

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**  
**Katedra za ishranu i botaniku**

**Milica A. Glišić**

Doktor veterinarske medicine

**Uticaj upotrebe izoflavona u ishrani na  
proizvodne rezultate i biološke parametre  
brojlara**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2020**



**UNIVERSITY OF BELGRADE**  
**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**  
**Department of Nutrition and Botany**

**Milica A. Glišić**

Doctor of veterinary medicine

**Effect of isoflavones in the diet on  
performances and biological parameters of  
broilers**

**PhD Theses**

**Belgrade, 2020**



**MENTOR:**

**Dr Radmila Marković, redovni profesor**

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Katedra za ishranu i botaniku

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**Dr Dragan Šefer, redovni profesor**

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Katedra za ishranu i botaniku

**Dr Anita Radovanović, redovni profesor**

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Katedra za histologiju i embriologiju

**Dr Jelena Janjić, viši naučni saradnik**

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla

**Dr Lidija Perić, redovni profesor**

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet

Departman za stočarstvo

**Datum odbrane doktorske disertacije**

.....



*Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije deo su istraživanja u okviru projekta „Odabrane biološke opasnosti za bezbednost/kvalitet hrane animalnog porekla i kontrolne mere od farme do potrošača“ (Ev. br. TR 31034), koje je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u periodu od 2011. do 2019. godine.*

*Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj baki, Miroslavi Glišić.*





## **Zahvalnica**

*Hvala mom mentoru, prof. dr Radmili Marković, na svesrdnoj pomoći tokom svake faze izrade ove doktorske disertacije, počevši od odabira teme, pa zatim i tokom celog procesa koji je usledio. Hvala Vam što ste moj istraživački rad usmeravali u oblasti ishrane životinja koji je rezultirao nizom zajedničkih tekstova na koje sam jako ponosna.*

*Prof. dr Draganu Šeferu hvala na svim sugestijama i korisnim savetima koji su značajno uobličili ovu doktorsku disertaciju.*

*Prof. dr Aniti Radovanović hvala na pomoći u izvođenju i tumačenju histoloških analiza.*

*Višem nučnom saradniku, dr Jeleni Janjić, hvala na posvećenosti, svoj pruženoj pomoći i aktivnom učešću tokom izvođenja eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije.*

*Prof. dr Lidiji Perić hvala na svim sugestijama i korekcijama koje su nam bile od izuzetne pomoći, naročito na samom početku dizajniranja eksperimenta.*

*Hvala prof. dr Milanu Ž. Baltiću, na tome što je prepoznao moj potencijal, što je verovao u mene i bio uz mene od prvog dana postavljanja eksperimenta, do poslednje napisane reči ove doktorske disertacije. Hvala Vam profesore što ste me usmeravali, učili, podržavali, što ste mi pokazali da ne postoji cilj koji ne mogu da ostvarim. Zahvaljujući Vama sam postala istraživač i čovek kakav jesam.*

*Ovom prilikom želim da se zahvalim mojim dragim kolegama dr Jeleni Ćirić, dr Mariji Glišić, dr Jasni Đorđević, dr Nataši Glamočliji i dr Branislavu Baltiću, koji su mi pomagali neizmerno u poslednjim fazama eksperimenta, prikupljanju uzoraka i izvođenju laboratorijskih analiza, koji su bili uz mene i imali razumevanja za mene tokom celog ovog višegodišnjeg procesa.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Mariji Bošković, za svu pomoć u pisanju, predstavljanju i obradi rezultata i tumačenjima. Ti znaš da si mi mnogo više od koleginice, mnogo više od prijatelja, rečima ne mogu da iskažem koliko mi puno značiš...*

*Zahvaljujem se dr Dragoljubu Jovanoviću i Suzani Đorđević na pomoći u izvođenju hemijskih analiza. Sandri Milošević hvala na pomoći u prikupljanju rezultata histomorfometrijskih ispitivanja. Dr Aleksandru Drljačiću i dr Đuri Vukmiroviću hvala na savetima i nesebičnoj pomoći pri formulisanju, optimizovanju i pripremi smeša za ishranu brojlera. Direktor Instituta za higijenu i tehnologiju mesa, naučnom savetniku, dr Vesni Đorđević, zahvaljujem se na kolegijalnosti, profesionalnosti, bezuslovnoj pomoći i podršci tokom svih ovih godina.*

*Zahvaljujem se kolektivima Katedre za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Katedre za ishranu i botaniku i Katedre za histologiju sa embriologijom Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu na izuzetno kolegijalnoj saradnji.*

*Hvala Igoru i Ivanu Stanojloviću i farmi Robins doo iz Glibovca, kao i Aleksandri Arsenijević i fabrici stočne hrane Moravac CMANA doo u Krnjevu za svu pomoć u izvođenju eksperimenta i pripremi hrane za brojlere.*

*Hvala našem velikom kućnom prijatelju, Bojani Stojković, na neizmernoj pomoći u prikupljanju uzoraka i rezultata u poslednjim fazama ogleđa.*

*Hvala mom Vladimiru Draškoviću, na svim godinama druženja, na rečima podrške kada je bilo najteže. Hvala ti na prijateljstvu.*

*Svim mojim prijateljima i meni dragim ljudima veliko hvala na tome što su verovali u mene, uvek bili tu za mene, svojom pozitivnošću, vedrinom i ljubavlju me motivisali da uvek idem napred.*

*Hvala porodici Vukadinović, Marici, Filipu i Davidu, koji su me prihvatili kao svoju i bili uz mene onda kada mi je to bilo najpotrebnije.*

*Najveću zahvalnost želim da iskažem svojoj porodici, baki, ocu, majci, sestri Mariji i bratu Milošu za bezgraničnu podršku tokom studiranja, izvođenja ovog eksperimenta i izrade doktorske disertacije. Hvala vam što bezrezervno verujete u mene, podržavate i hrabrite me celog mog života i svakodnevno pružate neizmerno ljubav.*



# UTICAJ UPOTREBE IZOFLAVONA U ISHRANI NA PROIZVODNE REZULTATE I BIOLOŠKE PARAMETRE BROJLERA

## Rezime

Izoflavoni su difenolična jedinjenja male molekulske mase koja spadaju u grupu fitoestrogena i mogu se naći u različitim biljkama, naročito iz familije *Fabaceae*. Jedan od glavnih izoflavona prisutnih u soji je genistin, koji nakon deglikolizacije prelazi u metabolit genistein, jedinjenje sa estrogenom aktivnošću koje ostvaruje različite antioksidativne, antiinflamatorne, imunomodulatorske, hipolipidemične i antibakterijske efekte. Osnovni cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je da se ispita uticaj genisteina u hrani tokom završne i produžene faze tova na proizvodne performanse, zdravstveni status, antioksidativni kapacitet, histomorfološke parametre, mikrobiotu digestivnog trakta i kvalitet i prinos mesa brojlera.

Za ogled su korišćeni brojleri Cobb 500 provenijencije, prosečne inicijalne mase  $44,11 \pm 4,25$  g, koji su do 21. dana bili hranjeni potpunim smešama standardnog sirovinskog i hemijskog sastava za ishranu piladi u prvoj (starter) i drugoj (grover) fazi tova. Na početku treće faze tova (finišer) ukupno 360 brojlera je podeljeno u pet grupa (po 72 jedinke) sa po šest bokseva u kojima je bilo raspoređeno po 12 brojlera. Tokom završne faze tova brojleri su bili hranjeni potpunom smešom za tov piladi III na bazi kukuruza i sojine sačme, s tim da kontrolna grupa (K) nije u hranu dobijala preparat genisteina, ogledna grupa I (O-I) je dobijala 200 mg/kg, ogledna grupa II (O-II) 400 mg/kg, ogledna grupa III (O-III) 600 mg/kg i ogledna grupa IV (O-IV) 800 mg/kg hrane preparata 99,6% čistog ekstrakta genisteina. Eksperiment se sastojao iz dva dela: prvi period koji je trajao 21 dan (od 21. do 42. dana tova) i drugi period produženog tova koji je trajao 37 dana (od 21. do 58. dana tova).

Pre početka svake faze tova izvršena su hemijska ispitivanja hrane, dok je za potpunu smešu za ishranu piladi III određen i antioksidativni kapacitet. Nakon oba eksperimentalna perioda (42. i 58. dan) praćeni su proizvodni rezultati (telesna masa, prirast, konzumacija, konverzija), određene su mase unutrašnjih organa, biohemijske analize krvi, aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri, histomorfometrijska ispitivanja segmenata tankog creva, broj *Lactobacillus* spp. u cekumu, hemijski sastav tibije, parametri prinosa, kvaliteta i održivosti mesa brojlera, kao i ekonomičnost proizvodnje.

Potpuna smeša za ishranu brojlera kontrolne i oglednih grupa bila je istog hemijskog sastava, izoenergetska i izoproteinska, dok u hrani oglednih grupa brojlera analitički sadržaj genisteina je bio manji od teoretski dodate količine. FRAP testom nije utvrđena razlika u antioksidativnoj aktivnosti metanolnih uzoraka hrane kontrolne i oglednih grupa brojlera ( $P > 0,05$ ), dok značajno manju sposobnost inhibiranja lipidne peroksidacije su pokazali uzorci hrane u kojoj je dodato 200

mg/kg genisteina ( $P < 0,05$ ). Nakon prvog eksperimentalnog perioda dodavanje genisteina u hrani brojlera pozitivno je uticalo na telesnu masu ( $P = 0,0012$ ), prirast ( $P = 0,0003$ ) i konverziju ( $P = 0,0023$ ), bez promene u konzumaciji hrane ( $P = 0,0821$ ), dok nakon drugog eksperimentalnog perioda suplementacija 600 mg genisteina/kg hrane negativno je uticala na prirast ( $P < 0,0001$ ) i konverziju ( $P = 0,0008$ ) hrane brojlera O-III grupe (1139 g i 2,88; pojedinačno). Za oba eksperimentalna perioda nije uočen efekat genisteina u hrani na serumsku koncentraciju holesterola ( $P > 0,05$ ). Koncentracija triglicerida u serumu brojlera oglednih grupa bila je značajno niža ( $P = 0,0014$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom nakon 42. dana tova, dok nakon 58. dana tova značajno više vrednosti ( $P = 0,009$ ) su utvrđene u grupama suplementiranim sa 600 i 800 mg genisteina/kg hrane (0,42 i 0,43 mmol/l, pojedinačno). Nakon prvog eksperimentalnog perioda uočena je značajno viša apsolutna i relativna masa slezine ( $P < 0,0001$ ) i srca ( $P = 0,0002$ ) u grupi brojlera koja je dobijala 800 mg genisteina/kg hrane, a produženom suplementacijom uočena je najveća masa jajnika u O-I grupi brojlera (2,17 g;  $P = 0,0036$ ). Nakon produžene suplementacije 200 mg genisteina/kg hrane utvrđena je veća aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri (SOD, CAT i GSH-Px) ( $P < 0,05$ ). Nakon prvog eksperimentalnog perioda genistein u hrani brojlera pozitivno je uticao na histomorfometrijske parametre u duodenumu ( $P < 0,05$ ), a nakon drugog eksperimentalnog perioda u jejunumu brojlera oglednih grupa ( $P < 0,05$ ), dok za oba perioda u ileumu je uočen negativni efekat na visinu resica i odnos visina resice/dubina kripte, koji je najviše bio izražen u O-III grupi brojlera ( $P < 0,0001$ ). Produžena suplementacija od 400 do 800 mg genisteina/kg hrane značajno je povećala ( $P = 0,0009$ ) broj *Lactobacillus* spp. u cekumu brojlera (6,24, 6,42, 6,38 log CFU/g, pojedinačno). Nakon prvog eksperimentalnog perioda značajno veća masa tibije, sadržaj pepela i kalcijuma ( $P < 0,0001$ ) utvrđeni su kod O-I i O-II grupe brojlera, dok je nakon produženog tova u istim grupama uočen značajno niži sadržaj pepela i Ca ( $P < 0,0001$ ). Dodavanjem genisteina u hrani, ogledne grupe brojlera imale su veću prosečnu masu trupa i grudi nakon prvog eksperimentalnog perioda ( $P < 0,05$ ), a nakon produžene suplementacije uočen je veći prinos mesa u svim oglednim grupama ( $P < 0,0001$ ). Nakon oba eksperimentalna perioda dodavanje genisteina u hrani značajno je poboljšalo sposobnost vezivanja vode mesa grudi brojlera ( $P < 0,0001$ ), dok kod brojlera koji su dobijali 400, 600 i 800 mg genisteina/kg hrane uočena je viša pH vrednost mesa grudi 45 minuta nakon klanja ( $P = 0,0051$ ). U svim oglednim grupama, nakon drugog eksperimentalnog perioda, utvrđen je značajno viši sadržaj proteina, niži sadržaj vode i masti u mesu grudi i niži sadržaj masti u mesu karabataka ( $P < 0,0001$ ). Sadržaj genisteina u mesu grudi brojlera kontrolne i oglednih grupa, za oba eksperimentalna perioda, bio je ispod granice kvantifikacije ( $< 5,6$  nmol/kg mesa). Tokom devet meseci skladištenja sadržaj malondialdehida u uzorcima mesa karabataka oglednih grupa brojlera koje su dobijale od 200 do 800 mg genisteina/kg hrane tokom produženog tova bio je značajno niži u odnosu na K grupu brojlera ( $P < 0,0001$ ).

Senzorskom analizom je pokazano da je meso grudi i bataka sa karabatakom oglednih grupa brojlera dobilo veće ocene za mekoću i sočnost za oba eksperimentalna perioda ( $P < 0,05$ ), a nakon produženog tova grupe suplementirane sa 400 do 800 mg genisteina/kg hrane su ocenjene kao najprihvatljivije ( $P < 0,05$ ). Troškovi hrane, ukupni troškovi i vrednost proizvodnje bili su veći kod brojlera hranjenih sa dodatkom genisteina za oba eksperimentalna perioda.

**Ključne reči:** brojleri, genistein, produženi tov, lipidni status, intestinalna morfometrija, antioksidativni kapacitet, kvalitet mesa

**Naučna oblast:** Veterinarska medicina

**Uža naučna oblast:** Ishrana i botanika, Biotehnologija, Higijena i tehnologija namirnica

**UDK broj:** 636.527.58:614.95:547.972

# EFFECT OF ISOFLAVONES IN THE DIET ON PERFORMANCES AND BIOLOGICAL PARAMETERS OF BROILERS

## Summery

Isoflavones are diphenolic compounds of low molecular weight that belong to the group of phytoestrogens and can be found in various plants, especially from the *Fabaceae* family. One of the main isoflavones present in soy is genistin, that can be deglycosylated to metabolite genistein, a compound with estrogenic activity that exhibits various antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, hypolipidemic and antibacterial effects. The main aim of the research within this doctoral dissertation was to examine the effect of genistein in broiler feed during the late fattening phase and extended fattening on production performance, health status, antioxidant capacity, intestinal histomorphological parameters and microbiota, and meat yield and quality.

For the experiment, Cobb 500 broilers, with an average initial weight of  $44.11 \pm 4.25$  g, were used. For 21 days broilers were fed with complete mixtures of standard raw and chemical composition during the first (starter) and the second (grower) growth phase. At the beginning of the third phase of fattening (finisher), a total of 360 broilers were divided into five groups (72 birds) with six pens of 12 broilers each. During the late fattening phase, broilers were fed a basal corn-soybean meal diet, where the control group (K) did not receive genistein, treatment group I (O-I) received 200, treatment group II (O-II) 400, treatment group III (O-III) 600 and treatment group IV (O-IV) 800 mg of 99.6% pure genistein extract/kg feed. The experiment consisted of two periods: the first lasted 21 days (from the 21<sup>st</sup> to the 42<sup>nd</sup> day of fattening) and the second period of prolonged fattening which lasted 37 days (from the 21<sup>st</sup> to the 58<sup>th</sup> day of fattening).

