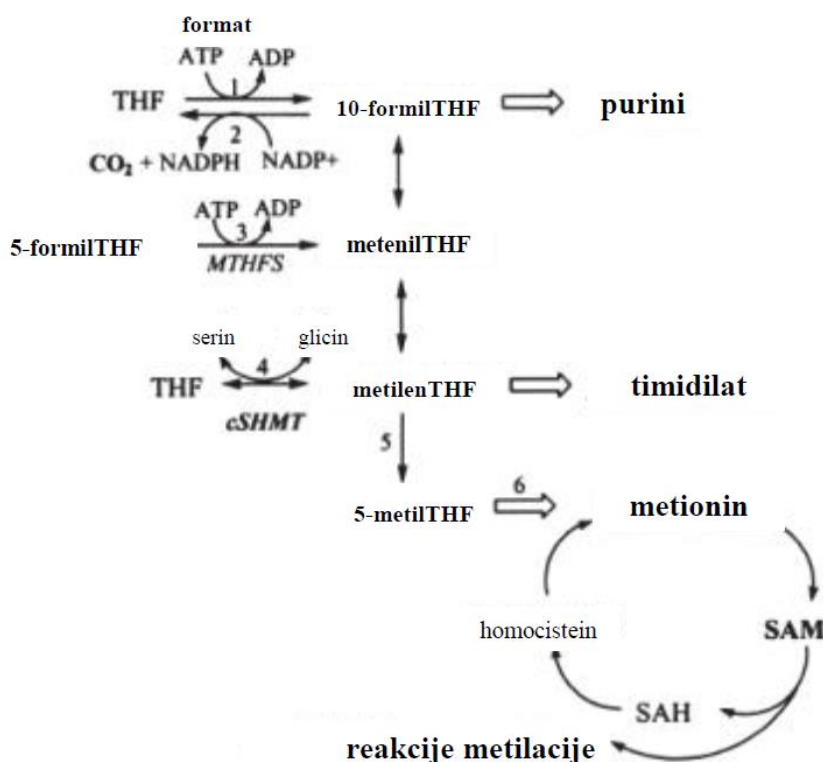
Presnova s pomočjo folata poteka tako v celični citoplazmi, kot tudi v mitohondrijih. V celični citoplazmi tetrahidrofolat prenaša eno-ogljikne skupine za sintezo treh spojin in sicer v različnih oblikah (slika 2):

-10-formilTHF je potreben za sintezo purinskega obroča

-metilenTHF je potreben za pretvorbo deoksiuridin monofosfata v deoksitimidin monofosfat (dTMP)

-5-metilTHF je potreben za ponovno metilacijo homocisteina v metionin.

Metionin se nato lahko pretvori v S-adenozilmetionin (SAM), ki služi kot kofaktor v številnih metilacijskih reakcijah vključujoč metilacijo DNK, RNK, proteinov in nevrottransmiterjev (Stover, 2004).



*ATP – adenzin trifosfat; ADP – adenzin difosfat; THF – tetrahidrofolat; CO₂ – ogljikov dioksid; NADP⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; NADPH – reducirana oblika NADP⁺; MTHFS – metenilTHF sintetaza; cSHMT – serin hidroksimetiltransferaza; SAM – S-adenozilmetionin; SAH – S-adenozilhomocistein;

Slika 2: Presnovne poti v katere je vključen folat (prirejeno po Stover, 2004: S5)

Na celično koncentracijo folata vplivajo tako vnos folatov, njihova poliglutamilacija, njihovo izločanje in razgradnja. Vstop v celico uravnavajo receptorji, torej membranske prenašalske beljakovine na površini celic. Reducirani folatni prenašalci in njihovi receptorji kažejo različne vzorce tkivno specifične ekspresije genov, ter lahko delujejo na različnih področjih polariziranih celic. Receptor Folbp1, eden izmed pomembnih folatnih receptorjev, je izražen v zarodku in plodu. Zelo močno izražen je v nevronske gubah v času preden se nevralna cev zapre. Ta receptor ima torej pomembno vlogo pri vertikalnem prenosu folata z matere na plod med nevrulacijo (oblikovanjem nevralne cevi) in za prenos folata v razvijajočo se nevralno cev (Stover, 2004).

2.2 VIRI VITAMINA B₉

Rastline bogate s folati so solata, špinata, brokoli, brstični ohrovt, repa, pesa, beluši, fižol, grah, avokado, pomaranče in žita. Prav tako sta mleko in kvas vir vitamina B₉ (Vitamin B9 (Folic acid), 2011).

Krajčovičová-Kudláčková in sod. (2013) navajajo, da je vir folatov predvsem zelena listnata zelenjava, zrnje, stročnice ter citrusi. Najdemo jih tudi v jajčnem rumenjaku in jetrih. Ker je vnos folatov z zelenjavo v zimskem in zgodnjem spomladanskem času zmanjšan, jih takrat nadomestimo s prehranskimi dopolnili v katerih je folna kislina.

Dober vir vitamina B₉ so tudi jajca kokoši nesnic, ki so bile krmljene s krmo obogateno s folno kislino. Običajno jajce sicer vsebuje približno 22 µg folatov (približno 6 % dnevne priporočene količine), v primeru krmljenja kokoši z obogateno krmo (koncentracija obogatitve: 4 mg folne kisline/kg krme) se ta vrednost lahko potroji. Zaužita dodatna folna kislina poveča vsebnost folatov v krvni plazmi kokoši in se posledično naloži v jajce. Folati se v jajce naložijo v obliki 5-metilTHF, ki ima visoko biološko vrednost in hkrati ne prikrije simptomov pomanjkanja kobalamina, kar bi posledično lahko vodilo v hudo bolezensko stanje (Hebert in sod., 2005).

2.3 PRIPOROČENI DNEVNI ODMERKI

Absorpcija vitamina B₉ je odvisna od vira le-tega. Oblika vitamina B₉, ki ga najdemo v naravi je namreč slabše izkoristljiva, kot sintetična oblika le-tega. Biološka vrednost zaužite sintetične folne kisline je blizu 100 %, medtem ko je biološka vrednost folne kisline zaužite s prehrano približno 85 %. Priporočen vnos sintetične folne kisline je torej manjši kot vnos folatov s prehrano. Zato so v Ameriki leta 1998 uvedli enote DFE (Dietary folate equivalent), s katerimi so skušali vnos vitamina B₉ iz različnih virov spraviti na skupni imenovalec. En µg DFE ustreza 1 µg folata v hrani oz. 0,6 µg folne kisline dodane k hrani (v primeru obogatitve hrane s folno kislino) oz. 0,5 µg folne kisline v obliki prehranskega dodatka brez hrane (Sutor in Bailey, 2000).

Preglednica 1: Priporočeni dnevni odmerki vitamina B₉ (Sutor in Bailey, 2000: 89).

Kategorija	Priporočen dnevni odmerek (v µg DFE)
Dojenčki (0 – 6 mesecev)	65*
Dojenčki (7 – 12 mesecev)	80*
Otroci (1 – 3 let)	150
Otroci (4 – 8 let)	200
Otroci (9 – 13 let)	300
Najstniki (14 – 18 let)	400
Odrasli (nad 19 let)	400
Nosečnice	600
Doječe matere	500

*vrednosti predstavljajo zadosten dnevni odmerek

V preglednici 1 so prikazane priporočene dnevne količine zaužitega vitamina B₉. Vrednosti pri kategoriji dojenčkov predstavljajo zadostne količine vitamina B₉, saj jim v tem obdobju folne kisline ne dodajamo, zadosti jo namreč dobijo s prehrano. Povečane potrebe po vitaminu B₉ so v času nosečnosti, priporočeno je tudi, da večje količine vitamina zaužijejo ženske, ki načrtujejo nosečnost, zaradi vpliva vitamina B₉ na razvoj plodu.

2.4 POMANJKANJE FOLATA

Prenos folatov in poliglutamilacija sta kritična za zagotavljanje in zadrževanje folatov znotraj celice, kar vpliva na kopičenje oz. akumulacijo folata v celici, saj je le-to mogoče le kadar je folat prisoten v poliglumatni obliki. Znotrajcelični folat, ki ni vezan kot kofaktor encimov ali pa vezan na prenašalske beljakovine se v procesu folatnega katabolizma razgradi. Stopnja razgradnje je odvisna od posameznega tkiva oz. od stopnje obnove v posameznem tkivu. Možgani imajo npr. najmanjšo stopnjo obnove folata v primerjavi z drugimi tkivi. Pri ljudeh je čas obnove folata v tkivih v povprečju daljši od 100 dni. Povečana razgradnja, ob nezadostni prehranski oskrbi, lahko vodi do pomanjkanja folata. Pri bolnikih z aktivnim, nezdravljenim ali metastatskim rakom se pojavi pomanjkanje folatov brez znakov nezadostne oskrbe, slabše absorpcije ali povečanega izločanja folatov. Povečana razgradnja folatov se lahko pojavi tudi med nosečnostjo. Pomanjkanje folata oslabi ponovno metilacijo homocisteina v metionin, kar zaradi povečane koncentracije homocisteina zavira metilacijo deoksiribonukleinske kisline (DNK) in beljakovin. Pri ljudeh pomanjkanje folata zmanjšuje sintezo deoksitimidin trifosfata (dTMP), kar povzroči pojav DNK s povečano vsebnostjo uracila. Znaki splošnega pomanjkanja folata v telesu so nizka koncentracija folata v eritrocitih, povišana koncentracija homocisteina v serumu, povečana vsebnost uracila v DNK, hipometilacija DNK in megaloblastna anemija (Stover, 2004).

2.4.1 Okvare nevralne cevi

Okvare centralnega živčnega sistema se ponavadi pojavijo bodisi v predelu glave ali v spodnjem predelu hrbta. V kolikor se težavi pri zapiranju nevralne cevi pojavijo v zgornjem predelu, torej na 11. torakalnem oz. prsnem vretencu ali višje, takrat pride do nepopolnega razvoja možganov. To okvaro imenujemo anencefalija, zanjo je značilna odsotnost večjega dela možganov in lobanje. Okvara povzroči smrt novorojenčka ob porodu ali v obdobju nekaj ur po porodu. Kadar se okvara zgodi v spodnjem delu hrbtenjače govorimo o okvari nevralne cevi imenovani *Spina bifida*. Poškodba sicer ni letalna, vendar so za uspešno preživetje otroštva potrebne mnoge nevrokirurške operacije, ki ne glede na uspešnost pustijo pečat v nadaljnjem življenju otroka. Otroci s to prirojeno

boleznijo pogosto ostanejo paraplegiki z motnjami v delovanju urogenitalnega in gastrointestinalnega trakta; krajša je tudi pričakovana življenjska doba teh otrok (Ricks in sod., 2012).

2.4.2 Megaloblastna anemija

Pretvorba homocisteina in 5-metilTHF v metionin ter THF je katalitsko odvisna od vitamina B₁₂ oz. kobalamina. Ob pomanjkanju slednjega ali ob genetskih mutacijah se v celicah kopiči 5-metilTHF, kar zmanjšuje koncentracijo ostalih oblik folata in to posledično zavira sintezo purinov. Zato zaradi nezadostne sinteze DNK v rdečih krvničkah pride do pojava megaloblastne anemije. Z dodajanjem folatov izboljšamo stanje anemije oz. preprečimo nadaljnjo anemijo. Problem se pojavi, ko zaradi povečanega vnosa folatov stanje anemije izboljšamo, pomanjkanje kobalamina pa ob tem ostane prikrito. Slednje lahko privede do pojava nepopravljivih nevroloških disfunkcij ter okrnjenega duševnega razvoja organizma (Stover, 2004).