At the beginning of each growth phase, the chemical composition of the feed mixture was examined, while the antioxidant capacity was determined for the finisher. After both experimental periods (days 42 and 58), production results were monitored (body weight, weight gain, consumption, feed conversion ratio), internal organ weight, biochemical blood tests, liver antioxidant enzyme activity, histomorphometric examinations of small intestine segments were determined, count of *Lactobacillus* spp. in the caecum, the tibia chemical composition, meat yield, quality and storage stability, as well as production efficiency.

The feed mixtures of the control and treatment groups were of the same chemical composition, balanced with energy and protein content, and in the feed mixtures of the treatment groups genistein analytical contents were less than the theoretically added genistein amounts. The FRAP test did not show a difference in the antioxidant capacity of methanolic feed extracts among control and treatment groups of broilers ( $P > 0.05$ ), while significantly lower ability to inhibit lipid peroxidation was shown by feed samples with 200 mg genistein/kg added ( $P < 0.05$ ). After the first experimental

period, dietary genistein had a positive effect on body weight ( $P=0.0012$ ), weight gain ( $P=0.0003$ ) and feed conversion ratio ( $P=0.0023$ ), with no effect on feed consumption ( $P=0.0821$ ), while after the second experimental period the supplementation of 600 mg genistein/kg had a negative effect on the weight gain ( $P<0.0001$ ) and feed conversion ratio ( $P=0.0008$ ) of O-III group of broilers (1139 g and 2.88; respectively). There was no observed effect of dietary genistein on serum cholesterol concentration ( $P>0.05$ ) for both experimental periods. The serum triglyceride concentrations of the treatment groups were significantly lower ( $P=0.0014$ ) compared to the control group after the 42<sup>nd</sup>, while after the 58<sup>th</sup> day of fattening significantly higher values ( $P=0.009$ ) were found in the groups supplemented with 600 and 800 mg genistein/kg feed (0.42 and 0.43 mmol/L, respectively). After the first experimental period, the significantly higher absolute and relative spleen ( $P<0.0001$ ) and heart ( $P=0.0002$ ) weights were observed in the group of broilers fed with 800 mg genistein/kg of feed, while prolonged supplementation led to the highest ovarian weight in the O-I group of broilers (2.17 g;  $P=0.0036$ ). After prolonged 200 mg/kg genistein supplementation, higher activity of antioxidant enzymes in the liver (SOD, CAT and GSH-Px) was found ( $P<0.05$ ). After the first experimental period, dietary genistein had a positive effect on histomorphometric parameters in the duodenum ( $P<0.05$ ), and after the second in the jejunum of treatment groups ( $P<0.05$ ), while for both periods in the ileum negative effect on villus height and villus height/crypt depth ratio was observed and the most pronounced was in the O-III group of broilers ( $P<0.0001$ ). Prolonged supplementation of 400, 600 and 800 mg/kg genistein significantly increased ( $P=0.0009$ ) the number of *Lactobacillus* spp. in the broiler caecum (6.24, 6.42, 6.38 log CFU/g, respectively). After the first experimental period, significantly higher tibia weight, ash and calcium content ( $P<0.0001$ ) were found in O-I and O-II groups of broilers, while after prolonged fattening, in the same groups, significantly lower ash and Ca content was observed ( $P<0.0001$ ). The addition of genistein in feed led to higher average carcass and breast weight of broilers in the treatment groups after the first experimental period ( $P<0.05$ ), while after prolonged supplementation, a higher meat yield was observed in all treatment groups ( $P<0.0001$ ). After both experimental periods, dietary genistein significantly improved the drip loss of broiler breast meat ( $P<0.0001$ ), while in broilers receiving 400, 600 and 800 mg genistein/kg, a higher pH value of breast meat was observed 45 minutes after slaughter ( $P=0.0051$ ). In all treatment groups, after the second experimental period, significantly higher protein content, lower water and fat content in breast meat and lower fat content in thigh meat were found ( $P<0.0001$ ). The content of genistein in the breast meat of control and treatment broiler groups for both experimental periods was below the limit of quantification ( $<5.6$  nmol/kg meat). During nine months of storage, the content of malondialdehyde in the thigh meat samples of treatment groups, that received 200 to 800 mg/kg genistein during prolonged fattening, was significantly lower compared to K group of broilers ( $P<0.0001$ ). Sensory analysis showed that



the meat of breast and drumstick with thigh of treatment broilers groups received higher scores for softness and juiciness for both experimental periods ( $P<0.05$ ), while after prolonged fattening groups supplemented with 400, 600 and 800 mg/kg genistein rated as the most acceptable ( $P<0.05$ ). Feed costs, total costs, and production value were higher in broilers fed genistein for both experimental periods.

**Key words:** broilers, genistein, prolonged fattening, lipid status, intestinal morphometry, antioxidant capacity, meat quality

**Scientific field:** Veterinary Medicine

**Field of academic expertise:** Nutrition and Botany, Biotechnology, Food Hygiene and Technology

**UDK number:** 636.527.58:614.95:547.972

<b>Sadržaj:</b>	
1. Uvod	1
2. Pregled literature	3
2.1. Trenutno stanje i pravci razvoja živinarske proizvodnje	3
2.2. Proizvodnja mesa sa posebnim osvrtom na živinsko meso	4
2.3. Aditivi u hrani za životinje	6
2.3.1. Stimulatori rasta u hrani za životinje	6
2.3.2. Fitogeni aditivi u hrani za životinje	7
2.3.2.1. Mehanizmi delovanja fitogenih aditiva	8
2.4. Fitoestrogeni	10
2.4.1. Flavonoidi	12
2.4.1.1. Izoflavoni	13
2.4.1.2. Uticaj različitih procesa prerade na sadržaj i konverziju izoflavona u proizvodima na bazi soje	13
2.4.1.3. Biološka raspoloživost izoflavona	15
2.4.1.4. Primena izoflavona u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji	18
2.4.1.5. Uticaj izoflavona na biološke parametre životinja	19
2.5. Genistein	20
2.5.1. Bioraspoloživost genisteina	24
2.5.2. Genistein kao antioksidans	25
2.5.3. Genistein i lipidoza	27
2.5.4. Genistein i osteoporoza	28
2.5.5. Genistein i imunski odgovor	29
2.5.6. Antibakterijski efekat genisteina	30
2.6. Funkcionalna hrana	31
2.6.1. Meso kao funkcionalna hrana	32
2.7. Kvalitet mesa piladi	32
2.7.1. Mogućnosti dobijanja obogaćenog mesa modifikacijama u ishrani živine	33
2.7.1.1. Polinezasićene n-3 masne kiseline i CLA	33
2.7.1.2. Antioksidansi	34
2.8. Sadržaj izoflavona u hrani animalnog porekla	35
2.8.1. Izoflavoni u proizvodima od mesa	37
2.8.2. Obogaćenje jaja i mesa živine dodavanjem izoflavona u hrani	37
2.8.2.1. Jaja	37
2.8.2.2. Meso	38
3. Cilj i zadaci ispitivanja	40
4. Materijal i metode	42
4.1.1. Etičko odobrenje	42
4.1.2. Izbor materijala, uslovi gajenja i hranjenja brojlera	42
4.1.3. Čistoća ekstrakta genisteina	44
4.1.4. Plan ispitivanja	45
4.2. Metode ispitivanja	45
4.2.1. Zdravstveno stanje	45
4.2.2. Hemijske analize hrane	46
4.2.2.1. Analiza genisteina u hrani	47
4.2.2.2. Antioksidativni kapacitet hrane	48
4.2.3. Proizvodni rezultati	49
4.2.4. Analiza krvnog seruma (holesterol i trigliceridi)	50
4.2.5. Masa organa	50
4.2.6. Histološka ispitivanja	50
4.2.7. Mikrobiološka ispitivanja	50
4.2.8. Određivanje ukupnih proteina i aktivnosti antioksidativnih enzima u homogenatima jetre	51
4.2.9. Analize kostiju	54
4.2.10. Određivanje prinosa mesa	54

4.2.11. Određivanje hemijskog sastava mesa	55
4.2.12. Merenje pH vrednosti i temperature mesa	55
4.2.13. Analiza genisteina u mesu grudi	55
4.2.14. Određivanje sposobnosti vezivanja vode	56
4.2.15. Metode određivanja TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)	56
4.2.16. Senzorska analiza	57
4.3. Izračunavanje ekonomičnosti proizvodnje	57
4.4. Statistička obrada podataka	57
5. Rezultati ispitivanja	58
5.1. Hemijski sastav hrane za brojlere	58
5.2. Analiza genisteina u hrani	58
5.3. Antioksidativni kapacitet hrane	59
5.4. Zdravstveno stanje	60
5.5. Proizvodni rezultati	60
5.5.1. Masa brojlera tokom ogleđa	60
5.5.2. Prirast brojlera tokom ogleđa	61
5.5.3. Konzumacija i konverzija hrane tokom ogleđa	61
5.6. Biohemijske analize krvi	62
5.7. Mase organa	64
5.8. Ispitivanje sadržaja ukupnih proteina i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u jetri brojlera	65
5.9. Histomorfometrijska ispitivanja	66
5.10. Broj bakterija mlečne kiseline ( <i>Lactobacillus</i> spp.) u cekumu brojlera	69
5.11. Masa i hemijski sastav tibije brojlera	69
5.12. Klanični parametri brojlera	70
5.12.1. Parametri prinosa mesa brojlera	70
5.12.2. Masa i udeo pojedinih delova trupa brojlera	71
5.12.3. Masa i zastupljenost različitih tkiva grudi i bataka s karabatakom	74
5.13. Vrednost pH i temperatura mesa grudi brojlera	76
5.14. Sposobnost vezivanja vode (SVV)	78
5.15. Hemijski sastav mesa brojlera	79
5.16. Sadržaj genisteina u mesu grudi brojlera	80
5.17. TBARS vrednost u mesu karabataka brojlera	81
5.18. Senzorska ispitivanja mesa grudi i bataka sa karabatakom	82
5.19. Izračunavanje ekonomičnosti proizvodnje brojlera u završnoj fazi tova	84
6. Diskusija	87
6.1. Hemijski sastav hrane za brojlere	87
6.2. Genistein u hrani za životinje	88
6.3. Antioksidativni kapacitet hrane	92
6.4. Proizvodni rezultati	96
6.5. Biohemijske analize krvi	99
6.6. Masa unutrašnjih organa	102
6.7. Sadržaj ukupnih proteina i aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri	105
6.8. Histomorfometrijska ispitivanja	108
6.9. Broj bakterija mlečne kiseline ( <i>Lactobacillus</i> spp.) u cekumu brojlera	110
6.10. Masa i hemijski sastav tibije brojlera	112
6.11. Klanični parametri brojlera nakon 42. i 58. dana tova	115
6.12. Vrednost pH i temperatura mesa grudi brojlera nakon 42. i 58. dana tova	118
6.13. Sposobnost vezivanja vode (SVV)	120
6.14. Hemijski sastav mesa brojlera nakon 42. i 58. dana tova	122
6.15. Sadržaj genisteina u mesu grudi brojlera	124
6.16. TBARS vrednost u mesu karabataka brojlera nakon dva eksperimentalna perioda	127
6.17. Senzorska ispitivanja mesa grudi i bataka sa karabatakom	129
6.18. Izračunavanje ekonomičnosti proizvodnje brojlera u završnoj fazi tova	132
7. Zaključci	134
8. Spisak literature	137
9. Prilozi	168
Prilog A	168

Prilog B	171
Prilog C	172
Prilog D	176
Prilog E	178
Prilog F	189
Prilog G	190
Prilog H	193
Prilog I	205
Prilog J	207
Prilog K	208
Prilog L	212

## 1. UVOD

Upotrebom subterapijskih doza antibiotika kao stimulatora rasta u ishrani farmских životinja, pa i u ishrani živine, nastao je problem rezidua antibiotika u mesu živine i razvoj antimikrobne rezistencije. Od stupanja na snagu zabrane upotrebe antibiotika u hrani za životinje od strane Evropske unije 2006. godine, istražuju se alternativni postupci (upotreba enzima, probiotika, prebiotika, sinbiotika, organskih kiselina i biljnih ekstrakata) kojima bi se poboljšale proizvodne performanse farmских životinja, naročito svinja i živine. U poređenju sa sintetskim antibioticima i neorganskim materijama, ekstrakti biljaka su prirodni, manje toksični i obično ne ostavljaju rezidue. Mnogi su sertifikovani kao GRAS (Generally Recognized As Safe) od strane Agencije za hranu i lekove (FDA-Food and Drug Administration), među kojima je i ekstrakt izoflavona poreklom iz soje. Ispitivanja pokazuju da fitogeni aditivi, stimulatori rasta, pozitivno utiču na imunitet i odgovor organizma u stresnim stanjima, povećavaju iskoristivost hranljivih materija, pa samim tim pomažu životinjama da ispolje svoj genetski potencijal i da ostvare bolje proizvodne rezultate.

Osnovna svrha korišćenja aditiva u hrani za životinje je poboljšanje proizvodnih performansi i zdravstvenog stanja. S obzirom da domaća živina nema dovoljno razvijenu prirodnu rezistenciju protiv različitih patogena, izazivača bolesti, poslednjih godina se u živinarsku proizvodnju uvode komercijalni biljni aditivi, koji su dobro prihvaćeni od strane potrošača zbog toga što su prirodnog porekla i zato što se smatraju bezbednim. Među njima, etarska ulja, organske kiseline i fitogene komponente, kao što su flavonoidi, za koje je pokazano da povećavaju gastričnu sekreciju i smanjuju broj patogenih bakterija u digestivnom traktu, smatraju se jednim od značajnijih alternativa antibioticima.

Izoflavoni, koji spadaju u potklasu flavonoida, čine veliku grupu fenolnih jedinjenja. Tri glavna izoflavona su daidzein, genistein i glicitein, a najviše su zastupljena u soji i drugim leguminozama. Izoflavoni primarno ostvaruju estrogenu aktivnost u klasičnim estrogen-target tkivima, zbog čega se svrstavaju u fitoestrogene. Pored navedenog, biološki efekti izoflavona uključuju i antioksidativnu i antiproliferativnu aktivnost, koje dodatno učestvuju i u mehanizmima kojima se povećava otpornost organizma prema različitim bolestima i stresogenim faktorima sredine, čime se postižu i bolje proizvodne karakteristike kod različitih životinjskih vrsta.

Intenzivna stočarska proizvodnja u savremenim sistemima gajenja može da utiče na dobijanje mesa lošijih senzorskih karakteristika (ukus, boja, mekoća) i mesa manje nutritivne vrednosti. Zbog toga u živinarstvu postoji potreba za aditivima, koji bi omogućili da se u intenzivnom uzgoju dobije kvalitetnije meso, čime bi se zadovoljile potrebe potrošača i industrije, a koji bi istovremeno bili bezbedni kako za životinje, tako i za ljude. S obzirom na potrebe za razvoj novih strategija ishrane

kojima bi se uticalo na masnokiselinski sastav, sadržaj holesterola i obogaćenje mesa antioksidativnim supstancama u cilju odlaganja oksidacije masti i produžavanja održivosti mesa, sve se više istražuje upotreba biljnih antioksidanasa u ekstrahovanoj (prečišćenoj) formi kako bi se utvrdila njihova efikasnost i mogućnost praktične primene u ove svrhe. Posebno je značajno utvrditi u kojoj količini se izoflavoni, koji se dodaju hrani za životinje, i njihovi metaboliti mogu zadržati u jestivim tkivima životinja, kako sa aspekta bezbednosti potrošača, tako i sa aspekta dobijanja namirnica sa dodatom vrednošću (npr. jaja obogaćena izoflavonima) koje mogu predstavljati funkcionalnu hranu sa potencijalnim pozitivnim efektima na zdravlje ljudi.

Fitogeni su relativno nova klasa aditiva u hrani za životinje i zbog toga su donekle limitirana saznanja koja se odnose na mehanizme njihovog delovanja i eventualnih modela njihove primene. Takođe, kada se govori o bezbednosti potrošača, mora se imati u vidu da se metabolička aktivnost (npr. apsorpcija, potencijalno akumuliranje u jestivim tkivima) dosta razlikuje među fitogenim supstancama i da je zbog toga potrebno proceniti bezbednost svake pojedinačne aktivne supstance nekog fitogenog aditiva. Stoga postoji potreba za jednim sistemskim pristupom kojim bi se utvrdila stvarna efikasnost i bezbednost ekstrakta genisteina (u zavisnosti od tipa, doze aktivne komponente i mogućih interakcija sa drugim sastojcima hrane) kao fitogenih aditiva u ishrani živine.

## **2. PREGLED LITERATURE**

### **2.1. Trenutno stanje i pravci razvoja živinarske proizvodnje**

Živinarska proizvodnja je najbrže rastuća i najfleksibilnija grana stočarstva. Razvoju ove proizvodnje značajno doprinosi porast svetske populacije, veća kupovna moć potrošača i urbanizacija. Ovi faktori su doveli do širenja, konsolidacije, vertikalne integracije i globalizacije živinarskog sektora proteklih petnaest godina, kako u razvijenim zemljama, tako i u zemljama u razvoju (FAO, 2020; Farrell, 2013). Napredak ostvaren na nivou uzgoja omogućio je da se dobiju hibridi koji zadovoljavaju specifične potrebe i veliku produktivnost, ali koji zahtevaju i posebne uslove gajenja. Razvoj i transfer procesnih tehnologija, počevši od pripreme hrane za životinje, pa do samog klanja, povećao je bezbednost i efikasnost proizvodnje, ali istovremeno je doveo do favorizovanja velikih i potiskivanja malih proizvođača. U živinarskom sektoru je poslednjih godina razvijena jasna razlika između velikih i srednjih industrijalizovanih sistema proizvodnje i ekstenzivnih proizvodnih sistema koji imaju ulogu da obezbede zaradu malim proizvođačima i da snabdevaju lokalne markete (FAO, 2020).

Bavljenje stočarstvom predstavlja osnovni izvor prihoda za oko milijardu ljudi u najsiromašnijim delovima sveta. Naročito ruralno živinarstvo je od esencijalnog značaja za život mnogih poljoprivrednika koji nemaju puno resursa i kojima je to jedini izvor prihoda. Naime, u zemljama koje su deficitarne u hrani oko 80% prihoda se obezbeđuje uzgojem živine čime se značajno doprinosi: boljoj ishrani ljudi, odnosno proizvodnji visoko kvalitetnih namirnica animalnog porekla bogatih biološki važnim proteinima, mastima, vitaminima i mineralima (jaja i meso); podršci, naročito ženama, da se bave uzgojem i da kao proizvođači ostvaruju male prihode i uštedevinu čime mogu da steknu ekonomsku stabilnost; obezbeđivanju đubriva za bašte i obradive površine (Farrell, 2013). Takođe, u selima, pored ekonomskog i nutritivnog značaja, prepoznat i priznat je i sociokulturološki i religiozni značaj živinarstva za male poljoprivredne proizvođače (FAO, 2020).

Savremena poljoprivredna proizvodnja oslanja se na efikasne proceduralne tehnike u cilju dobijanja visoko kvalitetnih i bezbednih proizvoda životinjskog porekla u održivom sistemu, koji je istovremeno profitabilan za proizvođače. Trenutne strategije se baziraju primarno na optimalnim uslovima gajenja i dobrom menadžmentu proizvodnje i podrazumevaju: odgovarajući prostor sa adekvatnom prostirkom, prilagođenu temperaturu, ventilaciju, minimalno prisustvo prašine u vazduhu (mikroklimat za svaku starosnu kategoriju), pripremu objekta pre svakog novog proizvodnog ciklusa (turnusa) (Wenk, 2002). Zbog velike potrebe za proteinima animalnog porekla s jedne strane, i strožijih propisa vezanih za dobrobit životinja i zaštitu životne sredine s druge

strane, neophodno je stalno pronalaženje novih i unapređenje postojećih tehnika u uzgoju farmskih životinja.

Ishranom se primarno obezbeđuje unos adekvatne količine energije i esencijalnih nutrijenata. Kako bi se izbegli poremećaji koji se dovode u vezu sa ishranom i digestivnim traktom, naročito kod mladih životinja, u savremenom uzgoju se teži da se obezbedi adekvatna količina proteina (kroz zadovoljavanje potreba esencijalnim amino kiselinama), dodavanje organskih kiselina (fumarna i mlečna kiselina), enzima (fitaza, karbohidrataza), prebiotika, dijetnih vlakana, fruktoze, oligosaharida manoze, pektina, fitobiotika, probiotika (bakterija mlečne kiseline) i da se izbegavaju antinutritivni faktori u hrani za životinje (Wenk, 2002). Ključni parametar, koji bi u predstojećim decenijama naročito trebalo poboljšati je konverzija hrane životinja koja se računa kao količina unete hrane po jedinici mase prirasta, dobijenih jaja ili količine proizvedenog mleka. Troškovi hrane za životinje učestvuju 60-70% u ukupnim troškovima stočarske proizvodnje. Stoga, optimizovanje potrošnje hrane je najodgovornije za održivu i profitabilnu stočarsku proizvodnju. U većini delova sveta najskuplja hraniva u hrani za životinje su ona koja obezbeđuju energiju, proteine i fosfor, pa je upravo potrošnju ovih hraniva neophodno optimizovati kako bi se proizvodnja učinila efikasnom (Steiner i Syed, 2015).

## **2.2. Proizvodnja mesa sa posebnim osvrtom na živinsko meso**

Proizvodnja mesa na globalnom nivou stabilno raste tokom poslednje decenije. Imajući u vidu stalan rast ljudske populacije, predviđa se da će ovakav trend se nastaviti i u bliskoj budućnosti. Svetska proizvodnja mesa je porasla za 1% na 327 miliona tona u 2018. godini, sa značajnim porastom u proizvodnji goveđeg, svinjskog i živinskog mesa, i umerenim porastom proizvodnje ovčijeg mesa. Porast ove proizvodnje zabeležena je u Australiji, zemljama Evropske unije, Rusiji i SAD-u, a u nešto manjem obimu i u Argentini, Indiji i Meksiku. Međutim u Kini i Brazilu, dvema zemljama koje su najveći proizvođači mesa u svetu, uočen je pad, čime je i usporen trend globalnog rasta proizvodnje mesa. Ovaj porast se većinom pripisuje većom produktivnošću na nivou farmi, a u nekim slučajevima, naročito u Australiji i u zemljama Evropske unije, klimatski faktori (suša) su uticali na povećan obim klanja. U slučaju Kine, sporiji rast u proizvodnji mesa posledica je pada proizvodnje svinjskog mesa zbog pojave afričke kuge svinja, dok u Brazilu manji obim proizvodnje je uzrokovan smanjenim izvozom i to naročito u Rusiju, koja je iz bezbednosnih razloga stavila zabranu na uvoz mesa iz ove zemlje (OECD-FAO, 2019).

Obim proizvodnje živinskog mesa je porastao za 1,3% u 2018. godini što predstavlja 123,9 miliona tona, dok se u 2019. godini očekuje porast za 3%. Trenutna globalna predviđanja procenjuju da će do 2025. godine živinsko meso imati najveći obim proizvodnje i potrošnje, daleko iznad goveđeg,



svinjskog i ovčijeg mesa. Živinsko meso je trenutno najviše konzumirano meso u zemljama članicama Organizacije za evropsku ekonomsku saradnju (engl. Organisation for Economic Co-operation and Development-OECD) (FAO, 2019; King i sar., 2018). Zemlje u kojima je prisutan porast proizvodnje živinskog mesa, kako na račun većeg broja životinja, tako i na račun veće mase trupova, su SAD, zemlje Evropske unije, Indija i Kina, nešto sporiji rast proizvodnje uočen je u Meksiku, Rusiji, Turskoj i Japanu, dok je pad proizvodnje zabeležen u Brazilu i Argentini. U 2018. godini je u Evropskoj uniji proizvodnja živinskog mesa porasla za 1,2%, tako da je uspešno prevaziđena kriza izazvana visoko patogenim virusom avijarne influence koja je dovela do stagnacije u 2017. godini. Domaći proizvođači su takođe bili podstaknuti odlukom Evropske unije da se ograniči uvoz mesa iz Brazila, dok su dodatnu podršku živinarskoj proizvodnji u Evropi pružile Mađarska, Poljska i Rumunija koje su kroz veća ulaganja uspele da realizuju bolju i održivu produktivnost na živinarskim farmama (FAO, 2019).

Povećana potrošnja živinskog mesa se može pripisati činjenici da je meso brojlera relativno jeftin i pristupačan izvor proteina sa niskim sadržajem masti, a pored toga ne dovodi se u vezu sa religioznim i kulturnim ograničenjima. Među potrošačima je najviše prihvaćeno, između ostalog, i zbog lake pripreme (King i sar., 2018). Predviđanja su da će na osnovu dosadašnjih trendova svetska populacija dostići broj od 9 milijardi stanovnika do 2050. godine, i to sa naročitim porastom u siromašnijim zemljama, zbog čega će značajno porasti potražnja za proteinima animalnog porekla (King i sar., 2017). Tako da se očekuje da će uzgoj brojlera, zahvaljujući visokoj konverziji hrane, zauzimanjem manje prostora pri uzgoju, manjim ulaganjima u proizvodnju, kao i niskom emisijom gasova u poređenju sa ostalim farmskim uzgojima, imati najvažniju ulogu da obezbedi održivo snabdevanje hranom (Caro i sar., 2017). Pored potrebe za održivim snabdevanjem hranom i zahtevi potrošača za pristupačnom i bezbednom hranom vrše stalni pritisak na proizvođače da pronalaze nove metode kojima bi povećali produkciju, a nova saznanja i napredak u nauci i tehnologiji su esencijalni u osmišljavanju i realizovanju odgovarajućih rešenja kojima bi se adekvatno odgovorilo na ovakve izazove. Tako da različite nutritivne strategije koje podrazumevaju izmene u ishrani, formulisanju obroka, suplementaciju određenim aditivima, i druge metode nude određene tehnološke prednosti koje pomažu razvoju stočarske proizvodnje, a naročito živinarskog sektora, i to kako sa aspekta povećane proizvodnje, tako i s aspekta dobijanja bezbedne, kvalitetne i nutritivno vredne hrane animalnog porekla (King i sar., 2018).

### **2.3. Aditivi u hrani za životinje**

Aditivi u hrani za životinje su proizvodi koji se koriste u ishrani životinja u svrhu poboljšanja kvaliteta smeša za ishranu i kvaliteta hrane animalnog porekla, ili u cilju poboljšanja performansi i zdravlja životinja (Hashemi i Davoodi, 2010). Prema članu 74. Pravilnika o kvalitetu hrane za životinje u dodatke hrani spadaju: 1) vitamini i provitamini; 2) mikroelementi i minerali; 3) neproteinska azotna jedinjenja; 4) aminokiseline; 5) stimulatori rasta; 6) kokcidostatici i 7) ostali dozvoljeni dodaci (Anon, 2017). Pod aditivima u hrani za životinje podrazumevaju se supstance koje proizvođač primenjuje u hrani za zdrave životinje, i to ne samo s aspekta poboljšanja nutritivnog sastava obroka, već kako bi se dugotrajno obezbedile neke dodatne biološke funkcije životinjama (dodaju se hrani ako je moguće tokom celog proizvodnog perioda), dok veterinarski lekovi se koriste za lečenje bolesnih životinja samo u ograničenom vremenskom periodu, pod strogom kontrolom veterinara, nakon koga sledi period karence (Wallace i sar., 2010). Prema definiciji pravilnika Evropske unije (Regulation (EC) No 1831/2003) aditivi u hrani za životinje su supstance ili preparati, koji nisu hrana ili premiksi, a koji se namerno dodaju u hrani ili vodi u cilju: poboljšanja karakteristika hrane za životinje (pojačivači ukusa, antioksidansi); uticaja na karakteristike proizvoda animalnog porekla (kontaminacija mikroorganizmima, održivost, ukus); uticaja na životnu sredinu i posledica koje nastaju zbog velike stočarske proizvodnje (smanjenje emisije amonijaka i metana); pozitivnog uticaja na uzgoj, proizvodne karakteristike i dobrobit farmских životinja utičući na mikrobiotu digestivnog trakta i svarljivost hrane; i postizanja kokcidostatskog i histomonostatskog efekta.

#### **2.3.1. Stimulatori rasta u hrani za životinje**

U stimilatore rasta spadaju fitobiotici, probiotici, prebiotici i drugi dopušteni stimulatori rasta (Anon, 2017). Tokom poslednjih dvadeset godina značajno je povećano interesovanje za biljke, biljne ekstrakte i fitojedinjenja kao komponentama koje imaju potencijal da se koriste kao aditivi u hrani za životinje. Sve je veći broj publikacija koje potvrđuju da suplementacija hrane za životinje fitogenim aditivima pozitivno utiče na zdravlje životinja i niz zootehničkih parametara. Postoji stalna potreba za pronalaženjem novih aditiva koji bi pozitivno uticali na zdravlje i proizvodne rezultate životinja, a kojima bi se na efikasan i ekonomičan način zamenili antibiotici kao stimulatori rasta za koje postoji opravdana zabrinutost zbog razvoja bakterijske rezistencije (Wallace i sar., 2010). U Švedskoj od 1986. godine, u Švajcarskoj od 1999. godine, i konačno u svim zemljama Evropske unije od 2006. godine zabranjena je upotreba antibiotika u hrani za životinje, a teži se da se njihova upotreba smanji i/ili zabrani i u zemljama van Evropske unije (Windisch i sar., 2008). Tako je npr. 2009 godine u Srbiji, a 2011. godine u Koreji zabranjena upotreba antibiotika u hrani za životinje. Pre ove zabrane živinarska proizvodnja je umnogome

zavisila od primene antibiotika u kontroli intestinalnih patogena kao što su *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* i kokcidijalne infekcije. Međutim od tada u živinarskom sektoru akcenat je stavljen na poboljšanje uslova gajenja i menadžment, kako bi se u određenoj meri kompenzovali gubici. Potrošači takođe imaju bitnu ulogu u profilisanju proizvodnje ka što prirodnijom i organskom hranom animalnog porekla u kojoj bi fitogeni aditivi u hrani za životinje bili prihvatljiv izbor (Griggs i Jacob, 2005). Naime, kod potrošača poslednjih godina je naročito razvijena svest o posledicama koje nastaju zbog bakterija koje su visoko rezistentne na antibiotike. U prilog tome Hashemi i Davoodi (2010) navode da u poređenju sa sintetskim antibioticima i neorganskim jedinjenjima, jedinjenja poreklom iz biljaka su prirodna, manje toksična, ne zadržavaju se kao rezidue, pa se smatraju idealnim aditivima u hrani za proizvodne životinje.