2.4.3 Oslabljen imunski sistem

Vitamin B₉ pomembno vpliva na delovanje imunskega sistema, saj pri posameznikih z okrnjeno oskrbo s folno kislino lahko zaznamo motnje v delovanju imunske zaščite. Pri omenjenih posameznikih se zmanjšajo bakteriocidne in fagocitotske sposobnosti levkocitov, kar poveča dovzetnost posameznika za infekcije. V takšnih primerih dodajanje folne kisline v prehrano izboljša imunski status ter zmanjša število indikatorjev vnetja pri izbranih posameznikih (Greenberg in sod., 2011).

Ker so folni kislini pripisovali protivnetni učinek so tudi Munyaka in sod. (2013) preverili, če ima predhodno dodajanje folne kisline v krmo kokošim nesnicam kakšen vpliv na imunski odziv kokoši ob vakcinaciji le teh z lipopolisaharidom (LPS) bakterije *Escherichia coli*. Po vakcinaciji so kokošim odvzeli kri ter jih usmrtili in pregledali glavne organe imunskega sistema. Rezultati poskusa so pokazali, da folna kislina ni vplivala na imunski odgovor starejših kokoši nesnic.

2.4.4 Rakava obolenja

S svojim vplivom na sintezo purinov ter timidilata in s tem posledično na sintezo nukleinskih kislin ima folat velik pomen za delitev in rast celic. Potreben je torej pri sintezi DNK, prav tako tudi pri procesu popravljanja DNK. Prav ta njegova pomembna vloga nam je lahko v pomoč pri zaustavljanju celične delitve v primeru rakavega obolenja. Za slednjega je sicer značilna hitra stopnja delitve in rasti celic, kar lahko privede do nastanka tumorja. V kolikor zaustavimo delovanje folata se bo zmanjšala tudi stopnja reproduciranja celic in s tem zavremo rast tumorja. Z različnimi raziskavami so dokazali, da je nizek folatni status organizma povezan s poškodbami DNK verige, nenormalnim procesom metilacije DNK, povečanim številom mutacij ter, da je preprečevanje oz. izboljševanje le teh možno z dodajanjem folne kisline. V poskusih, v katere so bile vključene živali, so prišli do ugotovitve, da dodajanje folne kisline organizmu pred pojavom rakavega obolenja, le-tega preprečuje. V kolikor se v organizmu že razvijajo preneoplastične celice pa dodajanje folne kisline še olajša njihovo rast ter s tem napredovanje rakavega obolenja. V medicini se substance, ki onemogočajo normalno presnovo folatov, uporabljajo kot sestavine zdravil predvsem proti rakavim obolenjem, malariji ter luskavici (Smith in sod., 2008).

Ebbing in sod. (2009) so na Norveškem preiskovali, kako dodajanje folne kisline in vitamina B₁₂ vpliva na pojav rakavih obolenj ter smrtnost pri bolnikih s srčno-žilnimi obolenji, ter zaznali večje število rakavih obolenj ter večjo smrtnost v primeru dodajanja folne kisline. Upoštevati je potrebno tudi dejstvo, da na Norveškem nimajo uveljavljene obvezne obogatitve žitnih izdelkov, zato je imelo dodajanje testnih koncentracij folne kisline močan vpliv na organizem prav zaradi začetne slabše oskrbljenosti ljudi s folno kislino.

Podoben poskus so izvedli tudi na podganah, kjer so testirali vpliv folne kisline na razvoj tumorja mlečne žleze. V puberteti so podganam sprožili razvoj tumorja in nato spremljali, kako dodajanje folne kisline vpliva na napredovanje le-tega. Skozi poskus so prišli do sklepa, da dodajanje folne kisline podganam spodbudi napredovanje, sicer namenoma

povzročenega tumorja mlečne žleze. V primeru dodajanja folne kisline so opazili tumorje mlečne žleze, ki so bili večji tako po volumnu, kot tudi po masi (Manshadi in sod., 2014).

Vollset in sod. (2013) so v pet let trajajočem preizkusu preverili ali obogatitev žitnih izdelkov s folno kislino vpliva na pojav rakavih obolenj. Naključno izbranim so dodajali folno kislino in drugim placebo. Prišli so do ugotovitev, da dodajanje folne kisline ne vpliva na povečano število rakavih obolenj prostate, debelega črevesja, prsi, pljuč ali kateregakoli drugega rakavega obolenja. Pomemben je tudi podatek, da so bile koncentracije oz. količine dodane folne kisline v poskusu večje od tistih, ki jih zaužijemo z obogatenimi žitnimi izdelki, torej naj obogatitev žit s folno kislino ne bi imela vpliva na pojavnost in razvoj rakavih obolenj pri ljudeh.

2.4.5 Vročinski stres

Koyama in sod. (2012) so pri poskusnih miškah opazovali vpliv folne kisline na razvoj zarodkov izpostavljenim vročinskemu stresu. Razvoj *in vitro* zarodkov naj bi zavrla prosti radikali, ki so posledica vročinskega stresa. Raziskovalci so v tem primeru dokazali antioksidativne lastnosti folne kisline, ki je preprečila prostim radikalom, da bi poškodovali celice ter s tem onemogočili nadaljnji razvoj zarodka.

2.5 OBOGATITEV ŽIT S FOLNO KISLINO TER NJENI UČINKI

Zaradi nezadostne oskrbe z vitaminom B₉ in njegove pomembne vloge v našem telesu so se v nekaterih državah odločili za obogatitev prehranskih izdelkov s folno kislino. Najprej so se tega lotili v Združenih državah Amerike in sicer leta 1998. Že od leta 1991 so s priporočili in publikacijami obveščali in izobraževali javnost o pomembnosti zauživanja zadostne količine folne kisline. Morda zato, ker polovico nosečnosti ni bilo načrtovanih ali zato, ker so ženske za nosečnost izvedele v času, ko je bil proces izoblikovanja nevralne cevi že končan; vendar rezultat preprečevanja pojava okvar nevralne cevi pri otrocih ni bil zadovoljiv. Posledično se je ameriška organizacija za prehrano FDA (Food and Drug Administration) odločila za obvezno obogatitev žitnih izdelkov s folno kislino. Za povečanje zaužite količine folne kisline za 0,1 mg dnevno naj bi zadostovalo 140 µg

dodane folne kisline na 100 g izdelka. Priporočen vnos folne kisline za žensko v reproduktivni dobi, torej v času, ko bi lahko prišlo do nosečnosti, znaša 0,4 mg dnevno. Določba je stopila v veljavo 1. januarja 1998 (Pitkin, 2007).

Honein in sod. (2001) so preverili kakšen učinek je imela obogatitev hrane s folno kislino na pojav okvar nevralne cevi pri novorojenčkih. S pomočjo rojstnih certifikatov so pridobili podatke ter primerjali stanje pred (oktober 1995 – december 1996) in po (oktober 1998 – december 1999) uveljavitvi obvezne obogatitve žitnih izdelkov. Pojav vseh oblik okvar nevralne cevi je bil v času po obogatitvi žitnih izdelkov za 19 % manjši, kot v obdobju pred njo. Pojav okvare imenovane *Spina bifida* se je zmanjšal za 23 % v primerjavi s časom pred uveljavitvijo obogatitve žit s folno kislino.

Stover (2004) navaja, da ima folat pomembno vlogo tudi pri popravljanju manjših genetskih napak. Z obogatitvijo žitnih izdelkov s folno kislino, se je v Ameriki povečala frekvenca spontanih splavov. Predvidevajo, da zaradi boljše oskrbljenosti materinega telesa s folati pride do nosečnosti tudi v primerih, ko je zelo malo možnosti za nadaljnji razvoj zarodka. Povišana koncentracija folatov v materinem telesu naj bi podaljšala nosečnosti, katere bi se v pogojih pred obogatitvijo s folno kislino verjetno končale preden bi jih sploh lahko zaznali. Povišana koncentracija folata v materinem telesu naj bi tako omejila selekcijski pritisk v obdobju zgodnjega razvoja ter tako v populaciji zadržala genotipe, ki bi bili sicer letalni.

Ricks in sod. (2012) so primerjali rezultate obogatitve hrane s folno kislino v nekaterih izbranih državah ter prišli do spoznanja, da je v večini držav dodana folna kislina zmanjšala pojav okvar nevralne cevi pri novorojenčkih. Do nespremenjenega stanja je prišlo v Braziliji, kjer vzrokov za takšne rezultate še niso pojasnili. Prav tako je nespremenjeno stanje ostalo v Peruju in sicer zaradi prenizke koncentracije dodane folne kisline. Dodajali so le 1,2 mg folne kisline na kg pšenične moke, kar očitno ni bilo dovolj za preprečitev okvar centralnega živčnega sistema otrok. Po priporočilih svetovne zdravstvene organizacije (World Health Organization - WHO) naj bi bila priporočena koncentracija folne kisline v obogatenem izdelku 2,6 mg na kg izdelka, torej je stanje otrok

s prirojeno napako živčnega sistema tudi po obogatitvi prehrabnih izdelkov s folno kislino v Peruju pričakovano nespremenjeno.

2.6 VPLIV FOLNE KISLINE NA POSAMEZNE VRSTE ŽIVALI

2.6.1 Vitamin B₉ pri prašičih

Harper in sod. (1994) so ugotavljali kako vključevanje folne kisline v prehrano svinj vpliva na koncentracijo folatov v krvnem serumu živali ter na njihove reprodukcijske lastnosti. V krmo so dodajali tri različne koncentracije folne kisline (1, 2 in 4 µg folne kisline/kg krme) ter rezultate primerjali s kontrolno skupino živali (krma brez dodane folne kisline). Ugotovili so, da se koncentracija folatov v serumu znižuje od časa paritve do 55. dneva brejosti. Nato ostaja na enakem nivoju do 110. dneva brejosti in se vrne na višji nivo po odstavitvi pujskov. Glede na koncentracijo dodane folne kisline je linearno naraščala tudi koncentracija folatov v krvnem serumu živali. Kljub dodajanju folne kisline v prehrano, sprememb v reproduktivnih lastnostih živali ni bilo. Dodatne količine folne kisline v prehrani so torej le ublažile padec koncentracije folatov v serumu živali med brejostjo, niso pa vplivale na reproduktivne lastnosti.

Matte in sod. (2006) navajajo, da je učinek folne kisline v tem, da zaščiti zarodek oz. plod pred maternično zavrnitvijo in hkrati stimulira promotorje, ki spodbujajo rast in razvoj zarodka oz. plodu in sicer preko svojega vpliva na tvorbo DNK in beljakovin. Ob dodatku folne kisline v prehrano svinj, se je velikost gnezda ob praritvi povečala za približno 10 %. Nepravilen razvoj zarodka sicer povzroči tudi previsoka koncentracija homocisteina v maternici, kar pa je lahko posledica nezadostne oskrbe s folati, ki bi homocistein pretvorili v metionin.

2.6.2 Vitamin B₉ pri ovcah

Vpliv dodajanja folne kisline v krmo so preiskovali tudi pri ovcah. Poskus so ponovili v času estrusa in anestrusa, torej v paritveni sezoni in izven nje. Spremljali so kako dodana folna kislina vpliva na koncentracijo folatov v krvni plazmi in rdečih krvnih celicah ter ugotovili, da se je njihova koncentracija v vseh poskusnih skupinah povečala po krmljenju

obogatene krme. Reprodukativne lastnosti ovc so ostale nespremenjene. Dodana folna kislina namreč ni imela vpliva na plodnost ter embrionalni pogin niti na velikost in maso jagnjet ob jagnjitvi (Méthot in sod., 2008).