### **2.3.2. Fitogeni aditivi u hrani za životinje**

Industija hrane za životinje je tokom proteklih nekoliko godina prepoznala potencijal supstanci poreklom iz biljaka u ishrani različitih životinjskih vrsta. Tako su fitogeni aditivi (fitobiotici) u velikoj meri zastupljeni u programima ishrane svinja i živine. Prema poreklu sirovine i načinu proizvodnje fitobiotici se mogu klasifikovati u: bilje (zeljaste, jednogodišnje biljke cevtnice); začine (biljke intenzivnog mirisa i ukusa koje se koriste kao kuhinjski začini); etarska ulja (volatilna lipofilna jedinjenja dobijena hladnim ceđenjem, ekstrakcijom na vodenoj pari ili alkoholnom destilacijom), i oleorezine (ekstrakti dobijeni lipofilnim rastvaračima) (Windisch i sar., 2008). Količina aktivne supstance u fitobioticima dosta varira i zavisi od dela biljke koji se koristi (seme, list, koren ili kora stabla), sezone branja, geografskog porekla i tehnika ekstrakcije koje modifikuju aktivne i pomoćne supstance u finalnom proizvodu. Komercijalni preparati koji su danas dostupni na tržištu se dosta razlikuju u pogledu sastava, izgleda i kompleksnosti formulacija. Neki proizvodi se sastoje samo od jedne (npr. etarsko ulje origana ili majčine dušice), dok drugi imaju nekoliko sirovina ili čak izuzetno složenu formulu sa velikim brojem sastojaka (Hashemi i Davoodi, 2010). Derivati biljaka koji se najčešće koriste kao fitogeni aditivi su trave, začini, etarska ulja i nevolatilni ekstrakti iz karanfilića, anisa, timijana, komorača, melise, belog luka, kamilice, origana, ruzmarina, zelenog čaja, nane i mnogih drugih biljaka. Mnogi fitogeni aditivi su sertifikovani kao GRAS (Generally Recognized As Safe) od strane Agencije za hranu i lekove (FDA-Food and Drug Administration), među kojima je i ekstrakt izoflavona poreklom iz soje (Steiner i Syed, 2015; Windisch i sar., 2008; Máthé, 2007).

Fitogeni aditivi se proizvode u obliku praha, granula ili u tečnom obliku. Oni koji su u formi čvrstog praha se najčešće inkorporiraju u premikse ili potpune krmne smeše. Poslednjih godina su počele da se koriste metode enkapsulacije (mikro i nanoenkapsulacija) kojima se aktivna supstanca štiti od delovanja visokih temperatura, maskira se jak miris i odlaže otpuštanje u digestivnom traktu.

Tečni oblici fitogenih aditiva su pogodni da se primenjuju u vodi ili zameni za mleko, kao i da se u vidu spreja dodaju hrani koja se hidrotermalno procesira, kao što su pelete ili ekstrudirana hrana (Steiner i Syed, 2015).

Prilikom formulisanja fitogenih aditiva potrebno je odrediti odgovarajuću kombinaciju biljnih materijala. Ovo podrazumeva dobro poznavanje ukusa biljnih jedinjenja i bioloških efekata koje ona mogu imati u organizmu životinja. Smatra se da kombinacija više različitih biljnih komponenti pruža veće mogućnosti, odnosno da dobro formulisan fitogeni aditiv omogućava sinergistički efekat svih jedinjenja, pa se samim tim postiže i bolji efekat u poređenju sa pojedinačnom aktivnom supstancom (Steiner i Syed, 2015).

### **2.3.2.1. Mehanizmi delovanja fitogenih aditiva**

Komercijalni fitogeni aditivi se obično sastoje iz više različitih jedinjenja poreklom iz biljaka zbog kojih mogu da imaju kompleksne mehanizme dejstva na molekularnom nivou. Pored toga što se smatraju dobrom zamenom za antibiotike, derivati biljaka ostvaruju i niz efekata koji se ne vezuju za antibiotsko delovanje. Naime, mikrobiološke analize minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) biljnih ekstrakta začina i trava, kao i čistih aktivnih supstanci, pokazale su da su te koncentracije dosta više od doza koje se uobičajno dodaju u hrani za životinje, što znači da se sveukupna efikasnost fitobiotika samo manjim delom oslanja na antimikrobno dejstvo (Burt, 2004). Mnogi od tih efekata primarno utiču na bolju svarljivost hrane i manju konverziju. Konzumacija hrane dosta zavisi od ukusa i mirisa, naročito kod mladih prasadi, ali i kod drugih vrsta životinja. Životinje imaju različito razvijeno čulo ukusa, tako da su svinje i goveda dosta osetljivije od živine (Ganchrow i Ganchrow, 1987). Biljni sastojci, trave, začini, biljni ekstrakti ili pojedinačne aktivne supstance izrazito utiču na ukus hrane, odnosno menjaju organoleptička svojstva hrane za životinje, pa su neki fitogeni aditivi u Evropskoj uniji klasifikovani kao arome i pojačivači ukusa (Regulation (EC) No 1831/2003). Međutim u većini eksperimenata pokazano je da kod živine fitobiotici pozitivno utiču na koverziju, tako što smanjuju konzumaciju bez promene u prirastu i završnoj telesnoj masi brojlera (Windisch i sar., 2008). Fitogeni aditivi povećavaju sekreciju digestivnih sokova (pljuvačka, žučne kiseline), enzima (lipaze, tripsina i amilaze) i mukusa, imaju lakstativno, spazmolitičko dejstvo i smanjuju flatulaciju, ostvaruju imunomodulatorski efekat, menjaju intestinalnu morfologiju, što sve za posledicu ima veću svarljivost i bolju apsorpciju hranjivih sastojaka, primarno proteina i amino kiselina, pa samim tim i bolje proizvodne rezultate (Amad i sar., 2011). Pozitivni efekat koji ostvaruju na morfologiju tkiva duodenuma, jejunuma i ileuma povećava svarljivost hranljivih materija, dok modifikacija sastava mikrobiote digestivnog trakta (odžavanje eubioze - smanjen broj *Clostridium* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., i favorizovanje rasta *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. i Gram pozitivnih koka) smanjuje nivo

mikrobijalnih metabolita (amonijak, biogeni amini), utiče na imunski sistem i usmerava energiju za rast i razvoj mišića (Mountzouris i sar., 2011). U intenzivnom komercijalnom uzgoju, naročito živine, u strogo kontrolisanim uslovima držanja, regulatorni mehanizmi najčešće budu poremećeni velikim unosom visokoenergetskih hraniva, tako da fitogeni aditivi koji ostvaruju antiinflamatorni efekat na nivou digestivnog trakta mogu biti od velikog značaja (Margioris, 2009).

Pored navedenih efekata, fitogeni aditivi utiču i na razvoj reproduktivnog sistema i kvalitet spermatozoida ptica, na metabolizam holesterola i posledično proizvodnju nutritivno vrednijeg mesa i jaja. Za dosta supstanci poreklom iz biljaka, kao što su fenolni terpeni (ruzmarinska kiselina i rozmarol), monoterpeni (timol i karvakrol), flavonoidi i antocijanini dokazano je da ostvaruju značajan antioksidativni efekat. Fitogeni antioksidansi u hrani za životinje dodaju se da bi se lipidi zaštitili od oksidacije i da bi se delimično smanjila upotreba  $\alpha$  tokoferil acetata i srodnih jedinjenja u hrani za životinje. Međutim pored toga, za fitobiotike je utvrđeno da učestvuju i u aktivaciji NRF2 (nuclear-factor erythroid 2-related factor 2) transkripcionog faktora i indukciji gena odgovornih za ćelijsku odbranu od slobodnih radikala u organizmu životinja. Antioksidativnom efektu se pripisuje i uticaj na oksidativnu stabilnost i održivost mesa i jaja (Steiner i Syed, 2015; Durrani i sar., 2007).

Pored navedenog, biljke i fitojedinjenja mogu imati i štetni uticaj na životinje nakon ingestije, u neke od njih ubrajaju se gastroenteritis, atonija želuca, smanjen viskozitet intestinalnog sadržaja i oštećenje jetre (Durmic i Blache, 2012). Acamovic i Brooker (2005) navode da efekat koji fitoaditivi ostvaruju zavisi u najvećoj meri od hemijskog sastava, koncentracije aditiva u hrani za životinje, obima konzumacije i zdravstvenog statusa životinja.

Da bi se neki fitoaditiv mogao koristiti kao dodatak hrani za životinje neophodno je da se obezbedi detaljan opis biljaka, aktivnih supstanci, mehanizama delovanja na molekularnom nivou, interakcija s mikrobiotom digestivnog trakta, kao i interakcija sa domaćinom. Imajući u vidu raznovrsnost biljaka, uslova gajenja, načina aplikacije i brojne druge faktore, ovakav detaljan opis je gotovo nemoguće odrediti. Međutim, za biljne ekstrakte koji se dosta koriste ili za koje postoji mogućnost široke primene trebalo bi obezbediti informacije koje se tiču efikasnosti i bezbednosti njihove upotrebe kako bi proizvođači mogli da procene i razumeju biološke efekte ovih fitojedinjenja (Steiner i Syed, 2015).

Prema pravilniku Evropske unije komercijalni aditivi moraju da ispunjavaju sledeće uslove: da mogu da se identifikuju, da ostvaruju deklarisanе nutritivne i biološke efekte, da ne intereaguju sa drugim sastojcima u hrani (fitaze, adstrigensi, enzimi koji razlažu neskrobne polisaharide), da su bezbedni za životinje, ljude koji dolaze u kontakt s njima (proizvođači, farmeri, radnici) zbog mogućnosti nastanka iritacije i alergijskog kontaktnog dermatitisa, potrošače koji konzumiraju

hranu animalnog porekla (rezidue), i za životnu sredinu (Regulation (EC) No 1831/2003). Zbog svega navedenog javlja se problem kada se govori o legislativi fitogenih aditiva koji se dovode u vezu sa različitim zdravstvenim izjavama, a naročito fitobiotika koji preko fitohormonalnog mehanizma utiču na metabolizam životinja (Windisch i sar., 2008).

## **2.4. Fitoestrogeni**

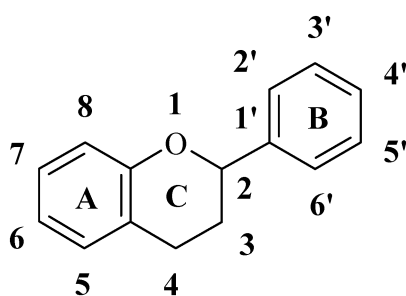
Tokom poslednje decenije veliku pažnju naučne javnosti iz oblasti medicine i proizvodnje funkcionalne hrane zaokupila je praktična primena bioaktivnih supstanci poreklom iz biljaka. Kao odgovor na različite stresore okoline, kao što su mikrobijalna infekcija, insekti/životinjski predatori, ultravioletno zračenje, niska temperatura, nedostatak vode i hranljivih sastojaka, biljke sintetišu puno različitih jedinjenja (sekundarna biljna jedinjenja) kojima se otpornost biljaka povećava. Acamovic i Brooker (2005) navode da se procenjuje da biljke proizvode oko 5100 različitih sekundarnih jedinjenja. Ova jedinjenja se na osnovu hemijske strukture i biosintetskog puta mogu klasifikovati u tri velike grupe: terpenoidi, alkaloidi i fenolna jedinjenja (Irina i Mohamed, 2012). Od navedenih, u biljkama su najviše zastupljeni polifenoli kojih može biti i do nekoliko grama po kilogramu tkiva biljke. Među njima od naročitog interesa za zdravlje ljudi su jedinjenja poznata kao fitoestrogeni, koji obuhvataju nekoliko grupa nesteroidnih estrogena široko zastupljenih u različitim biljkama. Termin fitoestrogen se u literaturi prvi put pojavljuje kasnih osamdesetih godina 20. veka. Naziv ove klase sekundarnih metabolita biljaka potiče od grčke reči “phyto”, što znači biljka, i “estrogen” koja se odnosi na hormon koji reguliše plodnost kod sisara ženskog pola. Još četrdesetih godina dvadesetog veka je zapažena pojava privremene do trajne neplodnosti nazvane “bolest deteline” kod australijskih ovaca koje su gajene na pašnjacima (Urpi-Sarda i sar., 2008), dok su kasnije Davis i Hill (1989) potvrdili da se problemi sa reprodukcijom ovaca dovode u vezu sa sadržajem fitoestrogena formononetina u crvenoj detelini. Fitoestrogeni su u većim količinama zastupljeni u semenkama, voću i povrću i njihova količina u ovim biljkama zavisi od brojnih faktora kao što u vrsta biljke, podneblje i zemljište, sezona setve (sadnje) i žetve (branja), i mnogih drugih faktora vezanih za rast biljaka (Salgado i Donado-Pestana, 2011). Ova jedinjenja su strukturno slična estrogenu i ostvaruju efekte slične estrogenu u organizmu sisara. Naime, oni mogu da se ponašaju kao agonisti estrogenih receptora (ER), čime ostvaruju sinergistički efekat sa endogenim estrogenom, ili kao antagonisti ER, blokirajući ih i menjajući njihovo funkcionisanje čime smanjuju estrogene efekte (Ganai i Farooqi, 2015). Zbog ove relativne estrogene potencije, neki od najviše proučavanih fitoestrogena, kao što su genistein, daidzein i drugi nesojini fitoestrogeni, označavaju se selektivnim estrogen receptor modulatorima (Selective Estrogen Receptor Modulators - SERMs) (Sirotkin i Harrath, 2014). Da li će ostvariti estrogene ili antiestrogene efekte zavisi od doze, koncentracije endogenog estrogena u cirkulaciji i target tkiva (Barnes, 2004).

Postoji niz studija koje pokazuju da konzumacija biljaka bogatih fitoestrogenima može poslužiti kao dodatno sredstvo u prevenciji i lečenju različitih poremećaja i bolesti vezanih za proces starenja, mentalne funkcije, metabolizam, maligne transformacije, kardiovaskularna oboljenja i reprodukciju – rak grudi i prostate, simptomi menopauze, osteoporozna, ateroskleroza, šlog i neurodegeneracija (Sirotkin i Harrath, 2014; Cassidy, 2003). Svi ovi efekti se objašnjavaju kompleksnim mehanizmima na nivou ćelija. Molekularni mehanizmi dejstva fitoestrogena zasnivaju se na inicijaciji transkripcije klasičnom interakcijom nuklearnih estrogenih receptora (ER) sa elementima estrogenog odgovora (estrogen response elements - EREs) i na negenomskom efektu koji se ostvaruje preko ER u ćelijskoj membrani ili citoplazmi. Negenomski efekti uključuju brze celularne odgovore kao što su oslobađanje azot oksida, fluks kalcijuma, i/ili aktivacija različitih signalnih puteva poput AMP-aktivirane proteinske kinaze, mitogenom-aktivirane proteinske kinaze i fosfatidil inozitol-3 kinaze (PI3K) (Ropero i sar., 2006). Pored toga što je za fitoestrogene, a naročito grupu izoflavona, pokazano da su inhibitori tirozin kinaze i da imaju antioksidativni efekat, oni se ponašaju i kao ligandi peroksizom proliferator aktiviranog receptora  $\gamma$  (PPAR-  $\gamma$ ) (Cederroth i sar., 2012). Fitoestrogeni takođe utiču i na biosintezu steroidnih hormona (nivo slobodnih steroidnih hormona i androgen-estrogen balans) regulišući aktivnost aromataze, 5- $\alpha$ -reduktaze, i nivoa hormon vezujućih globulina za testosteron i 17 $\beta$ -estradiol (Cederroth i sar., 2012; Déchaud i sar., 1999). Posreduju u aktivaciji serotonergičkih receptora, IGF-1 receptora, utiču na metilaciju DNK molekula, aktivnost DNK topoizomeraze, transkripcioni faktor NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$ B), modifikaciju histona, ekspresiju RNK i ostale intracelularne regulatore ćelijskog ciklusa i apoptoze. Svi prethodno navedeni mehanizmi se smatraju odgovornim za antioksidativne, antiproliferativne, antimutagene i antiangiogene efekte fitoestrogena i posledično njihov pozitivan uticaj na zdravlje i dugovečnost ljudi (Sirotkin i Harrath, 2014).

Prema hemijskoj strukturi i obrascu biosinteze fitoestrogeni se mogu podeliti na halkone, flavonoide, lignane, stilbenoide i ostale klase (Sirotkin i Harrath, 2014).

### 2.4.1. Flavonoidi

Flavonoidi pripadaju velikoj grupi fenolnih jedinjenja poreklom iz biljaka, koji pored značajnih organoleptičkih i tehnoloških svojstava, zbog kojih imaju široku primenu u različitim granama industrije, imaju i potencijal da pozitivno utiču na zdravlje ljudi ostvarujući antioksidativne, antiinflamatorne, antialergijske, antivirusne, antikancerogene, terapijske i citotoksične efekte (Brodowska, 2017). U žvinaarskoj proizvodnji su se pokazali izuzetno efikasnim s aspekta poboljšanja proizvodnih performansi, zbog čega je i broj publikacija iz ove oblasti naglo povećan od 2000. godine (Wallace i sar., 2010). Predstavljaju derivate 2-fenil-benzo- $\gamma$ -pirona. Atomi ugljenika u flavonoidu udruženi su u dva benzenska prstena (A i B) povezana pirenkim prstenom (C) koji sadrži kiseonik. Na taj način formiran je ugljenični skelet koji je zajednički za sve flavanske sisteme (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (Slika 2.1.).



Slika 2.1. Osnovna struktura skeleta flavonoidnih aglikona (2-fenil-benzo- $\gamma$ -piron)

Na osnovu razlika u hemijskoj strukturi flavonoidi se klasifikuju u flavanole, flavanone, flavonole, izoflavonoide, flavone i antocijanine. U ostala flavonoidna jedinjenja ubrajaju se biflavonoidi (ginkgetin), prenilflavonoidi, flavonolignani (silibinin), glikozidni estri flavonoida i proantocijanini (Symonowicz i Kolanek, 2012). Flavanoli su kompleksna grupa polifenola u koju spadaju katehini i tanini. Nalaze se u voću (bobičasto voće) i povrću (seme, kora), čajevima, crvenom vinu, kakaou i cerealijama. Antocijanini (cijanidin, pelargonidin, delphinidin, malvidin, petunidin, peonidin) su prirodni pigmenti odgovorni za plavu, crvenu, ljubičastu i narandžastu boju voća i povrća (Pascual-Teresa i sar., 2010). Flavanoni su dosta zastupljeni u različitim delovima biljaka (koren, seme, stabljika, list, cvet, plod, rizom), a najznačajniji su hesperetin (zastupljen u limunu, pomorandži, limeti, tandželou) i naringenin (grejpfrut, gorka pomorandža i paradajz). Flavonoli su najviše istražena grupa flavonoidnih jedinjenja koja se mogu naći u grožđu, jabukama, paradajzu, luku, brokoliju, crveno zelenoj salati, crnom i zelenom čaju i crvenom vinu. Najznačajniji flavonoli su kvercetin, kempferol i miricetin. Flavoni su strukturno dosta slični flavonolnim jedinjenjima, u njih spadaju apigenin (kamilica, pšenične klice, čaj, peršun) i luteolin (brokoli, šargarepa, celer, luk, kupus, paprika) (Brodowska, 2017).



#### 2.4.1.1. Izoflavoni

Izoflavonoidi kao podgrupa flavonoida obuhvata izoflavone, izoflavanone, pterokarpane i kumestane. Izoflavoni se nalaze u leguminozama, uglavnom soji, dok se kumestani mogu naći u detelini, lucerki i sojinim klicama (Sirotkin i Harrath, 2014). Izoflavoni strukturno dosta variraju, kako po broju i kompleksnosti supstituenata na 3-fenil-hromonu, tako i po različitom stepenu oksidacije i prisustvu dodatnih heterocikličnih prstenova. Broj poznatih glikozida izoflavona je mali u poređenju sa brojem poznatih glikozida flavonoida, i većinom se radi o *O*-glikozidima, mada je otkriven i značajan broj i *C*-glikozida. U najrasprostranjenije izoflavone spadaju daidzein, genistein i glicitein, dok su u prirodi nešto manje prisutni formononetin, biohanin A, prunetin, pratensein, kalikozin i pseudobaptigenin (Rossi i sar., 2010). Približan odnos genistein:daidzein:glicitein u soji je 1,3:1,0:0,2 (Stevenson, 2012).

Mnogi izoflavoni pokazuju niz antimikrobnih aktivnosti, pa se smatra da pomažu biljkama u borbi protiv oboljenja izazvanih mikroorganizmima. Utvrđeno je da koncentracija izoflavona u biljkama dosta varira u zavisnosti od stresogenih agenasa, virusnih, bakterijskih i gljivičnih infekcija, kao i napada herbivora. Tako je npr. viši sadržaj izoflavona u soji udružen sa prisustvom infekcije izazvane plesnima *Phytophthora megasperma* (Stevenson, 2012; Graham i sar., 1990). Antimikrobni izoflavoni se mogu klasifikovati kao fitoaleksini (*de novo* sintetisane antimikrobne supstance u oblastima patogene infekcije biljke) i fitoanticipini (antimikrobne supstance već prisutne u biljkama). Izoflavon genistein npr. može da ima funkciju i fitoanticipina i fitoaleksina (Dixon i Ferreira, 2002).

#### 2.4.1.2. Uticaj različitih procesa prerade na sadržaj i konverziju izoflavona u proizvodima na bazi soje

Soja je najveći izvor izoflavona u ishrani ljudi i životinja. Većina flavonoida se u biljkama nalaze u formi glikozidnih konjugata lokalizovanih u ćelijskim vakuolama, od kojih su u soji najviše prisutni malonilglikozidi. Coward i sar. (1998) su pokazali da koncentracija glikozida, acetilglikozida i aglikone forme izoflavona ima tendenciju rasta tokom ekstrakcije, prerade i kuvanja. Različite metode koje se koriste u preradi hrane (termička obrada, enzimaska hidroliza i fermentacija) značajno mogu da utiču na promenu zastupljenosti različitih izomera izoflavona u hrani. Tako npr., količina malonil formi, koje su termoosetljive, razlikovaće se u sirovoj i termički obrađenoj soji (Kurzer i Xu, 1997).

Od svih navedenih izoflavona u soji je dominantno prisutan malonilgenistin koji se nakon sušenja konvertuje u acetilgenistin, a nakon ekstrakcije u toploj vodi u genistin, i smatra se da je za konverziju i degradaciju pogodnija vlažna toplota od suve (Chien i sar., 2005). Acetilglikozidi

tokom termičke obrade nastaju cepanjem karboksilne grupe malonilglikozida (Villares i sar., 2011). Aglikoni su stabilniji od  $\beta$ -glikozida pri izlaganju suvoj toploti ispod 200 °C (Yue i sar., 2010). Prilikom pečenja raste sadržaj aglikona i  $\beta$ -glikozida, a sadržaj malonilglikozida opada, dok prilikom pečenja na temperaturi od 160 do 200 °C u trajanju između 5 i 15 minuta ne dolazi do formiranja acetilglikozida (Lee i sar., 2013). Andrade i sar. (2016) su termičkom obradom sojinog brašna na temperaturi do 200 °C tokom 20 minuta utvrdili 2,5 puta manji sadržaj malonilglikozida, 1,2 puta viši sadržaj  $\beta$ -glikozida i 3,5 puta viši sadržaj aglikona. U fermentisanim proizvodima od soje temperatura i sadržaj vlage imaju bitnu ulogu u zastupljenosti različitih formi i ukupnoj količini izoflavona (Lee i Lee, 2009).

Prilikom proizvodnje sojinog mleka u prahu termički tretman smanjuje koncentraciju malonilglikozida, a povećava koncentraciju glikozida i acetilglikozida u ovom proizvodu (Song i sar., 1998). Procesom ekstrakcije masti (ulja) iz soje uklanjaju se izoflavoni, što znači da niskomasni proizvodi od soje imaju niži sadržaj izoflavona, odnosno glikozida izoflavona koji su prisutni u sirovoj soji (Stevenson, 2012). Proces prerade soje za pripremu sojine sačme koja se koristi u ishrani životinja minimalno menja sadržaj izoflavona u poređenju sa sirovom sojom, dok alkoholna ekstrakcija smanjuje sadržaj izoflavona u proteinu soje (Stevenson, 2012) (Tabela 2.1.).

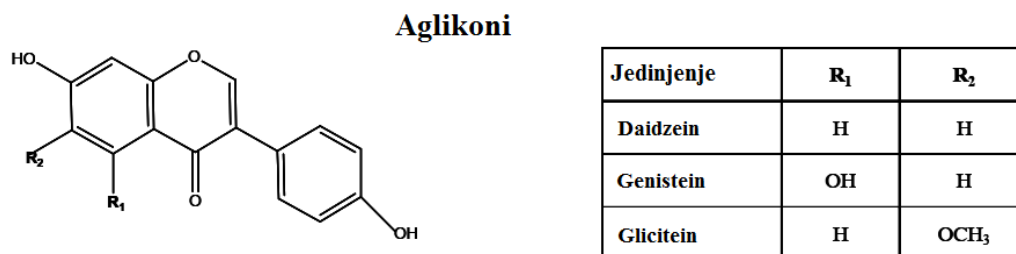
Tabela 2.1. Sadržaj izoflavona u proizvodima na bazi soje, (USDA, 2008).

	Daidzein mg/100 g	Genistein mg/100 g	Glicitein mg/100 g	Ukupno mg/100 g
Sojina sačma sa niskim sadržajem masti	80,8	114,7	16,1	209,6
Sojino brašno, punomasno	72,9	98,8	16,1	178,1
Izolat proteina soje	30,8	57,3	8,5	91,1
Koncentrovan sojin protein, vodeni ekstrakt	38,3	52,8	4,9	94,7
Koncentrovan sojin protein, alkoholni ekstrakt	5,8	5,3	1,6	11,5
Sojin jogurt	13,8	16,6	2,8	33,2
Formula za odojčad na bazi soje	7,2	14,8	3,0	25,0
Sojino mleko	2,8	5,1	nd	7,9
Sirovo sojino zrno	20,4	22,6	7,6	49,0
Sojine klice, prokuvane	5,0	6,7	0,8	12,5
Natto	33,2	37,7	10,6	82,3
Tempeh	22,7	36,2	3,8	60,6
Miso	16,4	23,2	3,0	41,5
Tofu	12,8	16,2	2,4	31,4
Miso supa	0,8	0,7	0,0	1,5
Soja sos	0,8	0,4	0,1	1,2

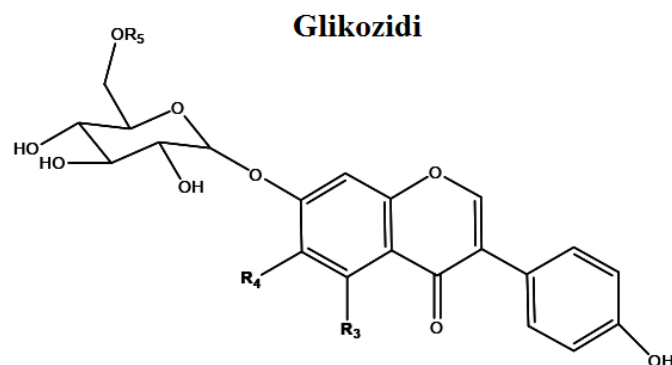
\* nd- nije detektovano

### 2.4.1.3. Biološka raspoloživost izoflavona

Bioraspoloživost i biološka aktivnost izoflavona najviše su određeni formom ovih jedinjenja. U hrani, naročito proizvodima na bazi soje, izoflavoni u obliku aglikona (npr. daidzein, genistein i glicitein) su generalno manje zastupljeni od njihovih glikokonjugata (7-*O*-glikozidi), 6'-*O*-acetilglikozida i 6'-*O*-malonilglikozida (Rossi i sar., 2010) (Slika 2.2. i 2.3.).



Slika 2.2. Aglikoni izoflavona poreklom iz soje (Vargas Galdos, 2009)



Jedinjenje	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Daidzin	H	H	H
Genistin	OH	H	H
Glicitin	H	OCH <sub>3</sub>	H
6'-O-acetildaidzin	H	H	COCH <sub>3</sub>
6'-O-acetilgenistin	OH	H	COCH <sub>3</sub>
6'-O-acetilglicitin	H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>
6'-O-malonildaidzin	H	H	COCH <sub>2</sub> COOH
6'-O-malonilgenistin	OH	H	COCH <sub>2</sub> COOH
6'-O-malonilglicitin	H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> COOH

Slika 2.3. Glikozidi izoflavona poreklom iz soje (Vargas Galdos, 2009)

Malonil glikozidi daidzeina i genisteina u soji su labilni i brzo se nakon termičke obrade razgrađuju do neacetilovanih glikozida. Nakon hidrolizacije, aglikone forme mogu biti apsorbirane u gornjim delovima tankih creva pasivnom difuzijom, dok glikozidi se slabo ili ne apsorbuju zbog velike molekulske mase i hidrofilnosti (Izumi i sar., 2000). U tankom crevu glikozidi izoflavona se efikasno razlažu pod dejstvom enzima crevnih resica laktaza-florizin hidrolaze. Kod ljudi nivo izoflavona u krvnoj plazmi brže raste nakon oralne administracije aglikona nego glikozidnih formi, pa se može zaključiti da se daidzein i genistein brzo apsorbuju i transportuju kroz intestinalni epitel (Steensma i sar., 1999). Jedinjenja koja se ne apsorbuju u tankom crevu dospevaju do kolona gde podležu ekstenzivnoj biotransformaciji od strane mikrobiote. Bakterijska transformacija može da dovede do inaktivacije i/ili degradacije ili stvaranja jedinjenja koja imaju veću biološku aktivnost i bioraspoloživost (npr. daidzein u S-ekvol). Nakon apsorpcije, ova jedinjenja se konjuguju u crevima, a zatim i u jetri procesima metilacije, sulfacije i  $\beta$ -glukuronidacije, a mogu se sekretovati u duodenum kao hidrofilni konjugati žučnih kiselina. Tako da je mikrobiota uključena u entero-hepato-enterično cirkulisanje izoflavona. Naime, mikrobijalni enzimi, naročito  $\beta$ -glukuronidaza dekonjuguje ekskretovane izoflavone u kolonu gde se oni reapsorbuju čime se produžava njihovo

prisustvo u organizmu (Manach i sar., 2004). Gu i sar. (2006) su pokazali da su u krvnoj plazmi ljudi izoflavoni primarno prisutni u formi glukuronida (75%), zatim sulfata (24%) i aglikona (1%).

Ekvol je najviše proučavan metabolit koga stvaraju bakterije kolona kod osoba koje konzumiraju soju sa visokim sadržajem izoflavona. Samo 30% zapadne populacije u kolonu ima bakterije koje konvertuju daidzein u ekvol i oni se nazivaju “proizvođači ekvola”, dok je taj procenat dosta viši među azijskom populacijom ljudi (60%). Ove osobe imaju prednost u odnosu na “neproizvođače” koji daidzein konvertuju u *O*-desmetilangolensin (*O*-DMA), jedinjenje sa slabijom estrogenom aktivnošću. Koncentracija ekvola u serumu ljudi koji ne proizvode ekvol je  $\leq 40$  nmol/l, što je dosta niže od onih koji tu sposobnost imaju ( $\geq 83$  nmol/l) (Rafii, 2015).