2.6.3 Vitamin B₉ pri perutnini

2.6.3.1 Pure

Že pred časom je Robel (1993) v prehranskem poskusu preverjal učinek dodatka folne kisline na valilnost. Z dodajanjem dveh različnih koncentracij (2,64 mg folne kisline/kg krme in 5,51 mg folne kisline/kg krme) folne kisline v krmo in z injiciranjem folne kisline direktno v jajca (skupina s krmo z nižjo koncentracijo dodane folne kisline), niso dosegli učinka na valilnost. Ob tem so opazili povečano maso jajc in s tem večjo telesno maso novo izvaljenih puric in purančkov v skupini pur, ki so dobivale krmo z višjo koncentracijo dodane folne kisline (5,51 mg folne kisline/kg krme). Slednji podatek je izrednega pomena pri reji, saj večja telesna masa ob izvalitvi pripomore k večji vitalnosti pur.

2.6.3.2 Kokoši nesnice

Začetki raziskovanja dodajanja folne kisline v krmo kokoši segajo daleč nazaj v leto 1947. Tega leta je Taylor (1947) opisal poskus v katerem je kokošim pasme beli leghorn po končanem prvem letu nesnosti v krmo dodajal folno kislino in sicer v koncentraciji 1 mg/kg krme. V poskusu je ugotovil, da imajo kokoši, ki jih redimo za prirejo jedilnih jajc manjše potrebe po folni kislini, kot tiste, ki jih redimo za pridobivanje valilnih jajc. V slednjem primeru morajo kokoši dobiti krmo z večjo vsebnostjo folne kisline, saj le ta prispeva k razvoju zarodka.

Sunde in sod. (1950), cit. po Wilson (1997), navajajo, da pomanjkanje folne kisline v krmi za starševske jate vpliva na razvoj njihovih potomcev. Pri valjenju jajc iz jate, ki je dobivala krmo z deficitarno vsebnostjo folne kisline so opazili veliko zamrtje zarodkov 20. dan valjenja. Piščanci so torej zamrli po tistem, ko so že predrli zračni mehurček. Vzrok bi lahko bila deformacija kljunov in s tem neuspešen preboj piščanca skozi jajčno lupino. V

kolikor pa so v jajca pred valjenjem ali vsaj 17. dan valjenja injicirali folno kislino, se je stopnja zamrtja zarodkov precej zmanjšala.

Vedno več pozornosti se posveča pomenu folne kisline v humani prehrani, zato so House in sod. (2002) izvedli poskus, v katerem so skušali raziskati odnos med vsebnostjo folne kisline v jedilnih jajcih in vsebnostjo folne kisline v krmi za kokoši nesnice linije hyline W36. V prvi študiji jih je zanimalo, ali dodana folna kislina v krmi kokoši nesnic vpliva na vsebnost folne kisline v jedilnih jajcih. V primeru, ko je bila krma (na sicer ječmenovi osnovi) za kokoši obogatena z 10 mg folne kisline/kg krme, se je količina folne kisline v jajčnem rumenjaku občutno povečala (41 µg folne kisline/jajce), v primerjavi s tisto v jajcih kokoši, ki so dobivale neobogateno krmo (17,5 µg folne kisline/jajce). V drugi študiji so ugotavljali pri kateri koncentraciji folne kisline v krmi, dosežemo zasičenje oziroma maksimalno količino folne kisline v jajcu. Poskusne skupine so dobile krmo z 0, 1, 2, 4, 8, 16 ali 32 mg folne kisline/kg krme. Raziskava je pokazala, da je mogoče 90 % zasičenost jajca s folno kislino doseči že, če se v krmi nahaja 4 mg folne kisline/kg. S tretjo študijo so ugotavljali obstojnost folne kisline v jajcih kokoši nesnic, ki so bile krmljene z neobogateno in s folno kislino obogateno krmo, med skladiščenjem pri 4°C. Vsakih sedem dni so preverili vsebnost folne kisline v jajcih. Poskus je trajal vse dokler jajca niso bila stara 28 dni, kar je po evropski zakonodaji minimalni rok uporabe jedilnih jajc. Ugotovili so, da je vsebnost folne kisline v jajcu stabilna in se v času, ki ga določa rok uporabe, ne spreminja.

Hebert in sod. (2005) so prav tako raziskovali povezavo med koncentracijo dodane folne kisline v krmi kokoši nesnic ter vsebnostjo le-te v jajcih. Kokošim linij hyline W36 in hyline W98, ki sta izhajali iz pasme leghorn, so 21 dni dali na voljo krmo obogateno z 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ali 128 mg folne kisline/kg krme. Spremljali so proizvodne parametre, raven folatov in homocisteina v krvi kokoši ter vsebnost folatov v jajcih. Z dodajanjem folne kisline v krmo so vplivali na povečano vsebnost folatov v krvi in jajcih ter zmanjšano koncentracijo homocisteina v krvi kokoši. Večjo maso rumenjaka in tudi celotnega jajca so opazili pri liniji hyline W98 v primerjavi z linijo hyline W36, vendar je bilo to neodvisno od dodajanja folne kisline v krmo. Maksimalna vsebnost folne kisline v jajcu je bila dosežena, ko so kokoši dobivale krmo, v kateri se je nahajalo med 2 in 4 mg folne

kisline/kg krme. Krmljenje kokoši s krmo z višjimi koncentracijami folne kisline ni vplivalo na večjo vsebnost folne kisline v jajcih, saj je že koncentracija 2-4 mg/kg krme zadostovala za doseg nasičenosti prekursorskega bazena kokoši za nalaganje folatov v jajce. Koncentracija folatov v krvi je bila sicer res povečana pri kokoših krmljenih z dodatkom 128 mg folne kisline/kg krme, vendar se vsa ta količina folatov ne more prenesti v jajčni rumenjak.

Khalifah in Shahein (2006) sta raziskovala vpliv dodane folne kisline na proizvodne parametre lokalne pasme kokoši nesnic baheij. V krmo sta dodajala folno kislino v koncentraciji 0, 1, 2, 4, 8, 16 in 32 mg folne kisline/kg krmne mešanice in beležila proizvodne parametre. V osem tednov trajajočem poskusu sta ugotovila, da dodajanje folne kisline v krmo kokoši nesnic ni imelo značilnega vpliva na nesnost, zauživanje ter izkoriščanje krme, oplojenost in valilnost. Tudi na izgubo mase jajc med valjenjem, dodatek folne kisline ni vplival. Koncentracija folatov v jajcih kokoši, ki so dobivale krmo obogateno z 2 mg folne kisline/kg je bila precej višja v primerjavi z jajci kokoši, ki so dobivale neobogateno krmo, kar kaže na močno povezavo med vsebnostjo folatov v jajcu in zaužito folno kislino. Avtorja navajata, da je dodatek folne kisline v krmo kokoši nesnic v koncentraciji 32 mg/kg krme vplival na večjo maso izvaljenih piščancev.

Še ena raziskava je pokazala, da se povečana vsebnost folne kisline v krmi kokoši nesnic odrazi v povečani vsebnosti folatov v jajcih. Benkova in sod. (2009) so kokoši krmili s tremi različnimi mešanicami in sicer s kontrolno krmno mešanico (0,5 mg folne kisline/kg krme) ter dvema poskusnima krmnima mešanicama (1,05 mg folne kisline/kg krmne mešanice ter 3,5 mg folne kisline/kg krmne mešanice). Največjo vsebnost folatov so ugotovili v jajcih kokoši nesnic krmljenih s poskusno krmno mešanico z najvišjo koncentracijo folne kisline (3,5 mg folne kisline/kg krmne mešanice).

Dickson in sod. (2010) so nadaljevali s proučevanjem rezultatov, ki so jih leta 2005 objavili Hebert in sod. Zasnovali so dolgotrajen poskus, ki je potekal približno 11 mesecev (11 serij po 28 dni) in vanj vključili kokoši nesnice linije hy-line CV20. Preizkušali so tri koncentracije dodane folne kisline v krmo in sicer 0, 2 in 4 mg folne kisline/kg krme. Ugotovitve kažejo, da se je v tem dolgotrajnem poskusu najbolje izkazala krma obogatena

s 4 mg folne kisline/kg krme. Kokoši krmljene z omenjeno krmo so namreč najboljše deponirale folno kislino v jajca in s tem so imela jajca te skupine največjo vsebnost folne kisline.

Krishnan Rajalekshmy (2010) je ugotavljal, kako različne koncentracije dodane folne kisline v krmo kokoši nesnic vplivajo na posamezne proizvodne parametre. V poskus je vključil 29 tednov stare kokoši lahkega tipa provenience bovans. Uporabil je tri različne koncentracije dodane folne kisline in sicer 0, 2 in 4 ppm. Ugotovil je, da folna kislina dodana v krmo v koncentraciji 2 ppm izboljša nesnost kokoši. Prav tako je obogatitev krme s folno kislino vplivala na večjo vsebnost folne kisline v krvni plazmi kokoši ter v jajcih. Prav nasprotno je bila masa jajc večja v primeru, ko so kokoši zauživale krmno mešanico brez dodane folne kisline (0 ppm), vendar ob dodatku 500 ppm holina v krmo.

Hebert in sod. (2011) so v svojih izhodiščnih raziskavah (Herbert in sod., 2005) ugotovili, da je mogoče doseči zasičenost rumenjaka s folno kislino v kolikor znaša koncentracija slednje v krmni mešanici 4 mg/kg krme. Preveriti so želeli tudi kakšen vpliv ima presnova sestavin osnovne krme na količino folatov naloženih v jajce. Vključili so krmo katere osnovna sestavina je bila koruza, pšenica ali ječmen. Krmne mešanice so uravnotežili, da so živali s povprečnim dnevnim vnosom, 100 g krme dnevno, dobile zadostno količino hranil. Krmne mešanice so obogatili s 4 mg folne kisline/kg krme in nato spremljali količino folatov naloženih v jajcih. Največjo vsebnost folatov so imela jajca kokoši nesnic, krmljenih s krmno mešanico na osnovi koruze, medtem ko so kokoši krmljene s krmno mešanico bazirano na osnovi pšenice znesle jajca z najmanjšo vsebnostjo folatov. V krmne mešanice so poskusno dodajali tudi encime, da bi izničili vpliv neškrobnih polisaharidov pri prebavi ječmena in pšenice, vendar encimi niso imeli nobenega vpliva na spremenjeno prebavo ter presnovo folatov in njihovo nalaganje v jajca.

Tactacan in sod. (2012) so pri krmljenju 34 tednov starih kokoši provenience shaver s krmo obogateno z dodatkom 10 oz. 100 mg folne kisline/kg ugotovil povečano vsebnost folatov v krvni plazmi ter v jajcih, v primerjavi s kontrolno skupino, ki je dobivala le osnovno krmo brez dodane folne kisline. Dodatek folne kisline pa ni vplival na nesnost kokoši.

3 MATERIALI IN METODE

Poskus smo zasnovali in izvedli na Katedri za znanosti o rejah živalih, Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Živali smo krmili s popolno krmno mešanico za kokoši nesnice NSK-1 podjetja Jata Emona d.o.o. iz Ljubljane. V to mešanico, v obliki drobljenca smo v mešalnici krmil na Oddelku za zootehniko v Grobljah pri Domžalah vmešali folno kislino. Kokoši, na katerih smo izvajali poskus so bile uhlevljene na Pedagoško raziskovalnem centru (PRC) za perutninarstvo na Krumperku pri Domžalah. Poskus je potekal v obdobju od konca aprila do konca maja 2013.

3.1 KONCENTRACIJA FOLNE KISLINE

Po pregledu nekaterih starejših objav o vplivu dodatka folne kisline v krmo različnih vrst perutnine smo se odločili, da v poskus vključimo precej visoko koncentracijo dodane folne kisline. Koncentracija 50 mg folne kisline na kg krmne mešanice se nam je zdela dovolj visoka, da bi se vpliv le-te pokazal v spremenjenih oz. izboljšanih reprodukcijskih lastnostih kokoši nesnic ter v izboljšani valilnosti piščancev.