Poznato je da su koncentracije različitih izoflavona u plazmi muškaraca u Japanu od 7 do 110 puta više nego kod muškaraca u Finskoj, zbog čega se nizak mortalitet od raka prostate u Japanu, ali i uopšteno, manji rizik od nastanka raka drugih organa npr. kolona i dojke, dovodi u vezu sa visokim unosom proizvoda od soje (Messina i sar., 1994). Kod muškaraca u Japanu utvrđeno je da je nivo genisteina i daidzeina u plazmi oko 493 i 283 nM, pojedinačno, dok kod muškaraca u Velikoj Britaniji i osoba koje ne konzumiraju soju oko 33 i 18 nmol. Kod odojčadi koja konzumiraju zamenu za mleko na bazi soje nivo genisteina i daidzeina može da poraste i do 1640 i 1160 nmol, pojedinačno (Cederroth i sar., 2012; Setchell i sar., 1997). Dnevni unos soje se kreće od 7-8 g u Hong Kongu i Kini, do 20-30 g kod ljudi u Koreji i Japanu. Većina evropske i severnoameričke populacije konzumira manje od 1 g soje/dan (Nagata i sar., 2000). Nivo unetih izoflavona se može odrediti urinarnom ekskrecijom, tako da kod ljudi koji u ishrani imaju dosta zastupljenu soju nivo ekvola u urinu može biti oko 100 puta viši od ljudi koji u malim količinama konzumiraju soju (Dixon i Ferreira, 2002). Azijska populacija (Japan, Tajvan, Koreja) konzumira od 20-150 mg izoflavona na dan. Na osnovu saznanja o nivou unosa i urinarne ekskrecije daidzeina, genisteina i ekvola kod Japanaca u poređenju sa Amerikancima i Evropljanima, izoflavoni u proizvodima od soje se opravdano dovode u vezu sa smanjenim rizikom od nastanka raka. Naime, pretpostavlja se da dnevni unos od 45 mg izoflavona može da izazove promene u menstrualnom ciklusu i smanji rizik od nastanka raka dojke (Dixon i Ferreira, 2002). Deficit estrogena kod žena u postmenopauzi dovodi do pojave niza simptoma kao što su valunzi, suva vagina, i razvoja osteoporoze i povećanog rizika od nastanka kardiovaskularnih oboljenja. Rezultati epidemioloških studija pokazuju da visok unos izoflavona i/ili flavonola doprinosi manjoj incidenci oboljenja srca kod žena u Japanu (Merz-Demlow i sar., 2000). Tako da izoflavoni, odnosno alternativa terapiji zamene estrogena, značajno mogu ublažiti i sprečiti nastanak ovih poremećaja, a dodatno je pokazano da utiču i na poboljšanje epizotične i semantične dugoročne memorije kako kod starijih, tako i kod mlađih žena i muškaraca (Dixon i Ferreira, 2002).

#### **2.4.1.4. Primena izoflavona u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji**

Izoflavoni se koriste kao aktivne supstance u proizvodnji farmaceutskih proizvoda i preparata za negu kože (Nemitz i sar., 2016). Aglikonske forme izoflavona, za razliku od konjugovanih, imaju veliku sposobnost apsorpcije, kako u digestivnom traktu, tako i preko kože, pa se zbog toga one i najviše koriste u formulisanju različitih komercijalnih preparata. Ova jedinjenja se mogu dobiti hemijskom sintezom ili ekstrakcijom iz biljnih materijala. Pošto su u soji većinom prisutne konjugovane forme izoflavona, sojini aglikoni se najčešće dobijaju ekstrakcijom za kojom sledi hidroliza i prečišćavanje (Nemitz i sar., 2015).

Postoji velika potreba za proizvodima koji sadrže izoflavone, naročito od strane žena u menopauzi. Dosta takvih proizvoda koji su obogaćeni izoflavonima poreklom iz soje ili crvene deteline mogu se kao komercijalni preparati naći na tržištu, od kojih sojini ekstrakti se označavaju kao suplementi i “dodaci ishrani za specifične zdravstvene potrebe”, dok su ekstrakti crvene deteline označeni kao suplementi. Ovi preparati se najčešće mogu kupovati bez recepta, a dostupni su u apotekama, supermarketima i na internetu. Preporučene doze dosta variraju u zavisnosti od proizvođača, a generalno se kreću između 20 i 80 mg dnevno (Eisenbrand, 2007). Problem koji se javlja u formulisanju ovakvih preparata i hrane obogaćene izoflavonima je karakterističan gorak i adstringentan ukus aglikona. Kako bi se prevazišli ovi problemi koji mogu dosta da utiču na senzorska svojstva, pre svega hrane i napitaka, razvijeni su različiti tehnološki procesi kojima se aglikoni inkorporiraju u hidrofилne sisteme i kojima se maskira njihov nepoželjni ukus, a uključuju: lipozomske nosače, mikro/nanostrukture i komplekse sa ciklodekstrinima (Nemitz i sar., 2016; Nemitz i sar., 2015).

Kozmetički preparati koji sadrže izoflavone se na tržištu reklamiraju kao “anti-age” proizvodi koji zbog estrogene aktivnosti povoljno utiču na kožu, naime smanjuju bore, suvoću kože, sebum i iritaciju osetljive kože, a povećavaju elasticitet i imaju antiperspirantni efekat (Nemitz i sar., 2016; Kapuscinska i Nowak, 2015).

Za period od 20 godina (1994.-2014. godine) zaštićeno je 705 izoflavonskih patenata koji se mogu podeliti u tri grupe: 1) procesi za dobijanje frakcija bogatih izoflavonima iz biljnih materijala, 2) upotreba izoflavona u kozmetičkim proizvodima i 3) inkorporacija izoflavona u mikro i nanostrukturne sisteme kako bi se maskirao nepoželjni ukus i povećala hidrosolubilnost bioaktivnih supstanci (Nemitz i sar., 2016). Najveći deo ovih patenata čine tehnološki procesi, a zemlje koje su najviše ovakvih patenata zaštitile uključuju Kinu sa 132 patenta, SAD sa 63, Koreju sa 44 i Japan sa 28 patenata. Zemlje koje su zaštitile najviše patenata iz oblasti kozmetike su Francuska sa 8, Nemačka sa 7, Kina i Koreja sa po 5 patenata. U oblasti nanotehnologije najviše patenata su

zaštitile Kina, Japan i Koreja sa 10, 4 i 4 patenta, pojedinačno (Nemitz i sar., 2016). Najveći broj navedenih patenata odnosio se na genistein, što se dovodi u vezu sa nizom naučnih i kliničkih studija u kojima su dokazani različiti pozitivni efekti koje ova bioaktivna supstanca ostvaruje na organizam ljudi i životinja.

#### **2.4.1.5. Uticaj izoflavona na biološke parametre životinja**

Uticaj izoflavona na različite biološke parametre životinja zavisi od više kompleksnih mehanizama, zbog čega su u brojnim studijama dobijeni rezultati koji su dosta varijabilni. Dva najvažnija faktora koja određuju biološke efekte izoflavonskih jedinjenja u organizmu su doza i dužina trajanja tretmana. Takođe, veliki uticaj imaju i starosna dob kada se ova jedinjenja aplikuju, kao i nivo endogenih estrogena u organizmu životinja (Setchell i Cassidy, 1999). Pokazano da su bolji rezultati ostvareni kod životinja muškog pola, zbog čega se često pol razmatra kao značajan faktor prilikom osmišljavanja eksperimenata vezanih za izoflavone. Takođe, kod obolelih životinja su se pokazali dosta efikasniji nego kod zdravih životinja. Može se zaključiti da mera u kojoj će izoflavoni prevashodno uticati na rast i proizvodne rezultate životinja dosta zavisi od različitih stresogenih faktora sredine i da se bolji efekti ostvaruju u uslovima proizvodnje koji su lošiji i slabo kontrolisani (Zhengkang i sar., 2006).

Wallace i sar. (2010) navode da su flavonoidi grupa fitojedinjenja koja najpovoljnije deluju na proizvodne rezultate u živinarskoj proizvodnji. Pokazano je da dodavanje flavonoida (rutin, hesperidin, kvercetin i naringenin) u količini od 300 mg/kg u kombinaciji sa mananoligosaharidima značajno poboljšava konverziju hrane kod brojlera nakon 42 dana tova. Takođe, oksidacija mesa nakon skladištenja hlađenjem i zamrzavanjem značajno je bila odložena zahvaljujući antioksidativnom efektu dodatih flavonoida (Batista i sar., 2007). U mnogim studijama je pokazano da izoflavoni mogu da ostvaruju anabolički efekat na metabolizam i performanse životinja, da utiču na neuroendokrini sistem i mikrobiotu digestivnog trakta životinja (Zhengkang i sar., 2006). Ekstrakti bogati izoflavonima značajno povećavaju nivo testosterona u serumu piladi muškog pola, a smanjuju nivo mokraćne kiseline i deponovanje abdominalne masti. Suplementacija daidzeinom u količini od 3 mg/kg/dnevno povećava nosivost, prosečnu masu i nivo holesterola u jajima koka nosilja i pataka (Wang i sar., 1994). Jedinjenja izoflavona utiču na aktivnost i metabolizam bakterija u rumenu tako što povećavaju nivo testosterona, kako u rumenu, tako i u krvi preživara. Takođe, mogu i da menjaju mikrobijalni sastav u digestivnom traktu. U *in vitro* ispitivanjima pokazano je da 50 ml daidzeina po litri intestinalnog sadržaja iz različitih delova digestivnog trakta prasadi značajno povećava broj *Lactobacillus* spp., na osnovu čega se smatra da daidzein ima potencijal da se koristi kao prebiotik u hrani za životinje (Zhengkang i sar., 2006). Mehanizmi kojima formononetin i daidzein pozitivno utiču na razvoj mlečne žlezde i laktaciju podrazumevaju

sposobnost kompetitivnog vezivanja za receptore estradiola i progesterona u citosolu ćelija mlečne žlezde, a posledično i stimulaciju sekrecije hormona rasta i prolaktina od strane hipofize (Zhang i sar., 1995). Jedinjenja izoflavona zbog svog efekta na nespecifični imunitet, humoralni i celularni imunski odgovor ubrajaju se u imunomodulatore poreklom iz biljaka (Zhengkang i sar., 2006). Zhang i sar. (1995) imunoregulatorne efekte daidzeina kod krmača i prasadi dovode u vezu sa smanjenim nivoom somatostatina i povećanim nivoom hormona rasta i prolaktina u serumu i kolostrumu. Gao i sar. (2000) su kod brojlera kojima je u hrani bio dodat daidzein utvrdili veću relativnu masu timusa i burze, kao i veću transformaciju T limfocita. Od svih izoflavona daidzein je najviše ispitivana supstanca koja se u Kini koristi kao aditiv u hrani za životinje (Zhengkang i sar., 2006).

Nedoslednost u rezultatima ispitivanja izoflavona dovodi se u vezu sa nestandardizovanim eksperimentima koji su izvođeni na različitim životinjskim vrstama, razlikama u sastavu hraniva, formulacijama aditiva (sojin protein, izoflavoni, čiste supstance-hesperidin, daidzein, genistein), dozama, načinom aplikacije (putem hrane, injekciono, oralni gavaž), sa dužinom i vremenom ekspoziture, različitim metabolizmom izoflavona kod različitih životinja, različitim analizama kojima se utvrđuju efekti i mehanizmi dejstva koji najviše utiču na reproduktivne i endokrine funkcije (Kamboh i sar., 2019; Wallace i sar., 2010). Stoga i dalje postoji potreba za jednim sistematskim pristupom, naročito u živinarskoj proizvodnji, kojim bi se detaljno objasnila efikasnost i mehanizmi dejstva pojedinačnih aktivnih supstanci u različitim dozama kod nosilja i brojlera, kao i njihove moguće interakcije sa drugim sastojcima hrane.

## **2.5. Genistein**

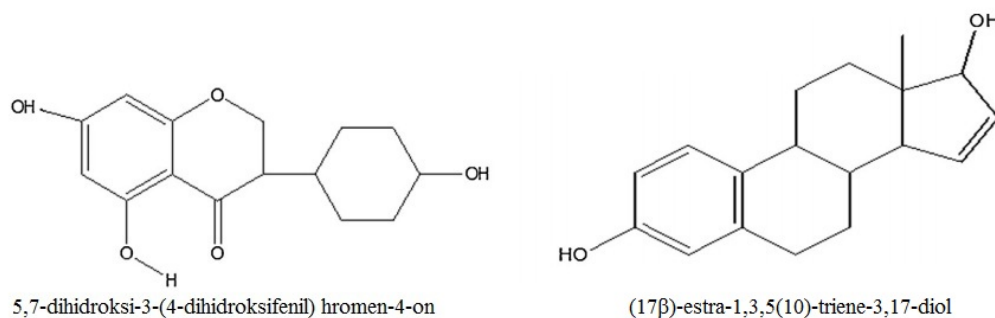
Genistein je jedan od najvažnijih sojinih izoflavona poslednjih godina poznat po različitim biološkim i terapijskim svojstvima. U početku se nije smatrao jedinjenjem od interesa zato što su mu pripisivani samo estrogenski efekti i neki neželjeni efekti kod određenih životinjskih vrsta. Međutim sa napretkom u istraživanjima, genistein se sada dovodi u vezu sa različitim farmakološkim mehanizmima koji pozitivno utiču na zdravlje ljudi i životinja (Weng i sar., 2019; Ganai i Farooqi, 2015).

Genistein se u biljkama sintetise preko fenilpropanoid puta koji počinje sa aminokiselinom fenilalaninom iz koje se dobija intermedijarno jedinjenje naringenin. Naringenin se u leguminozama konvertuje u genistein uz pomoć dva enzima izoflavon sintaze i dehidrataze koji su specifični samo za ovu familiju biljaka (Stevenson, 2012). Genistein je prvi put izolovan 1899. godine iz biljke žutilice (dyer's greenweed), čiji latinski naziv je *Genista tinctoria*, tako da hemijski naziv genisteina potiče od generičkog imena. Struktura jedinjenja je određena 1926. godine, kad je



utvrđeno da je identična sa prunetolom. Prvi put genistein je hemijski sintetisan 1928. godine (Ganai i Farooqi, 2015). Genistein po IUPAC nomenklaturi ima naziv 4',5,7-trihidroksiizoflavon i spada u aglikone izoflavona (Ganai i Farooqi, 2015). Sastoji od ugljeničnog skeleta sa 15 C atoma, 10 vodoničnih i 5 kiseoničnih atoma, tako da je njegova molekulska formula  $C_{15}H_{10}O_5$  sa molarnom masom od 270,2369 g/mol. U obliku je beličastog praha, osetljiv na svetlost, sa temperaturom topljenja od 297-298 °C, nerastvorljiv je u vodi i rastvorljiv u polarnim rastvaračima kao što su etanol, aceton i dimetilsulfoksid (DMSO) (Weng i sar., 2019; Ganai i Farooqi, 2015). Genistein je gorkog ukusa, što dosta smanjuje njegovu palatabilnost i otežava inkorporaciju u hrani (Weng i sar., 2019).

Difenolna struktura genisteina stereochemijski liči na endogeni estrogen (17 $\beta$ -estradiol). Slična udaljenost OH grupa na suprotnim stranama molekula genisteina i estrogena (4'- i 7- hidroksilne grupe) pruža mogućnost genisteinu da se vezuje i za ER $\alpha$  i ER $\beta$ , ali sa različitim afinitetom prema ovim receptorima (Slika 2.4.) (Barnes i sar., 2000). Brojni testovi su pokazali da je genistein 7 do 48 puta selektivniji prema ER $\beta$  nego prema ER $\alpha$ , odnosno da je relativna estrogena aktivnost genisteina preko ER $\beta$  približno 30 puta veća nego preko ER $\alpha$  (Patisaul i Jefferson, 2010). Estrogeni receptori  $\alpha$  su promotori ćelijske proliferacije, dok ER $\beta$  uglavnom promotori ćelijske apoptoze (Rietjens i sar., 2013). Akiyama i sar. (1987) su pokazali da genistein samo u višim dozama (1 mg/kg) se ponaša kao inhibitor tirozin kinaze, dok estrogenne efekte ispoljava u nižim dozama. Genistein može da se vezuje i za vezujući protein steroidnih hormona utičući na klirens androgenih i estrogenih hormona i na njihovu raspoloživost (Dixon i Ferreira, 2002). Iako su estrogeni receptori slični po strukturi, sposobnost jedinjenja (prirodnog ili sintetskog) da se veže za određeni ER može da zavisi od vrste životinje. Tako npr. estrogeni receptori svinja imaju mnogo veći afinitet prema estrogenom mikotoksinu zearalenolu u poređenju sa ER živine (Harris, 2002). Kod brojlera genistein i njegovi metaboliti funkcionišu kao delimični agonisti estrogenih receptora stimulacijom ekspresije e-RmRNASF (Estrogen-Regulated mRNA Stabilizing Factor). Funkciju parcijalnog agoniste kod brojlera genistein ima zbog manje efikasnosti u poređenju sa estrogenom, međutim u određenim dozama može potpuno da blokira aktivnost estrogena (Ratna, 2002).