3.2 ŽIVALI

V poskus smo vključili kokoši, ki so tvorile starševsko jato za pridobivanje komercialne križanke lahkega tipa prelux-G (grahasta nesnica) (slika 3). Starševsko jato so sestavljali petelini tradicionalne pasme slovenska grahasta kokoš ter kokoši tradicionalne pasme slovenska rjava kokoš. Kokoši so bile izpostavljene klasičnemu osvetljevalnemu programu: 14 ur luči + 10 ur teme. Intenzivnost osvetlitve na nivoju oči živali je znašala 5 – 10 luxov.

Preglednica 2: Podatki o poskusnih skupinah kokoši

Oddelek v hlevu	Matična jata	Skupina	Število živali v oddelku	Razmerje med spoloma
FA-1	Px-G (pozno operjene matere)	Folna kislina	284 ♀ + 33 ♂	1 ♂ : 8,6 ♀
K-1	Px-G (pozno operjene matere)	Kontrola	323 ♀ + 38 ♂	1 ♂ : 8,5 ♀
FA-2	Px-G (zgodaj operjene matere)	Folna kislina	149 ♀ + 17 ♂	1 ♂ : 8,7 ♀
K-2	Px-G (zgodaj operjene matere)	Kontrola	150 ♀ + 17 ♂	1 ♂ : 8,8 ♀

Živali so bile uhlevljene v štirih oddelkih hleva s talno rejo. Oddelki so se nahajali v skupnem prostoru, medsebojno so bili ločeni le z mrežo. Oddelki so bili nastlani z oblanjem v debelini cca. 10 cm ter opremljeni z lesenimi gredami (15 cm/kokoš), okroglimi krmilniki (4 cm krmilnega prostora/kokoš), kapljičnimi napajalniki (1 kapljični napajalnik/8 kokoši) in kovinskimi gnezdi z ročnim pobiranjem jajc (1 gnezdo/6 kokoši). Uhlevljenih je bilo 906 kokoši ter 105 petelinov, torej skupno 1011 živali. Te živali smo pred začetkom poskusa naključno porazdelili v štiri oddelke - v dveh izmed njih so živali dobivale poskusno krmno mešanico obogateno s folno kislino (433 kokoši in 50 petelinov), v preostalih dveh pa osnovno (kontrolno) krmno mešanico (473 kokoši in 55 petelinov). V vseh oddelkih je bilo razmerje med spoloma, nekje med 8,5 in 8,8 kokoši na enega petelina. Poskus je bil razdeljen na dve obdobji: predposkusno (en teden) in poskusno (tri tedne). Na začetku predposkusnega obdobja so bile kokoši stare 35 tednov, na koncu poskusnega obdobja pa 39 tednov. V oddelkih FA-1 in K-1 so bile vseljene pozno operjene slovenske rjave kokoši, v oddelkih FA-2 in K-2 pa zgodaj operjene slovenske rjave kokoši (preglednica 2). Kokoši v oddelkih FA-1 in FA-2 so dobivale krmno mešanico obogateno z dodatkom 50 mg folne kisline/kg krme, medtem, ko so bile kokoši v kontrolni skupini nastanjene v oddelkih K-1 in K-2. Te živali so dobivale samo osnovno krmo (NSK-1) brez dodane folne kisline.



Slika 3: Starševska jata križank provenience prelux-G (foto: M. Pestotnik, 2013)

Med poskusom smo dnevno spremljali nesnost in pogin živali. Kokoši in peteline smo vzorčno tehtali na začetku ter na koncu poskusnega obdobja.

3.3 PRIPRAVA IN PORABA KRME

Skozi celotno trajanje predposkusnega in poskusnega obdobja je bila krma vsem živalim ves čas na voljo (*ad libitum*). V vseh skupinah je osnovo predstavljala popolna krmna mešanica za kokoši nesnice z oznako NSK-1 (Jata Emona d.o.o., Ljubljana) v obliki drobljenca. Sestava te mešanice je prikazana v preglednici 3, izračunana kemijska sestava pa v preglednici 4. Vsebnost folne kisline v osnovni krmni mešanici smo izračunali s pomočjo preglednic in podatkov o vsebnosti folne kisline v vsaki posamezni sestavini krme NSK-1 (NRC, 1994).

Preglednica 3: Sestavine in njihov delež v krmni mešanici NSK-1, proizvajalca Jata Emona d.o.o., Ljubljana

Sestavina	Delež v NSK-1 (%)
Koruza (8,5 % SB)	60,00
Sojine tropine (49,5 % SB)	17,0
Sojino olje	1,00
Sončnične tropine (41,5 % SB)	6,00
Koruzni gluten (60 % SB)	1,00
Melasa sladkorne pese (10,1 % SB)	3,07
Kalcijev karbonat	8,80
Kalcij-natrijev fosfat	2,00
Monodikalcijev fosfat	0,70
Natrijev bikarbonat	0,20
Natrijev klorid	0,20
Krmni dodatki*	0,03

*Dodatki (dodani na 1 kg): 10000 I.E. vitamina A (E672), 2500 I.E. vitamina D3 (E671), 25 mg železa (iz železovega sulfata-monohidrata) (E1), 6 mg bakra (iz bakrovega sulfata-pentahidrata) (E4), 100 mg mangana (iz manganovega oksida) (E5), 50 mg cinka (iz cinkovega sulfata-monohidrata) (E6), 0.3 mg kobalta (iz bazičnega kobaltovega karbonata-monohidrata) (E3), 0.68 mg joda (iz kalijevega jodida) (E2), 0.15 mg selena (iz natrijevega selenita) (E8), 5.4 mg BHA (E320) in BHT (E321), 9.33 mg etoksikvina (E324), 1 mg etilestera beta-apo-8-karotenske kisline (E160f), 4 mg kantaksina (E161g), 10 mg luteina (E161b), 100 mg 6-fitaze (E1614(i)).

Preglednica 4: Izračunana vsebnost hranilnih snovi v krmni mešanici NSK-1

Surovina	Vsebnost v NSK-1
Metabolna energija (MJ/kg)	11,3
Surove beljakovine (g/kg)	162,0
Surova vlaknina (g/kg)	32,0
Surove maščobe (g/kg)	36,0
Surovi pepel (g/kg)	116,0
Lizin (g/kg)	7,5
Metionin (g/kg)	4,0
Kalcij (g/kg)	35,0
Fosfor (g/kg)	5,0
Natrij (g/kg)	1,5
Folna kislina (mg/kg)	0,85

Folno kislino smo v krmno mešanico vmešali sami. Kot osnovo smo uporabili krmno mešanico NSK-1, v katero smo dodali izračunano količino folne kisline, da smo dosegli koncentracijo 50 mg folne kisline na kilogram krmne mešanice. Uporabili smo folno kislino v kristalinični obliki (rumen prašek), italijanskega proizvajalca Farmalabor (Farmalabor s.r.l., Milan, Italija) (slika 4).



Slika 4: Embalaža folne kisline uporabljene v poskusu (foto: M. Pestotnik, 2013)

V manjšem mešalniku (slika 5) mešalnice Univerze v Ljubljani Biotehniške fakultete Oddelka za zootehniko smo najprej pripravili predmešanico s folno kislino. V 8 kg krmne mešanice NSK-1 smo vmešali 6,4 g folne kisline v prahu ter zmes 4 minute mešali v mešalniku s hitrostjo 500 obratov na minuto. Dva kilograma tako pripravljene predmešanice smo nato v večjem mešalniku (slika 6) vmešali v 30 kg NSK-1 krmne mešanice in mešali 5 minut. S folno kislino obogateno krmno mešanico smo nato zapakirali v vreče po 32 kg (slika 7) ter jo odpeljali na PRC Krumperk, kjer smo jo vsuli v krmilnike kokoši v poskusnih skupinah. Ločeno smo v vsakem oddelku spremljali porabo krme.



Slika 5: Mešalnik za pripravo predmešanice za krmne mešanice (foto: M. Pestotnik, 2013)



Slika 6: Mešalnik za pripravo poskusne krmne mešanice (foto: M. Pestotnik, 2013)



Slika 7: Pripravljena poskusna krmna mešanica (foto: M. Pestotnik, 2013)

Z namenom prilagoditve kokoši na novo krmno mešanico, smo jih s poskusno krmo (kontrolno, obogateno s folno kislino) začeli krmiti en teden pred začetkom poskusnega obdobja. Na začetku poskusnega obdobja smo iz krmilnikov odstranili vso krmo, ki je ostala iz predposkusnega obdobja in zatehtali novo krmo. Po končanem poskusnem obdobju smo stehali ostanke krme v krmilnikih ter iz razlike med zatehtano krmo na

začetku poskusa in ostanki krme ob koncu poskusa izračunali porabo krme po oddelku oziroma živali.

3.4 VALJENJE

Valilna jajca smo pobirali ločeno po oddelkih večkrat dnevno in jih nato do vlaganja v valilnike skladiščili v skupnem prostoru. V valilnike smo jih vlagali dvakrat v desetdnevnem razmaku. Pazili smo, da smo pri obeh valjenjih v valilnike vlagali jajca približno enakih starosti, zato smo pri obeh valjenjih z začetkom njihovega zbiranja pričeli 11-12 dni pred predvidenim vstavljanjem v valilnike. V času skladiščenja jajc nismo obračali, smo jih pa ob vložitvi v valilnike razkužili s plinom formaldehidom. Valjenje je potekalo v valilnikih znamke Petersime (Belgija) in sicer prvih 18 dni pri temperaturi 37,8°C in 60 % vlažnosti zraka ter zadnje 3 dni pri temperaturi 37,2°C in 70 % relativni vlažnosti zraka. Med valjenjem je bilo zagotovljeno ustrezno prezračevanje valilnikov, prvih 18 dni valjenja pa tudi obračanje jajc, s katerim preprečimo, da bi se zarodki v jajcu prilepili na jajčno lupino.

Pred vlaganjem v valilnike smo jajca označili z oznako poskusne skupine in jih skupinsko stehali.



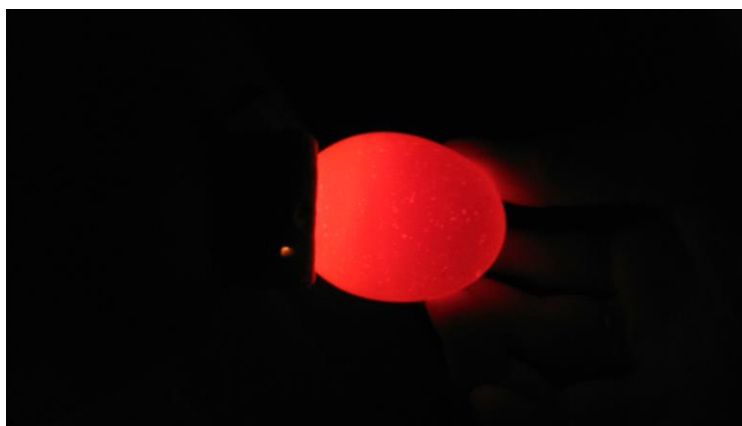
Slika 8: Jajca naložena na voziček predvalilnika (foto: M. Pestotnik, 2013)

Ob izvalitvi (21. dan valjenja) smo piščance prelux-G pobrali ločeno glede na poskusno skupino, jih prešteli in stehtali.