Slika 2.4. Sličnost u hemijskoj strukturi genisteina i estrogena (Ganai i Farooqi, 2015).

Genistein je biosintetski najjednostavnije jedinjenje izoflavona dosta zastupljeno u leguminozama. U hrani se genistein većinom nalazi u formi biološki aktivnog glikozida genistina. Sadržaj genisteina u većini hrane na bazi soje u opsegu su od 0,2-1 mg/g i to u različitim oblicima glikozidnih konjugata (Fukutake i sar., 1996). Fermentacijom ili digestijom hrane bogate genistinom oslobađa se molekul šećera iz glikozidne forme izoflavona i dobija se aglikon genistein. Pokazano je da soja, leguminoza sa visokim sadržajem proteina, ima najviši sadržaj genisteina. Nešto niži sadržaj genisteina utvrđen je u drugim leguminozama, kao što su npr. leblebije. Količine genisteina u različitim vrstama hrane na bazi soje, kao što su formule za odojčad na bazi soje, tofu, sojino mleko, sojino brašno, izolat proteina soje, tempeh i miso, dosta variraju (Tabela 2.2.) (Ganai i Farooqi, 2015). Viši sadržaj genisteina i genistina u npr. “soy nuts” nego u soji se objašnjava time što su to zrna soje koja su kasnije ubrana i osušena, odnosno smatra se da sadržaj ovih izoflavona zavisi od sadržaja vode i vremena branja sojinog zrna. Takođe, proces proizvodnje, filtracija i izdvajanje masti, smanjuje sadržaj genisteina u proizvodima kao što su sojino mleko, tofu i soja sos, dok u fermentisanim proizvodima od soje (miso, natto) mikrobijalnom fermentacijom se povećava sadržaj nekonjugovane forme genisteina, a smanjuje sadržaj genistina (Fukutake i sar., 1996). Sojino brašno sadrži 53% sojinog proteina, a jedan gram sojinog proteina sadrži oko 250  $\mu$ g genisteina (Dixon i Ferreira, 2002). Proteini soje koriste se kao zamena za meso i mogu se naći u pljeskavicama, kobasicama, viršlama, ćuftama i mesnim hlebovima u količini od 50-70%. Izolati proteina soje koji sadrže 90% proteina, koriste se za pravljenje formula za odojčad, sportskih napitaka i energetske pločice. Genistein se ne može naći, ili se može naći u malim količinama, u sojinom ulju i soja sosu. Pored soje, druge vrste hrane u kojima je dokazan genistein su klice lucerke i deteline (*Trifolium* spp.), ječmeno brašno, brokoli, karfiol, suncokret, kumin i seme deteline (Ganai i Farooqi, 2015). Dodatno, genistein je izolovan iz bujona nakon rasta različitih vrsta mikroorganizama (*Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp.) (Ogawara i sar., 1986).

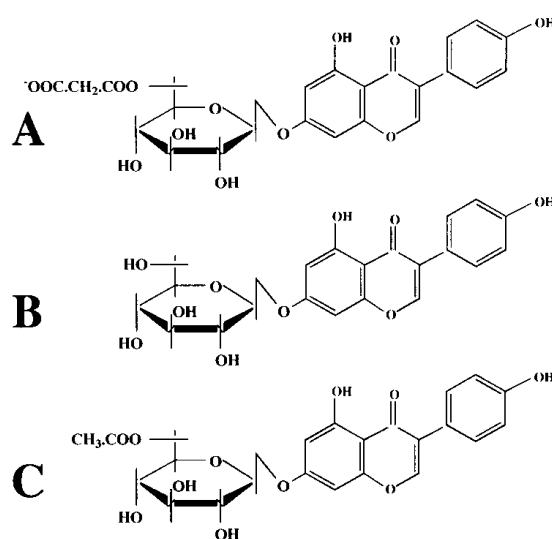
Tabela 2.2. Sadržaj genisteina i njegovog  $\beta$ -glikozida genistina u soji i proizvodima od soje (Fukutake i sar., 1996)

	Količina $\mu\text{g/g}$	
	Genistein	Genistin
Soja	4,6	200,6
Soy nuts	11,6	968,1
Bob	<0,1	<0,1
Proizvodi od soje		
Sojino brašno	18,2	464,4
Sojino mleko	1,9	133,1
Tofu	13,9	137,7
Fermentisani proizvodi od soje		
Miso	229,1	71,7
Natto	38,5	282,8
Soja sos	2,8	20,1

Pokazano je da genistein može da ostvaruje antilipogene, antiparazitske, antiinflamatorne, hipolipidemične, neuroprotektivne efekte kod ishemičnih oštećenja, estrogene efekte, naročito u regulaciji simptoma postmenopauze, a može se koristiti i u terapiji hipertenzije i osteoporoze (Chen i sar., 2019). Genistein se smatra hemoprotektivnim agensom koji se koristi u terapiji kancera, odnosno pokazano je da inhibira razvoj aberantnih kriptalnih fokusa (preneoplastične lezije) kolona kod pacova (Pereira i sar., 1994), i tumorskih ćelijskih linija prostate i dojke kod ljudi (Barnes i sar., 1994). Za razliku od drugih izoflavona, genistein ispoljava toksičnost u koncentracijama mnogo višim od onih kojima ostvaruje biološke i farmakološke efekte, zbog čega se i smatra potencijalno najznačajnijim dijetnim hemopreventivnim agensom (Dixon i Ferreira, 2002). Može da učestvuje u metabolizmu lipida, smanjujući deponovanje masti inhibicijom diferencijacije adipocita, i pozitivno utiče na plazma lipidni status tako što snižava nivo LDL holesterola, odnos ukupnog prema HDL holesterolu i odnos LDL prema HDL holesterolu kod žena u premenopauzi (Merz-Demlow i sar., 2000). Takođe interferira u regulatornim signalnim putevima koji se dovode u vezu sa gojaznošću i različitim metaboličkim poremećajima kod ljudi (Weng i sar., 2019). Dodatno je zaključeno da metaboliti genisteina inhibiraju sintezu i esterifikaciju holesterola (Ganai i Farooqi, 2015). Genistein može da utiče na proliferaciju  $\beta$  ćelija pankreasa i sekreciju insulina, naročito u postmenopauznim stanjima (Weng i sar., 2019; Ding i sar., 2017). Pored efekata koji se vezuju za estrogenu aktivnost, genistein inhibira DNK topoizomerazu II, tirozin kinazu, ćelijski ciklus i ostvaruje antioksidativni efekat. Inhibiciju tirozin kinaze ostvaruje specifično, fosforilacijom receptora epidermalnog faktora rasta (EGF), dok u višim koncentracijama takođe inhibira i histidin kinazu. Inhibiciju rasta ćelija ostvaruje i menjajući signalne puteve transformirajućeg faktora rasta  $\beta 1$  (TGF  $\beta 1$ ) (Dixon i Ferreira, 2002).

### 2.5.1. Bioraspoloživost genisteina

Bioraspoloživost genisteina zavisi od relativnog unosa konjugovane i aglikonske forme (Slika 2.5.), hidrolize glikozida od strane bakterija digestivnog trakta ili enzima crevnih resica, glukuronizacije u jetri i stepena bilijarne i urinarne ekskrecije. Intestinalna mikrobiota genistein primarno transformiše u dihidrogenistein redukcijom dvostruke C-2 i C-3 kovalentne veze u jednostruku. U ovoj reakciji učestvuju *Clostridium* slične bakterije soj SNU sp. Niu-O16 i HGH6. Nakon toga dihidrogenistein može da ima dve sudbine, cepanje ugljeničnog prstena i formiranje 4-etil fenola (kod životinja) i 6'-hidroksi-*O*-DMA (kod ljudi), ili redukcija do 5-OH-ekvola. Daljim cepanjem C-prstena 6'-hidroksi-*O*-DMA se razlaže na floroglucinol i 2-(4-hidroksifenil)-propionsku kiselinu (HPPA). Floroglucinol je supstrat za intestinalne bakterije i brzo se razlaže, dok dalja konverzija HPPA nije utvrđena (Rossi i sar., 2010). S obzirom da se estrogene i ostale aktivnosti koje se pripisuju genisteinu ne dovode u vezu sa 4-etil fenolom i HPPA, mikrobijlnom transformacijom genisteina do ovih jedinjenja se smanjuje njegova biološka aktivnost, tako da je od velikog značaja sprečavanje cepanja C-prstena u molekulu genisteina. Pokazano je npr. da fruktooligosaharidi imaju sposobnost da spreče razgradnju genisteina selektivno favorizujući rast bifidobakterija. Naime, ove bakterije ne mogu da redukuju kompleksne molekule, a svojim rastom onemogućavaju umnožavanje bakterija odgovornih za metabolizam genisteina (Steer i sar., 2003). Bakterije koje učestvuju u metabolizmu izoflavona (daidzein i genistein) u kolonu su *Eubacterium limosum* (bez demetilazne aktivnosti), *E. coli* soj HGH21 i Gram + soj HGH6 (glikozidazna aktivnost u anaerobnim uslovima), bakterije slične *Clostridium* spp. soj HGH136 i TM-40, *Coprobacillus catenaformis* soj AB030218, Gram pozitivna nesporogena bakterija *Slackia isoflavoniconvertens* i *Slackia equolifaciens* (Rafii, 2015).



Slika 2.5. Hemijske strukture glikozidnih konjugata genisteina; A: 6''-*O*-malonil- $\beta$ -glikozid; B:  $\beta$ -glikozid; C: 6''-*O*-acetil- $\beta$ -glikozid (Coward i sar., 1998)

Prosečno vreme nakon ingestije kada koncentracija aglikona dostiže pik u plazmi ljudi je 4-7 sati, dok je za  $\beta$ -glikozide to vreme nešto duže, od 8 do 11 sati. Poluvreme eliminacije iz organizma za daidzein je 9,3, a za genistein 7,1 sat, što implicira da se izoflavoni ili njihovi metaboliti brzo izlučuju iz organizma (Cederroth i sar., 2012). Koncentracija genisteina u serumu azijskih žena se generalno kreće oko 25 ng/ml, nešto je niža kod žena koje su vegetarijanci, dok je kod žena u Americi ispod 2 ng/ml (Patisaul i Jefferson, 2010).

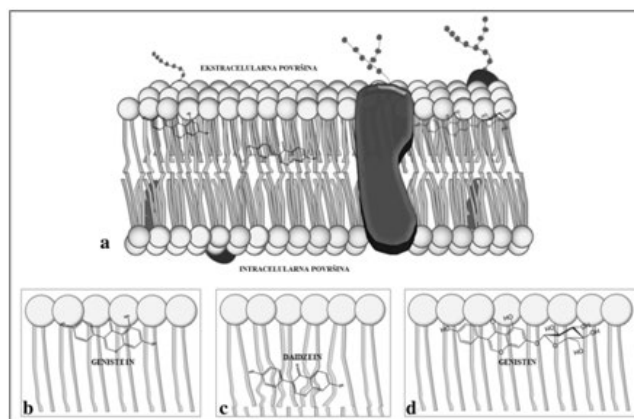
### 2.5.2. Genistein kao antioksidans

Genistein je u brojnim studijama korišćen kao antioksidans gde je pokazano da poseduje mogućnost da neutrališe i sprečava stvaranje slobodnih radikala, odnosno reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i azota (RNS) (hidroksilni radikal -  $\text{OH}\cdot$ ; superoksidni radikal -  $\text{O}_2\cdot$ ; azot oksidni radikal -  $\text{NO}\cdot$  i lipid peroksilni radikal -  $\text{LOO}\cdot$ ). Jednom stvoreni slobodni radikali napadaju različite delove ćelije i dovode do oštećenja ćelijske membrane i enzimskih sistema (Giray i sar., 2001). Slobodni radikali se smatraju jednim od glavnih uzroka koji dovode do autoimunih i hroničnih inflamatornih oboljenja kod ljudi i životinja, kao što je npr. sindrom pulmonalne hipertenzije (ascit) kod brojlera (Kamboh i sar., 2015; Iqbal i sar., 2002). Mehanizam antioksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja, poput genisteina, zavisi od transfera atoma vodonika ili elektrona sa fenolne C3 hidroksilne grupe. Genistein kao oksidans donira atom vodonika sa fenolne hidroksilne grupe, pri čemu se sam redukuje, a izuzetno efikasan pokazao se u eliminaciji vodonik peroksida u *in vitro* uslovima (Ajdžanović i sar., 2010; Heim i sar., 2002).

Poznata su tri nivoa antioksidativne odbrane: 1) sprečavanje formiranja slobodnih radikala (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza), 2) prevencija i sprečavanje formiranja lanca i propagacije (vitamin A, E, C, karotenoidi), i 3) ekscizija i popravka oštećenog dela molekula (lipaze, peptidaze, dezoksiribonukleaze) (Grashorn, 2007). Genistein je uključen u prvi i drugi nivo odbrane. Naime, pokazano je da genistein inhibira stvaranje vodonik peroksida i povećava aktivnost antioksidativnih enzima kao što su katalaza (CAT), mangan-superoksid-dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GSH-px) i glutation reduktaza (Yang i sar., 2010). Katalaza i glutation peroksidaza  $\text{H}_2\text{O}_2$  prebacuju u  $\text{H}_2\text{O}$ , a superoksid-dismutaza dovodi do dismutacije superoksidnog anjona (Ajdžanović i sar., 2010). Dodatno, difenolična struktura genisteina omogućava helaciju prelaznih metala, kao i direktno uklanjanje slobodnih radikala (Kruk i sar., 2005).

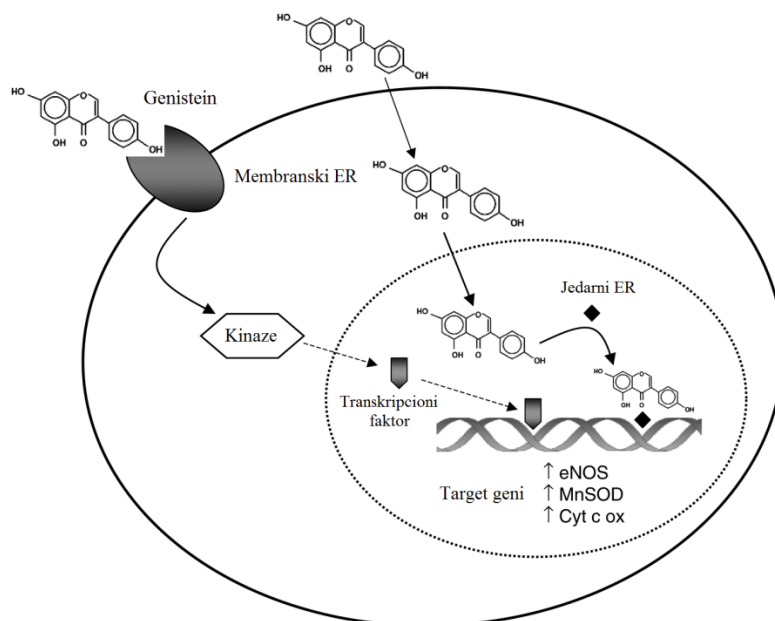
Mogući mehanizam kojim izoflavoni utiču na antioksidativnu aktivnost podrazumeva i njihovu sposobnost da stabilizuju ćelijske membrane smanjenjem fluidnosti membrane. Smatra se da se izoflavoni, slično holesterolu i tokoferolu, umeću u hidrofobni deo membrane i dovode do dramatičnog smanjenja fluidnosti lipida u tom regionu ćelijske membrane (Slika 2.6.). Lokalizacija

izoflavona u unutrašnjosti membrane i smanjenje fluidnosti membranskih komponenata može da oteža prostorno širenje slobodnih radikala i na taj način da uspori kinetiku reakcija slobodnih radikala (Jiang i sar., 2007a).