Slika 9: Izvaljeni piščanci na lesah izvalilnika (foto: M. Pestotnik, 2013)

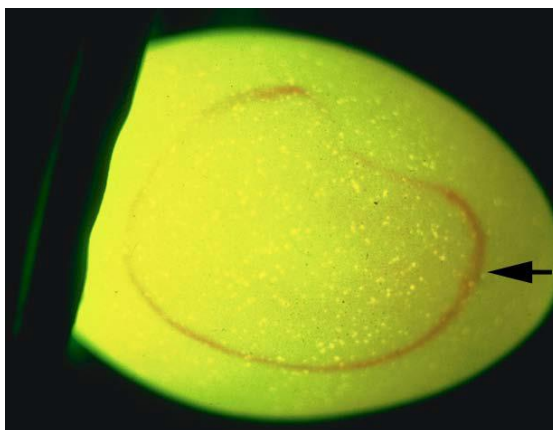
Neizvaljena jajca smo presvetlili z ovoskopom ali razbili na ravno površino ter tako makroskopsko ocenili ali je bilo jajce neoplojeno ali pa je med valjenjem prišlo do zamrtja zarodka. Med neoplojena jajca smo uvrstili vsa jajca, pri katerih med presvetlitvijo nismo opazili nobenih znakov razvoja zarodka. Ob presvetlitvi smo v njih opazili le obrise rumenjaka (slika 10).



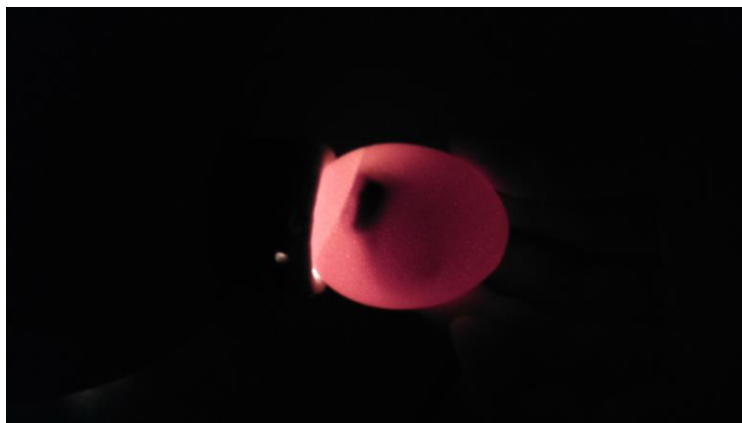
Slika 10: Neoplojeno jajce, presvetljeno z ovoskopom (foto: M. Pestotnik, 2013)

Ernst in sod. (2004) navajajo, da v skupino neoplojenih jajc spadajo jajca, ki so dejansko neoplojena ter tista oplojena jajca, v katerih ni nikakršnih znakov razvoja in tudi jajca s pozitivnim razvojem. Značilno za slednje je, da se v jajcu razvoj zarodka začne, vendar se prekine preden pride do tvorbe krvi, zato je takšno jajce ob presvetljevanju opredelimo, kot neoplojeno, saj med presvetljevanjem ne opazimo krvožilja, ki bi nakazovalo na razvoj zarodka. Med neoplojenimi jajci je običajno le 1-2 % jajc s pozitivnim razvojem. V normalnih okoliščinah je več kot polovica neoplojenih jajc dejansko neoplojenih. Ob razbitju takšnega jajca na ravno površino, na rumenjaku opazimo blastodisk in sicer kot majhno svetlo piko, ki jo obdaja gmota nepravilne oblike. Na oplojena jajca brez vsakršnih znakov razvoja naletimo le poredkoma. V tem primeru je blastodisk še vedno v obliki ter velikosti oplojene jajčne celice, vendar že lahko opazimo njegovo razpadanje.

Med zamrte zarodke smo uvrstili zarodke, ki so zamrli v različnih obdobjih embrionalnega razvoja. Za zarodke, zamrte v zgodnejših fazah razvoja je značilen obroč iz krvi, ki se razteza po notranji površini lupine (slika 11), za kasneje zamrte zarodke pa temnejša gmota, ki predstavlja skupek tkiv zarodka (slika 12).



Slika 11: Jajce z zgodaj zamrtim zarodkom, viden obroč iz krvi (Ernst in sod., 2004)



Slika 12: Jajce z zamrtim zarodkom; viden skupek tkiv, presvetljeno z ovoskopom (foto: M. Pestotnik, 2013)

Če v jajcu z obročem iz krvi ne opazimo nobene embrionalne strukture, govorimo o blastodermu brez zarodka, če pa opazimo katero od embrionalnih struktur (ponavadi tkivo srca) govorimo o cističnem zarodku (Ernst in sod., 2004).

V naši raziskavi smo vse zarodke z obročem iz krvi uvrstili med zamrte zarodke in torej nismo posebej ločevali blastodermov brez zarodka od cističnih zarodkov. Zarodek, ki je zamrl nekaj dni pred predvidenim datumom izvalitve je zapolnjeval večino volumna jajca, ob presvetlitvi je bila jasno vidna meja med temnim delom (zamrt zarodek) in svetlejším zračnim mehurčkom. Jajca smo presvetljevali z ovoskopom v temnem prostoru. Ovoskop (slika 13) je enostavna ročna naprava, pri kateri se v notranjosti kovinskega ohišja nahaja žarnica, ki oddaja snop svetlobe s katerim presvetlimo jajce. Ovoskop naslonimo na topi del jajca in opazujemo oz. ocenimo stanje v jajcu.



Slika 13: Ovoskop, pripomoček za presvetljevanje jajc (foto: M. Pestotnik, 2013)

Zaradi temne (rjave) barve jajčne lupine, ki je značilna za slovenske rjave kokoši vključene v naš poskus, je bilo včasih težko določiti stanje v jajcu samo s presvetljevanjem. V takih primerih smo jajce razbili v manjšo posodo in nato določili njegovo oplojenost oziroma neoplojenost. Na podlagi teh rezultatov smo za vsako skupino izračunali delež oplojenih jajc ter valilnost glede na vložena in oplojena jajca.

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

V poskusu pridobljene podatke smo analizirali s pomočjo programskega paketa SAS/STAT (SAS System..., 2011). Deskriptivno statistično analizo smo opravili s proceduro MEANS, analizo variance s proceduro GLM. Predhodno smo s proceduro UNIVARIATE preverili, ali se spremenljivke porazdeljujejo normalno.

Za analizo podatkov o masi vloženih valilnih jajc, odstotku valilnosti, odstotku neoplojenih jajc in jajc z zamrtimi zarodki ter za analizo podatkov o masi izvaljenih piščancev smo uporabili model 1 (1). Vanj smo vključili vpliv zaporednega valjenja, genotipa matere ter vpliv skupine oz. krmne mešanice, ki je bila bodisi obogatena s folno kislino bodisi

neobogatena. Prvotno smo v model vključili tudi interakcije med posameznimi vplivi, ker pa te pri nobeni od obravnavanih lastnosti niso bile statistično značilne, smo jih kasneje iz modela 1 (1) izključili. Statistično značilne razlike ($P \leq 0,05$) med vplivi vključenimi v model 1 (1) smo ovrednotili s pomočjo Tukey-Kramerjevega testa.

$$y_{ijk} = \mu + V_i + G_j + F_k + e_{ijkl} \quad \dots(1)$$

y_{ijk} = opazovana lastnost (npr. % valilnosti, % zamrtih zarodkov, masa piščancev, itn.)

μ = srednja vrednost populacije

V_i = vpliv zaporednega valjenja ($i = 2$ valjenji)

G_j = vpliv genotipa matere (j = pozno, zgodaj operjene)

F_k = vpliv dodatka folne kisline (k = folna kislina, kontrola)

e_{ijkl} = ostanek

Za analizo podatkov o telesni masi živali ob koncu poskusa smo uporabili statistični model 2 (2), v katerega smo vključili vpliv skupine, genotipa, spola ter interakcijo med skupino in genotipom. Za primerjavo pri enaki začetni masi smo v model vključili še začetno maso živali kot linearno regresijo.

$$y_{ijkl} = \mu + F_i + G_j + S_k + FG_{ij} + b(x_{ijkl} - x) + e_{ijkl} \quad \dots(2)$$

y_{ijkl} = opazovana lastnost (telesna masa živali na koncu poskusa)

μ = srednja vrednost populacije

F_i = vpliv dodatka folne kisline (k = folna kislina, kontrola)

G_j = vpliv genotipa matere (j = pozno, zgodaj operjena)

S_k = vpliv spola (k = petelin, kokoš)

FG_{ij} = vpliv interakcije med poskusno skupino in genotipom

b = regresijski koeficient

x_{ijkl} = začetna telesna masa

x = povprečna začetna telesna masa

e_{ijkl} = ostanek

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OSNOVNI STATISTIČNI PODATKI O REZULTATIH VALJENJ

Preglednica 5 prikazuje osnovne podatke o rezultatih valjenj. Poskusne živali so se nahajale v štirih oddelkih – v dveh oddelkih so bile matere zgodaj operjene (FA-1, K-1), v dveh pa pozno operjene (FA-2, K-2). V enem od oddelkov z določenim genotipom glede operjenosti so živali zauživale krmo obogateno s folno kislino, v drugem oddelku so živali enakega genotipa dobivale neobogateno krmo. Skupno je bilo v dveh valjenjih vloženih 11005 jajc iz katerih se je izvalilo 9418 piščancev. V skupini neizvaljenih jajc je bilo 409 jajc neoplojenih, v 1178 jajcih pa je prišlo do začetka razvoja zarodka, vendar je slednji v času valjenja zamrl (preglednica 5).

Preglednica 5: Osnovni statistični podatki o rezultatih valjenj

Zaporedno valjenje	Genotip mater	Oznaka oddelka	Skupina	Število vloženih jajc v valilnike	Število izvaljenih piščancev	Število neoplojenih jajc	Število zamrtih zarodkov
Prvo	Zgodaj operjene	FA-1	Folna kislina	879	758	41	80
		K-1	Kontrola	1200	1029	39	132
	Pozno operjene	FA-2	Folna kislina	1350	1141	43	166
		K-2	Kontrola	1650	1425	56	169
Drugo	Zgodaj operjene	FA-1	Folna kislina	1188	1043	41	104
		K-1	Kontrola	1194	1039	46	109
	Pozno operjene	FA-2	Folna kislina	1500	1276	52	172
		K-2	Kontrola	2044	1707	91	246
Skupaj				11005	9418	409	1178

Preglednica 6: Osnovni statistični podatki o parametrih valjenj glede na zaporedno valjenje, genotip mater in poskusno skupino

Vplivi		Število vloženih jajc v valilnike	Število izvaljenih piščancev	Število neoplojenih jajc	Število zamrtih zarodkov
Zaporedno valjenje	Prvo	5079	4353	179	547
	Drugo	5926	5065	230	631
Genotip mater	Zgodaj operjene	4461	3869	167	425
	Pozno operjene	6544	5549	242	753
Poskusna skupina	Folna kislina	4917	4218	177	522
	Kontrolna	6088	5200	232	656

Pri drugem valjenju je bilo v valilnike vloženih 847 jajc več kot pri prvem valjenju (preglednica 6). V poskus je bilo vključenih več jajc pozno operjenih kokoši kot zgodaj operjenih kokoši. Prav tako je bilo v poskusu več kokoši, ki so zauživale kontrolno oz. neobogateno krmno mešanico v primerjavi s tistimi, ki so zauživale krmno mešanico obogateno s folno kislino. Zato je bilo število vloženih jajc kokoši, ki so zauživale kontrolno krmno mešanico večje od števila vloženih jajc kokoši, ki so imele na razpolaga krmo obogateno s folno kislino.

4.2 STATISTIČNA ZNAČILNOST VPLIVOV

V preglednici 7 so za posamezne lastnosti, torej maso jajc, maso en dan starih piščancev, valilnost ter število zamrtih zarodkov in število neoplojenih jajc predstavljeni nivoji statistične značilnosti (P-vrednosti) za vsakega od vplivov vključenih v statistični model 1. Zaporedno valjenje (starost kokoši) je značilno ($P < 0,05$) vplivalo na maso jajc in maso en dan starih piščancev. To pomeni, da je verjetnost, da je do razlike v masi jajc med prvim in drugim valjenjem prišlo zaradi naključja manjša od 5 %. Vpliv genotipa, ki predstavlja razlike med pozno in zgodaj operjenimi kokošmi, se je z izjemo odstotka neoplojenih jajc izkazal za statistično značilnega pri vseh ostalih opazovanih lastnostih (preglednica 7). Vpliv skupine, torej vpliv dodatka folne kisline v krmo se je za statistično značilnega izkazal le za lastnost mase en dan starih piščancev. Za to lastnost je P-vrednost znašala 0,02, kar pomeni, da lahko z 2 % tveganjem trdimo, da smo z dodatkom folne kisline vplivali na maso en dan starih piščancev.

Preglednica 7: Statistična (ne)značilnost vplivov vključenih v model 1

Lastnost	P-vrednosti za posamezne vplive		
	Zaporedno valjenje (prvo, drugo)	Genotip mater (zgodaj, pozno operjene)	Skupina (folna kislina, kontrola)
Masa jajc (g)	0,0026	0,0001	0,6486
Masa en dan starih piščancev (g)	0,0022	0,0001	0,0223
Valilnost-1 (%) ^a	0,7637	0,0121	0,6534
Valilnost 2 (%) ^b	0,9073	0,0019	0,8084
Neoplojena jajca (%)	0,3474	0,8931	0,5707
Zamrti zarodki (%)	0,8455	0,0020	0,8225

^aValilnost-1 = število izvaljenih piščancev glede na število vloženih jajc

^bValilnost-2 = število izvaljenih piščancev glede na število oplojenih jajc

Statistično značilno $P \leq 0,05$; Statistično neznačilno $P > 0,05$

Preglednica 8: Vpliv dodane folne kisline na rezultate valjenj

Lastnost	Skupina	LSM	SE	P-vrednost
Masa jajc (g)	Folna kislina	61,32	0,11	0,6486
	Kontrolna	61,25	0,09	
Masa en dan starih piščancev (g)	Folna kislina	40,62	0,13	0,0223
	Kontrolna	40,19	0,12	
Valilnost-1 (%) ^a	Folna kislina	85,96	0,56	0,6534
	Kontrolna	85,62	0,51	
Valilnost 2 (%) ^b	Folna kislina	89,16	0,48	0,8084
	Kontrolna	89,00	0,44	
Neoplojena jajca (%)	Folna kislina	3,58	0,29	0,5707
	Kontrolna	3,80	0,26	
Zamrti zarodki (%)	Folna kislina	10,44	0,46	0,8225
	Kontrolna	10,58	0,41	

^aValilnost-1 = število izvaljenih piščancev glede na število vloženih jajc

^bValilnost-2 = število izvaljenih piščancev glede na število oplojenih jajc

LSM = ocenjena srednja vrednost izračunana po metodi najmanjših kvadratov; SE = standardna napaka ocene; Statistično značilno $P \leq 0,05$; Statistično neznačilno $P > 0,05$

V preglednici 8 so prikazani glavni rezultati našega poskusa, v njej so podatki, ki kažejo na katere izmed proučevanih lastnosti je dodatek folne kisline v krmo kokoši nesnic vplival in v kakšni smeri. Dodatek folne kisline v krmi se je odrazil le v povečani telesni masi en dan starih piščancev, le v tem primeru je bila značilna razlika v masi en dan starih piščancev. Na maso jajc, valilnost ter odstotek zamrtih zarodkov in neoplojenih jajc dodatek folne kisline v krmi ni vplival.

Na maso jajc v našem primeru dodatek folne kisline v krmo kokoši nesnic ni vplival, saj je masa jajc ostala nespremenjena v primerjavi s kontrolno skupino, ki je zauživala krmo brez dodatka folne kisline (preglednica 8). Do podobnih rezultatov so v svojih raziskavah prišli tudi Hebert in sod. (2005), Tactacan in sod. (2012) ter Khalifah in Shahein (2006), saj

nobeden izmed njih ni dokazal, da bi dodatek folne kisline v krmo kokoši nesnic spremenil maso jajca. Krishnan Rajalekshmy (2010) navaja nasprotne rezultate, v njegovem poskusu je dodatek folne kisline v krmo kokoši nesnic vplival na maso jajc. Izkazalo se je, da so bila jajca kokoši, ki so zauživale krmo brez dodane folne kisline težja kot jajca kokoši, ki so zauživale krmo obogateno s folno kislino (2 mg folne kisline/kg krme in 4 mg folne kisline/kg krme).

Povprečna telesna masa dan starih piščancev v kontrolni skupini je znašala 40,19 gramov, povprečna telesna masa piščancev v skupini z dodatkom folne kisline v krmo kokoši pa 40,62 gramov (preglednica 8). Razlika med povprečnima masama je bila 0,43 gramov (približno 1 % povprečne telesne mase piščanca), kar je razmeroma majhna razlika. Kljub temu je bila ta razlika statistično značilna, zato lahko trdimo, da je imel dodatek folne kisline šibek, vendar pozitiven vpliv na telesno maso izvaljenih piščancev. Znano je, da med maso jajca in maso izvaljenega piščanca obstaja pozitivna korelacija, ki se spreminja z razvojno stopnjo zarodka. V prvi polovici valjenja ni značilna, vrh doseže ob izvalitvi. Masa dan starega piščanca je v največji meri odvisna od mase (62-78 %) jajca, v manjši meri pa tudi od izgube mase v času valjenja, mase jajčne lupine, genotipa živali, trajanja in pogojev med valjenjem, spola piščanca in starosti matične jate (Shanaway, 1987, cit. po Schmidt in sod., 2009; Yannakopoulos in Tserveni-Gousi, 1987, cit. po Schmidt in sod., 2009; Wilson in Harms, 1988, cit. po Schmidt in sod., 2009). V našem poskusu nismo ugotovili značilnih razlik v masi jajc med kontrolno skupino in skupino z dodatkom folne kisline, kljub temu so bili piščanci, ki so se valili iz jajc kokoši v skupini z dodatkom folne kisline težji. Eden izmed razlogov za to bi lahko bil spremenjen režim oddajanja oz. izgube vode skozi pore v jajčni lupini med procesom valjenja. Možno je, da so jajca kokoši iz kontrolne skupine med valjenjem izgubila večjo količino vode kot jajca kokoši iz skupine z dodatkom folne kisline. Ker jajc med postopkom valjenja nismo individualno tehtali, da bi s tem spremljali izgubo vode skozi pore v lupini, tega ne moremo zagotovo trditi. Drugi možen razlog bi lahko bil, da je bil delež lupine v masi jajca kokoši, ki so dobivale folno kislino manjši od deleža lupine v masi jajca pri kokoših, ki so bile krmljene z neobogateno krmo. Tega parametra v naši raziskavi nismo spremljali, v objavljenih virih tudi nismo našli podatka, da bi dodatek folne kisline kakorkoli vplival na parametre kakovosti lupine. Rezultati naše raziskave so primerljivi s podatki raziskave, ki jo je opravil Robel (1993), v

kateri je dokazal, da so se pure z večjo telesno maso izvalile iz jajc pur, katerim je v krmo dodal folno kislino v koncentraciji 5,51 mg folne kisline/kg krme.

Dodatek folne kisline v krmo kokoši nesnic v našem poskusu ni vplival na oplojenost jajc ter valilnost piščancev. Vse razlike med poskusno in kontrolno skupino so namreč statistično neznačilne (preglednica 8). Podobne rezultate je Robel (1993) dobil, ko je preizkušal vpliv dodane folne kisline na valilnost pri purah. Na podlagi podatkov poskusa lahko sklepamo, da je osnovna krma za kokoši nesnice z oznako NSK-1 vsebovala dovolj folne kisline za normalen razvoj piščanca. Tudi pri primerjavi števila neoplojenih jajc ter jajc z zamrtimi zarodki med posameznima skupinama ni bilo značilnih razlik.

Preglednica 9: Vpliv genotipa mater na rezultate valjenj

Lastnost	Genotip matere	LSM	SE	P-vrednost
Masa jajc (g)	Pozno operjene	61,73	0,09	0,0001
	Zgodaj operjene	60,84	0,11	
Masa en dan starih piščancev (g)	Pozno operjene	40,92	0,11	0,0001
	Zgodaj operjene	39,89	0,14	
Valilnost-1 (%) ^a	Pozno operjene	84,80	0,49	0,0121
	Zgodaj operjene	86,78	0,59	
Valilnost 2 (%) ^b	Pozno operjene	88,02	0,42	0,0019
	Zgodaj operjene	90,14	0,50	
Neoplojena jajca (%)	Pozno operjene	3,67	0,25	0,8931
	Zgodaj operjene	3,72	0,30	
Zamrti zarodki (%)	Pozno operjene	11,52	0,40	0,0020
	Zgodaj operjene	9,51	0,48	

^aValilnost-1 = število izvaljenih piščancev glede na število vloženih jajc

^bValilnost-2 = število izvaljenih piščancev glede na število oplojenih jajc

LSM = ocenjena srednja vrednost izračunana po metodi najmanjših kvadratov; SE = standardna napaka ocene; Statistično značilno $P \leq 0,05$; Statistično neznačilno $P > 0,05$

Genotip kokoši nesnic je imel značilen vpliv ($P < 0,05$) na vse proučevane lastnosti z izjemo odstotka neoplojenih jajc (preglednica 9). Statistično značilne razlike med skupinama zgodaj oziroma pozno operjenih kokoši so obstajale za lastnosti mase jajc, mase en dan starih piščancev, valilnosti ter odstotka jajc z zamrtimi zarodki. Pozno operjene kokoši so nesle težja jajca iz katerih so se valili težji piščanci v primerjavi z jajci zgodaj operjenih kokoši. Nasprotno so se iz jajc zgodaj operjenih kokoši piščanci značilno bolje valili kot iz jajc pozno operjenih kokoši, predvsem na račun velikega odstotka zamrtih zarodkov v jajcih pozno operjenih kokoši (preglednica 9).

Preglednica 10: Vpliv zaporednega valjenja na rezultate valjenj

Lastnost	Zaporedno valjenje	LSM	SE	P-vrednost
Masa jajc (g)	Prvo	61,06	0,10	0,0026
	Drugo	61,52	0,10	
Masa en dan starih piščancev (g)	Prvo	40,69	0,13	0,0022
	Drugo	40,12	0,12	
Valilnost-1 (%) ^a	Prvo	85,90	0,56	0,7637
	Drugo	85,68	0,51	
Valilnost 2 (%) ^b	Prvo	89,04	0,48	0,9073
	Drugo	89,12	0,44	
Neoplojena jajca (%)	Prvo	3,51	0,28	0,3474
	Drugo	3,88	0,26	
Zamrti zarodki (%)	Prvo	10,57	0,45	0,8455
	Drugo	10,45	0,42	

^aValilnost-1 = število izvaljenih piščancev glede na število vloženih jajc

^bValilnost-2 = število izvaljenih piščancev glede na število oplojenih jajc

Statistično značilno $P \leq 0,05$; Statistično neznačilno $P > 0,05$

LSM = ocenjena srednja vrednost izračunana po metodi najmanjših kvadratov; SE = standardna napaka ocene

Znano je, da na maso znesenih jajc vpliva starost kokoši. Kokoši na začetku nesnosti nesejo lažja jajca, proti nesnosti se masa jajc povečuje (Zorko-Braun, 1979).

Iz preglednice 10 je razvidno, da je imela starost kokoši (zaporedno valjenje) značilen vpliv na maso znesenih jajc in na maso en dan starih piščancev. Zato ni presenetljivo, da so bila jajca ob drugem vlaganju v valilnike težja od jajc, ki smo jih vlagali prvič, saj so ob drugem vlaganju sicer izhajala od istih kokoši kot ob prvem vlaganju, so pa bile kokoši ob drugem vlaganju starejše. Glede na visoko korelacijo med maso jajca in maso piščanca bi pričakovali, da se bodo ob drugem valjenju valili težji piščanci kot ob prvem valjenju. Vendar v našem poskusu temu ni bilo tako (preglednica 10). Poleg korelacije med maso jajca in maso piščanca je treba namreč upoštevati tudi dejstvo, da starejše kokoši nesejo jajca s tanjšo lupino, skozi katero med valjenjem iz jajca izhlapi več vode. Količina kalcija, ki ga kokoš lahko naloži v jajčno lupino je genetsko pogojena lastnost. S starostjo kokoši se namreč zmanjšuje sposobnost kokoši za mobilizacijo kalcija iz kosti in zato ne more več zagotavljati zadostnih količin kalcijevega karbonata (Lokesh, 2008). S staranjem kokoši se masa znesenih jajc povečuje, medtem ko ostaja masa jajčne lupine nespremenjena. Povečanje v masi lupine ter povečanje v masi jajca si ne sledita proporcionalno zato se razmerje med maso lupine in maso jajca s staranjem kokoši zmanjšuje (Ahmadi in Rahimi, 2011). Padec valilnosti pri valjenju jajc iz starejših jat je dokaj znan rezultat. Pripisati ga je mogoče slabši plodnosti petelinov in kokoši, še pomembnejši dejavnik pa je poslabšanje kakovosti jajčne lupine z naraščanjem mase jajca (Cavero in sod., 2011). V naši raziskavi je bila starostna razlika kokoši med prvim in drugim valjenjem le tri tedne in ta razlika ni povzročila, da bi zaporedno valjenje (starost kokoši) značilno vplivalo na delež valilnosti.

4.3 PORABA KRME IN NESNOST

V dveh poskusnih skupinah – oddelkih (eni z dodatkom folne kisline in eni kontrolni) smo spremljali porabo krme. Porabe krme nismo spremljali individualno po posamezni živali, temveč skupinsko na oddelek in nato izračunali povprečno porabo krme na žival na dan. V poskusni skupini FA-2 je povprečna količina zaužite krme na dan znašala 136,16 g/žival, v kontrolni skupini K-2 pa 150,11 g/žival na dan. V vseh poskusnih skupinah smo vsakodnevno beležili število znesenih jajc in ob koncu poskusa izračunali nesnost na

dejansko število kokoši za obdobje treh tednov trajanja poskusa. Nesnost kokoši v skupinah, ki sta dobivali krmo z dodatkom folne kisline je znašala 88,98 % in je bila značilno ($P < 0,05$) manjša od nesnosti kokoši v skupinah, ki sta dobivali le osnovno krmo brez dodatka folne kisline (90,84 %). Opravljenih je bilo kar nekaj raziskav v katerih so znanstveniki proučevali vpliv obogatitve krme s folno kislino na proizvodne rezultate pri nesnicah in rezultati teh raziskav ne ponujajo enoznačnih ugotovitev. Tactacan in sod. (2012) niso ugotovili značilnih razlik v nesnosti, izraženi na dejansko število kokoši ter v porabi krme med skupinami kokoši, ki so dobivale 0, 10 ali 100 mg folne kisline/kg krme. Tudi Khalifah in Shahein (2006), Hebert in sod. (2011), Benkova in sod. (2009) ter House in sod. (2002) z dodajanjem folne kisline v krmo niso mogli izboljšati nesnosti. Nasprotno je Krishnan Rajalekshmy (2010) značilno boljšo nesnost zabeležil v skupinah kokoši, ki so dobivale krmo obogateno z 2 oziroma 4 ppm folne kisline v primerjavi s kokošmi, ki so dobivale krmo povsem brez dodane folne kisline. House in sod. (2002) poročajo o značilno večji dnevni porabi krme na žival v kolikor je bila kokošim ponujena krma z dodatkom 32 mg folne kisline na kg krme v primerjavi s porabo krme pri kokoših, ki so imele na voljo krmo z manjšo koncentracijo folne kisline (4 mg/kg; 8 mg/kg; 16 mg/kg). Ni pa bila razlika v dnevnem zauživanju krme značilna, ko so House in sod. (2002) primerjali skupino kokoši z dodatkom 32 mg folne kisline na kg krme in skupino, ki je prejela krmo brez vsakršnega dodatka folne kisline. Znano je, da na potrebe po folni kislini vpliva veliko dejavnikov: provenienca in starost kokoši, faza nesnosti, osnovna krma, oblika dodane folne kisline, okoljski dejavniki (temperatura, osvetlitev), itn. (Krishnan Rajalekshmy, 2010). Prav zato je zaradi različnih uporabljenih materialov in metod težko medsebojno primerjati rezultate različnih poskusov. Eden od razlogov za zmanjšano zauživanje krme in posledično slabšo nesnost v skupini z dodatkom folne kisline bi lahko bile slabše organoleptične lastnosti te krme v primerjavi z osnovno. Zauživanje krme je namreč v veliki meri odvisno od njenega zaznavanja, ki je pri kokoših precej drugačno kot pri drugih domačih živalih. Okus in vonj igra pri tem majhno vlogo, pomembna sta predvsem vid in otip (Holcman in sod., 2014). V določenih okoliščinah pa sta pomembna tudi okus in vonj.

4.4 TELESNE MASE ŽIVALI V POSKUSU

V preglednici 11 so podatki o telesnih masah kokoši in petelinov vključenih v poskus. Živali smo vzorčno stehali na začetku ter na koncu poskusnega obdobja.

Preglednica 11: Opisna statistika za telesne mase živali v poskusu

Tehtanje kokoši	Starost kokoši	Skupina	Spol	Število stehanih živali	Povprečna telesna masa (g)	Standardni odklon	Koeficient variabilnosti
Na začetku poskusa	36 tednov	Folna	Kokoši	101	2042,33	192,46	9,42
		kislina	Petelini	28	3114,11	292,16	9,38
		Kontrola	Kokoši	100	2109,37	251,43	11,91
			Petelini	25	3198,80	197,91	6,18
Na koncu poskusa	39 tednov	Folna	Kokoši	101	2051,78	170,18	8,29
		kislina	Petelini	18	3019,44	253,15	8,38
		Kontrola	Kokoši	101	2107,92	157,90	7,49
			Petelini	18	3022,78	211,65	7,00

V preglednici 12 je prikazana statistična (ne)značilnost vplivov vključenih v model 2. Da bi izničili vpliv telesne mase živali na začetku poskusa na telesno maso živali ob koncu poskusa smo v statistični model vključili tudi vpliv začetne telesne mase.

Preglednica 12: Statistična (ne)značilnost posameznih vplivov vključenih v model 2

Lastnost	Poskusna skupina	Genotip matere	Spol	Poskusna skupina×genotip matere	Začetna telesna masa
Telesna masa živali na koncu poskusa	0,0154	0,8008	0,0001	0,0002	0,1112

Statistično značilno $P \leq 0,05$; Statistično neznačilno $P > 0,05$

Prikazane P-vrednosti v preglednici 12 kažejo, da so na telesno maso živali ob koncu poskusa značilno vplivali poskusna skupina (folna kislina, kontrola), spol živali ter vzajemno delovanje (interakcija) med poskusno skupino in genotipom matere. Značilen vpliv spola (petelini težji od kokoši) je bil pričakovan, značilna interakcija pa pomeni, da je bil vpliv enega dejavnika (poskusna skupina, genotip matere) na telesno maso živali na koncu poskusa drugačen, pri različnih ravneh drugega. Za nas je najbolj zanimiv podatek, da je dodatek folne kisline v krmo značilno ($P < 0,05$) vplival na telesno maso živali ob koncu poskusnega obdobja. Kokoši in petelini so v skupini, ki je dobivala dodatek folne kisline v krmi bili ob koncu poskusa značilno lažji od kokoši in petelinov v kontrolni skupini, kar je mogoče povezati tudi z zauživanjem krme, ki je bilo pri živalih v kontrolni skupini večje (preglednica 13).

Preglednica 13: Ocenjeni srednji vrednosti s standardno napako za lastnost telesne mase

Lastnost	Skupina	LSM	SE	P-vrednost
Telesna masa živali na koncu poskusa (g)	Folna kislina	2554,50	26,75	0,0154
	Kontrolna	2609,92	29,31	

Statistično značilno $P \leq 0,05$; Statistično neznačilno $P > 0,05$

LSM = ocenjena srednja vrednost izračunana po metodi najmanjših kvadratov; SE = standardna napaka ocene

4.5 POGIN ŽIVALI

Preglednica 14 prikazuje številčno stanje živali na farmi na začetku ter na koncu poskusnega obdobja.

Preglednica 14: Pogin živali v času poskusa

Oddelek	Genotip mater	Skupina	Spol	Število živali na začetku poskusa	Število živali na koncu poskusa	% poginulih živali
1	Pozno operjene	Folna kislina	Kokoši	284	284	0,0
			Petelini	33	33	0,0
2		Kontrolna	Kokoši	323	322	0,3
			Petelini	38	38	0,0
6	Zgodaj operjene	Folna kislina	Kokoši	149	149	0,0
			Petelini	17	17	0,0
7		Kontrolna	Kokoši	150	150	0,0
			Petelini	17	17	0,0

V poskusnem obdobju treh tednov je poginila le ena kokoš in sicer v oddelku pozno operjenih kokoši, ki so zauživale kontrolno krmno mešanico. Pogin v tem oddelku je bil 0,3 odstoten. Obogatitev krme s folno kislino torej ni vplivala na odstotek poginulih živali.

5 SKLEPI

Na podlagi rezultatov raziskave, v kateri smo proučevali vpliv obogatitve osnovne krmne mešanice za nesnice s folno kislino na parametre valjenja in nekatere proizvodne lastnosti v matični jati komercialnih nesnic prelux-G, lahko podamo naslednje ugotovitve:

- a) Vključitev dodatka folne kisline v količini 50 mg/kg krme v krmo za kokoši nesnice je prispevala k značilno ($P < 0,05$) večji masi piščancev ob izvalitvi.
- b) Valilnost piščancev, računana tako na vloženo kot tudi na oplojeno število jajc se ob dodatku folne kisline v krmo ni značilno spremenila. To pomeni, da izračunana koncentracija folne kisline v osnovni krmi (0,85 mg/kg krme) ni predstavljala omejitvenega dejavnika za doseganje dobre oplojenosti jajc in posledično dobre valilnosti.
- c) Dnevno zauživanje krme po kokoši je bilo manjše pri kokoših, ki so dobivale krmo z dodatkom folne kisline in večje pri kokoših, ki so dobivale le osnovno krmo.
- d) Prireja jajc, računana na dejansko število kokoši kot tudi dosežena telesna masa ob koncu poskusnega obdobja sta bili značilno ($P < 0,05$) manjši v skupini kokoši, ki je v krmi dobivala dodatek folne kisline v primerjavi s skupino, ki je dobivala le osnovno krmo brez dodane folne kisline.
- e) V prihodnjih raziskavah bi veljalo testirati vplive večjega razpona različnih koncentracij dodane folne kisline v krmo na parametre valjenj in proizvodne parametre. Obenem bi bilo potrebno ugotoviti povezavo med količino folne kisline v krmi in njeno količino v jajcu oziroma proučiti dejavnike, ki vplivajo na učinkovitost prenosa folne kisline iz krme v jajce. Le na ta način bi lahko ugotovili, pri kateri koncentraciji folne kisline in v kakšnih razmerah je njen pozitiven učinek na maso piščancev največji in negativni učinek na proizvodne lastnosti (npr. nesnost) najmanjši. Za zagotovitev čim bolj natančnih podatkov o količini folne kisline v osnovni krmi, bi morali slednjo kemijsko analizirati na vsebnost folne kisline.

6 POVZETEK

Folna kislina (vitamin B₉) ima v organizmu pomembno vlogo, saj sodeluje v procesih sinteze ter metilacije DNK. Oskrbljenost organizma s folno kislino zato močno vpliva na sposobnost njegove reprodukcije, saj je vpliv folne kisline izražen predvsem v tkivih z visoko stopnjo celične delitve in rasti. Zaradi pomanjkanja folne kisline v zgodnjem razvoju otrok se pojavljajo nevrološke okvare možganov ali hrbtenjače. Pri odraslih osebah pomanjkanje folne kisline povzroča neustrezno sintezo DNK v eritrocitih, kar posledično vodi v megaloblastno anemijo. Prav tako pomanjkanje folne kisline povzroči poškodbe dednega materiala ter mutacije, ki lahko vodijo do rakavih obolenj. Predvsem v času nosečnosti se torej potrebe organizma po folni kislini povečajo. Povečan vnos folne kisline s prehrano ali s prehranskimi dodatki poveča razpoložljivo količino folne kisline v organizmu. To je bil razlog, da so v Združenih državah Amerike uvedli obvezno obogatitev žit s folno kislino. Posledice tega ukrepa so se pokazale v zmanjšanem številu otrok, pri katerih so se pojavile okvare nevrnalne cevi.

Z dodajanjem folne kisline v prehrano se torej izboljša oskrbljenost organizma s folno kislino. Več kot je folatov v krvnem serumu organizma, več ga lahko organizem izkoristi za svoje delovanje. S tem, ko so živalim dodajali folno kislino v krmo so želeli izboljšati njihove predvsem reproduktivne lastnosti, ker naj bi folna kislina vplivala na razvoj zarodka. Pri prašičih so z dodatkom folne kisline v krmo povečali velikost gnezda ob prasiatvi. Pri ovcah z dodatkom folne kisline niso izboljšali njihovih reprodukcijskih lastnosti. Pri perutnini je bilo opravljenih več raziskav, ki so privedle do različnih, včasih tudi nasprotujočih si rezultatov. Z dodajanjem folne kisline v krmo kokoši nesnic se poveča vsebnost folne kisline v jajcih in to naj bi bil razlog za izboljšanje reprodukcijskih lastnosti.

V našem poskusu smo eni skupini kokoši krmili samo osnovno krmno mešanico brez dodane folne kisline, drugi pa osnovno krmno mešanico, kateri smo dodali 50 mg folne kisline/kg krme. Jajca smo zbirali ločeno po oddelkih in jih ločeno tudi vlagali v valilnike. Pred valjenjem smo jajca stehali, prav tako smo stehali izvaljene piščance. Beležili smo tako število znesenih jajc posamezne skupine kot tudi število izvaljenih piščancev.

Spremljali smo porabo krme in ugotovili, da je bila v skupini, ki je zauživala krmo z dodatkom folne kisline manjša poraba krme na žival kot tudi značilno ($P < 0,05$) manjša nesnost kokoši. Podatke smo statistično analizirali in prišli do ugotovitve, da je dodatek folne kisline v krmo kokoši nesnic značilno ($P < 0,05$) vplival na večjo maso izvaljenih piščancev. Na maso jajc, valilnost, odstotek oplojenih jajc ter odstotek jajc z zamrtimi zarodki dodatek folne kisline v krmi ni vplival. Na podlagi rezultatov raziskave lahko sklepamo, da je mogoče dobro valilnost doseči že ob koncentraciji folne kisline 0,85 mg/kg krme, medtem ko je z višjo koncentracijo mogoče povečati maso piščancev ob izvalitvi.

7 VIRI

- Ahmadi F., Rahimi F. 2011. Factors affecting quality and quantity of egg production in laying hens: A Review. *World Applied Sciences Journal*, 12, 3: 372-384
- Benkova, J., Baumgartner, J., Molnar, F., Peškovičova, D. 2009. Effect of folic acid addition into feed mixture of laying hens on its content in eggs. *Slovak Journal of Animal Science*, 42, 3: 124-128
- Cavero D., Schmutz M., Icken W., Preisinger R. 2011. Improving hatchability in white egg layer strains through breeding. *Lohmann Information*, 46, 1: 44-54
- Dickson T. M., Tactacan G. B., Hebert K., Guenter W., House J. D. 2010. Optimization of folate deposition in eggs through dietary supplementation of folic acid over the entire production cycle of Hy-Line W36, Hy-Line W98, and CV20 laying hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 19: 80-91
- Ebbing M., Bønaa K. H., Nygard O., Amesén E., Ueland P. M., Nordrehaug J. E., Rasmussen K., Njølstad I., Refsum H., Nilsen, D. W., Tverdal A., Meyer K., Vollset S. E. 2009. Cancer incidence and mortality after treatment with folic acid and vitamin B12. *The Journal of American Medical Association*, 302, 19: 2119-2126
- Ernst R.A., Bradley F.A., Abbott U.K., Craig R.M. 2004. Egg candling and breakout analysis. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 8134, 9 str.
<http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8134.pdf> (8. januar 2015)
- Greenberg J. A., Bell S. J., Guan Y., Yu Y. 2011. Folic Acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*, 4, 2: 52-59

Harper A. F., Lindemann M. D., Chiba L. I., Combs G. E., Handline D. L., Kornegay E. T., Southern L. L. 1994. An assessment of dietary folic acid levels during gestation and lactation on reproductive and lactational performance of sows: a cooperative study. *Journal of Animal Science*, 72: 2338-2344

Hebert K., House J. D., Guenter W. 2005. Effect of dietary folic acid supplementation on egg folate content and the performance and folate status of two strains of laying hens. *Poultry Science*, 84: 1533-1538

Hebert K., Tactacan G. B., Dickson T. M., Guenter W., House J. D. 2011. The effect of cereal type and exogenous enzyme use on total folate content of eggs from laying hens consuming diets supplemented with folic acid. *Journal of Applied Poultry Research*, 20: 303-312

Honein M. A., Paulozzi L. J., Mathews T. J., Erickson J. D., Wong L. C. 2001. Impact of folic acid fortification of the USA food supply on the occurrence of neural tube defects. *Journal of American Medical Association*, 285, 23: 2981-2986

Holcman A., Salobir J., Zorman Rojs O., Kavčič S. 2014. Reja kokoši in piščancev. Ljubljana, Založba Kmečki glas: 152 str.

House J.D., Braun K., Ballance D. M., O'Connor C. P., Guenter W. 2002. The enrichment of eggs with folic acid through supplementation of the laying hen diet. *Poultry Science*, 81: 1332-1337

Khalifah, M. M., Shahein, E. H. A. 2006. Effect of dietary folic acid supplementation on production and hatching performance in baheij chicken strain. *Egyptian Poultry Science Journal*, 26, 3: 843-855

Koyama H., Ikeda S., Sugimoto M., Kume S. 2012. Effects of folic acid on the development and oxidative stress of mouse embryos exposed to heat stress. *Reproduction in Domestic Animals*, 47: 921-927

Krajčovičová-Kudláčková M., Vaiachovicová M., Blazíček P. 2013. Seasonal folate serum concentrations at different nutrition. *Central European Journal of Public Health*, 21, 1: 36-38

Krishnan Rajalekshmy P. 2010. Effects of dietary choline, folic acid and vitamin B12 on laying hen performance, egg components and egg phospholipid composition. A dissertation. Lincoln, University of Nebraska: 116 str.
<http://digitalcommons.unl.edu/animalscidiss/21> (17. januar 2015)

Lokesh G. 2008. Maintaining egg shell quality. The Poultry Site.
<http://www.thepoultrysite.com/articles/979/maintaining-egg-shell-quality> (17. jan. 2015)

Manshadi S. D., Ishiguro L., Sohn K., Medline A., Renlund R. 2014. Folic acid supplementation promotes mammary tumor progression in a rat model. *Plos One*, 9, 1:e84635, doi:10.1371/journal.pone.0084635: 10 str. (10. jan. 2015)

Matte J. J., Guay F., Girard L. 2006. Folic acid and vitamin B12 in reproducing sows: New concepts. *Canadian Journal of Animal Science*, 86: 197-205

Méthot H., Girard C. L., Matte J. J., Castonguay F. W. 2008. Effects of dietary supplements of folic acid on reproductive performance in ewes. *Canadian Journal of Animal Science*, 88: 489-497

Munyaka P. M., Tactacan G., Jing M., Karmin O., House J. D., St. Paul M., Sharif S., Rodriguez-Lecompte J. C. 2013. Response of older laying hens to an *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge when fed diets with or without supplemental folic acid. *Poultry Science*, 92: 105-113

NRC (National Research Council), 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th ed. Washington, National Academy of Science: 176 str.

Pitkin R. M. 2007. Folate and neural tube defects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85: 285S- 288S

Ricks D. J., Rees C. A., Osborn K. A., Crookston B. T., Leaver K., Merrill S. B., Velásquez C., Ricks J. H. 2012. Peru's national folic acid fortification program and its effect on neural tube defects in Lima. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 32, 6: 391-398

Robel E. J. 1993. Evaluation of egg injection of folic acid and effect of supplemental folic acid on hatchability and poult weight. *Poultry Science*, 72: 546-553

SAS System for Windows, Release 9.3. 2011. Cary, SAS Institute

Schmidt G.S., Figueiredo E.A.P., Saatkamp M.G., Boom E.R. 2009. Effect of storage period and egg weight on embryo development and incubation results. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 11, 1: 1-5

Smith A. D., Kim Y., Refsum H. 2008. Is folic acid good for everyone? *The American Journal of Medical Nutrition*, 87: 517-533

Stover P. J. 2004. Physiology of Folate and Vitamin B12 in Health and Disease. *Nutrition Reviews*, 62, 6: S3–S12

Suitor C. W., Bailey L. B. 2000. Dietary folate equivalents: Interpretation and application. *Journal of the American Dietetic Association*, 100, 1: 88-94

Tactacan G. B., Rodriguez-Lecompte J. C., O K., House J. D. 2012. The adaptive transport of folic acid in the intestine of laying hens with increased supplementation of dietary folic acid. *Poultry Science*, 91: 121-129

Taylor L. W. 1947. The effect of folic acid on egg production and hatchability. *Poultry Science*, 26, 4: 372-376

Vitamin B9 (Folic acid). 2011. University of Maryland medical center.
<https://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/vitamin-b9-folic-acid> (27.mar. 2014)

Vollset S. E., Clarke R., Lewington S., Ebbing M., Hasley J., Lonn E., Armitage J., Manson J. E., Hankey G. J. 2013. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50 000 individuals. *The Lancet*, 381: 1029-1036

Wilson H. R. 1997. Effects of maternal nutrition on hatchability. *Poultry Science*, 76: 134-143

Zorko-Braun N. 1979. Perutninarstvo. Skripta. Maribor, Univerza v Mariboru, Višja agronomska šola: 150 str.

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila mentorju doc. dr. Dušanu Terčiču za vso pomoč in strokovne nasvete pri sami izvedbi poskusa. Zahvaljujem se tudi za spodbudne besede ter pomoč pri pisanju in urejanju magistrskega dela.

Zahvaljujem se recenzentki doc. dr. Vidi Rezar za hiter in strokoven pregled magistrskega dela ter predlagane popravke.

Zahvaljujem se predsednici komisije prof. dr. Antoniji Holcman za spodbudne besede, hiter pregled magistrskega dela ter koristne nasvete.

Zahvalila bi se gospe Jerneji Bogataj za nasvete pri navajanju virov in oblikovanju naloge.

Največja zahvala je namenjena mojim domačim. Zahvaljujem se jim za vso pomoč, potrpežljivost, razumevanje ter spodbudne besede v času mojega študija.