Slika 2.6. Lokalizacija izoflavona u fosfolipidnom dvosloju ćelijske membrane (Ajdžanović i sar., 2010)

Dokazano je da genistein ima ulogu u sprečavanju nastanka apoptoze i nekroze ojačavajući antioksidativni odbrambeni sistem ćelija modeliranjem ekspresije različitih gena i proteina (Ganai i sar., 2015). Kompleks ER-genistein vezuje se za specifični element estrogenog odgovora (ERE) ili element antioksidativnog odgovora (antioxidant response element-ARE) u regiji promotera i aktivira transkripciju gena (Šema 2.1.). Kasnija istraživanja su pokazala da do povećanja ekspresije gena dolazi i posredovanjem drugih transkripcionih faktora koji su nezavisni od ERE, kao što su AP-1 (Activator protein 1) i NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) (Mahn i sar., 2005; Valverde i Parker, 2002). Genistein povećava ekspresiju antioksidativnih enzima, kao što je glutation peroksidaza, u ćelijama prostate i štiti DNK ovih ćelija od nastanka oštećenja (Raschke i sar., 2006). Jiang i sar. (2007a) su utvrdili da izoflavoni smanjuju sekreciju kreatin kinaze, koja je indikator stepena oštećenja mišića u medijumu glatkomišićnih ćelija, što pokazuje da izoflavoni mogu da štite ćelijsku membranu od gubitka kreatin kinaze u oksidativnom stresu. Genistein ostvaruje efekat supresije oksidativnog stresa koji se dovodi u vezu sa inflamacijom, inhibiranjem aktivacije nuklearnog faktora  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) i regulisanjem ekspresije gena koji učestvuju u imunskom i inflamatornom odgovoru (Choi i sar., 2003). Takođe je pokazano da se unosom sojinih izoflavona (sojino mleko, suplementi izoflavona) odlaže proces ateroskleroze, sprečava oksidacija lipoproteina male gustine (LDL) i nastanak oksidativnih oštećenja na DNK kod žena u postmenopauzi (Wiseman i sar., 2000).



Šema 2.1. Genistein aktivacijom membranskih ER pokreće signalne kaskadne puteve kojima se povećava aktivnost azot oksid sintaze (eNOS) i aktiviraju geni antioksidativne zaštite modulacijom transkripcijskih faktora posredovanom aktivnošću kinaza (Mahn i sar., 2005; Valverde i Parker, 2002).

Yalniz i sar. (2007) i Onderaci i sar. (2004) su utvrdili da oralna primena genisteina smanjuje nivo MDA (malondialdehida) u jetri i serumu prepelica i pacova, a antioksidativni efekat genistena na ove parametre je naročito bio primećen kod životinja koje su bile izložene temperaturnim stresom. Akdemir i Sahin (2009) su dokazali značajnu negativnu korelaciju zavisnost ( $r=-0,65$ ;  $P<0,0001$ ) između nivoa genisteina u hrani i sadržaja MDA u žumancetu jaja. Jiang i sar. (2007b) su pokazali da izoflavoni u hrani brojlera u količini iznad 10 mg/kg smanjuju stvaranje MDA u mesu grudi. Na osnovu ovih istraživanja zaključeno je da suplementacija izoflavonima u hrani za živinu ima veliki potencijal u održavanju oksidativne stabilnosti proizvoda, mesa i jaja.

### 2.5.3. Genistein i lipidoza

Kod piladi je hepatična lipidoza, odnosno sindrom masne jetre, često praćen hemoragičnim sindromom jetre (Van Elswyk i sar., 1994). Jetra koja sadrži masti u količini većoj od 5% mase se smatra masnom jetrom kod piladi. Ovaj sindrom se više javlja kod nosilja, jer se dovodi u vezu sa steroidnim hormonima (estradiol), dok kod brojlera *ad libitum* pristup hrani i brzi rani rast utiče na razvoj metaboličkih poremećaja i lipotoksičnih efekata (Chen i sar., 2006). Živina je jako osetljiva na promene u ishrani, tako da hiperlipidemična pilad mogu da posluže kao dobri modeli u razumevanju nastanka i terapije nealkoholnog steatohepatitisa kod ljudi (Martín-Castillo i sar., 2010).

Veća konzumacija proizvoda od soje dovode se u vezu sa manjom učestalošću pojave nealkoholnog steatohepatitisa kod ljudi u Japanu, a mehanizam kojim sojin protein smanjuje nivo lipida u jetri i serumu objašnjava se većom ekskrecijom žučnih kiselina. Genistein je takođe dosta ispitivan zbog hipolipidemičnog i antilipogenetskog efekta koji ostvaruje (Yang i sar, 2011). Kim i sar. (2010) su pokazali da suplementacija genisteinom smanjuje deponovanje masti aktivacijom  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina ili inhibicijom adipogeneze i lipogeneze. Oralna administracija genisteina reguliše adipogenezu i deponovanje triglicerida, menja broj i volumen adipocita, smanjuje nivo ALT-a i AST-a, smanjuje lipidnu peroksidaciju i razvoj inflamacije kod miševa i pacova sa nealkoholnim steatohepatitisom (Ji i sar., 2011; Dang, 2009). Dokazano je da izoflavoni mogu imati bitnu ulogu u snižavanju ukupnog serumskog holesterola, LDL-a i VLDL-a. Izoflavoni mogu da uspore stvaranje plakova inhibiranjem adhezija ćelija i promenom aktivnosti određenih faktora rasta, kao što su PDGF (Platelet-derived growth factor) i citokini, koji utiču na stvaranje lezija. Svi ovi efekti su posredovani inhibicijom tirozin kinaze (Setchell i Cassidy, 1999).

Efekat genisteina na masno tkivo može biti i inhibitoran i stimulatoran u zavisnosti od doze. U koncentracijama između 0,1 i 10  $\mu$ mol genistein inhibira adipogenezu, dok je u koncentracijama iznad 10  $\mu$ mol stimuliše. Delom se ovi efekti objašnjavaju vezivanjem za ER $\beta$ , a delom aktivacijom drugih signalnih puteva koji smanjuju estrogene efekte genisteina (Dang, 2009).

#### **2.5.4. Genistein i osteoporoza**

Osteoporoza je progresivno oboljenje koje nastaje kao posledica smanjenog udela mineralizovanog strukturnog dela kostiju što dovodi do slabosti i frakture (Whitehead, 2004). Osteoporoza nosilja koje se drže u kavezima (kasnije nazvana sindrom zamora nosilja u kavezima i kavezna paraliza) je najznačajnije oboljenje skeleta kod starije živine, naročito one koje je namenjena za proizvodnju jaja (Mayeda i Ernst, 2008). Već je pokazano da sojini izoflavoni povećavaju sadržaj mineralnog dela kostiju i gustinu kostiju kod ljudi (Greendale i sar., 2002), međutim zbog navedenih problema, ali i s aspekta poboljšanja kvaliteta ljuske jaja (debljina i masa ljuske), u intenzivnom uzgoju živine suplementacija izoflavonima ima veliki značaj.

U brojnim studijama je uočeno da sojini izoflavoni, primarno genistein, smanjuju intracelularnu koncentraciju kalcijuma u osteoklastima i povećavaju apsorpciju i retenciju kalcijuma iz digestivnog trakta što implicira da se time povećava količina kalcijuma koja se koristi za formiranje ljuske jaja (Akdemir i Sahin, 2009; Kajiya i sar., 2000; Gao i Yamaguchi, 1998). Sahin i sar. (2006) su takođe pokazali da je suplementacija genisteinom u dozama od 400 do 800 mg/kg smanjila sadržaj kalcijuma, fosfora, magnezijuma, mangana, cinka, gvožđa i bakra u ekskretu, dok se koncentracija kalcijuma, fosfora i magnezijuma u serumu ptica povećala. U različitim studijama je



utvrđeno da izoflavoni učestvuju u remodeliranju kostiju, odnosno da pozitivni efekat ostvaruju na gustinu i obnavljanje koštanog tkiva (Stevenson, 2012; Picherit i sar., 2001; Blair i sar., 1996). Pokazano je da je genistein izuzetno potentan promotor diferencijacije i maturacije osteoblasta i inhibitor formiranja osteoklasta i resorpcije kostiju, i to preko osteoklasnog inhibitora osteoprotegerina i blokiranjem NF- $\kappa$ B signalnog puta, tako da ovi efekti najverovatnije nisu posredovani estrogenim receptorima (Ming, 2013).

### 2.5.5. Genistein i imunski odgovor

U brojnim studijama je pokazano da genistein ima supresivni efekat kako na celularni, tako i na humoralni imunski odgovor. Takođe, smanjuje agregaciju trombocita i stabilizuje mastocite (Ganai i Farooqi, 2015). Kod životinja genistein smanjuje intenzitet razvoja reakcije kasne preosetljivosti, dok kod odojčadi hranjenom formulama na bazi soje smanjuje funkciju T ćelija i nivo imunoglobulina (Ganai i Farooqi, 2015; Zoppi i sar., 1982). Inhibitorski efekat genisteina, bilo da se aplikuje *per os* ili injekciono, na celularni imunski odgovor kod životinja praćen je smanjenom masom timusa, pa je ovaj pokazatelj usmerio istraživanja u pravcu razvoja CD4+ i CD8+ timocita čime je i pokazano da imunosupresivni efekat se ostvaruje upravo preko ovih ćelija koje na svojoj površini ekspimiraju estrogene receptore (Ganai i Farooqi, 2015). Međutim kasnija istraživanja kod pacova i miševa hranjenih genisteinom tokom gestacije i laktacije pokazala su da efekat genisteina na masu timusa i celularni imunski odgovor uključuje i mehanizme koji nisu vezani za ER. Naime, utvrđeno je da neki od tih mehanizama uključuju inhibiciju tirozin kinaze, topoizomeraze II i još neke neestrogene celularne mehanizme i puteve (Yellayi i sar., 2002).

*In vitro* studije su pokazale da visok nivo genisteina smanjuje broj makrofaga i natural killer (NK) ćelija, i inhibira fagocitozu inhibirajući tirozin kinazu, dok inhibiciju stvaranja T i B limfocita ostvaruje preko inhibitornog efekta na topoizomerazu II (Chang i sar., 1995). S druge strane, niže doze genisteina povećavaju aktivnost NK ćelija i sprečavaju replikaciju virusa (Andres i sar., 2009). Kod svinja inficiranih virusom reproduktivnog i respiratornog sindroma (PRRS virusom) genistein, pored pozitivnog efekta na proizvodne rezultate, smanjio je aktivnost interferona u serumu, a povećao nivo  $\alpha$ 1-acilglikoproteina, i time učestvovao u eliminaciji virusa iz organizma zaraženih svinja. Smatra se da genistein unet *per os* u dozi od 200 do 400 mg/kg ostvaruje zanačajan imunomodulatorski efekat (Greiner i sar., 2001).

Pulmonalna arterijalna hipertenzija je oboljenje malih plućnih arterija koje karakteriše visok plućni pritisak, vakularno remodelovanje i hipertrofija desne pretkomore srca. To je jedno od najčešćih kliničkih simptoma kod brojlera sa ascit sindromom koji je jedan od vodećih uzroka uginuća u

živinarstvu. Brojna istraživanja su pokazala da genistein može da suprimira ovo oboljenje kroz NO (azot-monoksid) posredovane signalne puteve (Yang i sar., 2010).

### 2.5.6. Antibakterijski efekat genisteina

Zbog stalne potrebe za antimikrobnim supstancama, naročito u industriji hrane gde se javlja rezistencija patogena, smanjena efikasnost postojećih preparata (dezinficijensi) i velika upotreba aditiva koji mogu štetno uticati na zdravlje (natrijum benzoat), od velikog je značaja pronalaženje i formulisanje novih efikasnih antimikrobnih preparata koji bi bili bezbedni za konzumaciju (Dhayakaran i sar., 2015). Genistein pored jedinstvenih terapijskih i bioloških svojstava, poseduje i određene prednosti s aspekta raspoloživosti, biokompatibilnosti, biorazgradivosti i jestivosti (Ullah i sar., 2011).

Strukturni preduslovi izoflavona određuju stepen njihove antibakterijske efikasnosti, odnosno prenil grupa na C-6 poziciji i hidroksilne grupe na C-5 i C-7 pozicijama. Kristalizacijom prenil i hidroksilnih grupa opada antibakterijska aktivnost izoflavona (Dhayakaran i sar., 2015; Mukne i sar., 2011). Hidroksilne grupe zbog visokog afiniteta prema proteinima inhibiraju enzime i biosintetske puteve u bakterijskim ćelijama, dok prenil grupe povećavaju lipofilnost, odnosno interakciju između izoflavonskih jedinjenja i bakterijske ćelijske membrane. Adsorpcijom ovih jedinjenja na površinu ćelije remeti se funkcionisanje, oštećuje ćelijska membrana i sadržaj iz ćelije izlazi van (Mukne i sar., 2011). Kapoor i sar. (2007) su utvrdili da konjugovane glikozidne forme imaju manju antibakterijsku aktivnost od aglikona. Generalno se smatra da genistein sprečava sintezu nukleinskih kiselina utičući na enzime topoizomerazu I i II, ili preko topoizomeraze IV, čime se smanjuje količina RNK i DNK u bakterijskim ćelijama (Ulanowska i sar., 2006; Verdrengh i sar., 2004). Cushnie i Lamb (2011) smatraju da liza bakterijske ćelije koja nastaje u prisustvu genisteina je verovatnije posledica programirane ćelijske smrti usled smanjene sinteze DNK/RNK nego oštećenja integriteta ćelijske membrane. Genistein utiče i na sintezu egzotoksina tako da smanjuje i patogenost bakterija (Ulanowska i sar., 2007).

Za genistein je potvrđeno da ima antibakterijski efekat prema *Staphylococcus aureus*, meticilin rezistentnim *S. aureus* (MRSA), *B. anthracis* i *Vibrio harveyi* (Hong i sar., 2006; Ulanowska i sar., 2006). Ulanowska i sar. (2006) su pokazali da 27 mg/ml genisteina ima snažan inhibitorni efekat na rast Gram negativne bakterije *V. harveyi*, umereni inhibitorni efekat prema Gram pozitivnoj *Bacillus subtilis*, dok značajnog efekta na rast *E. coli* nije bilo. Hong i sar. (2006) su utvrdili da je genistein u istoj koncentraciji koju su koristili prethodno navedeni autori (27 mg/ml) inhibirao rast *S. aureus* i *B. anthracis*, dok nije bilo efekta na rast *Lactobacillus reuteri*, *E. coli*, *Shigella sonnei* i *Klebsiella pneumoniae*. Prema Dhayakaran i sar. (2015) ekstrakt izoflavona soje je smanjio rast *L.*

*monocytogenes*, dok na formiranje biofilmova MRSA, *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa* nije ispoljio efekat.

## **2.6. Funkcionalna hrana**

Koncept funkcionalne hrane prvi put su pomenuli japanski naučnici koji su proučavali vezu između ishrane, senzorske ocene hrane i modulacije fizioloških sistema. Ministarstvo zdravlja Japana je 1991. godine usvojilo pravilnik o specifičnoj hrani koja utiče na zdravlje ljudi tzv. FOSHU (Food for Specified Health Uses) kategorija hrane za koju su dozvoljene određene zdravstvene izjave (Burdock i sar., 2006). U Japanu tradicionalna funkcionalna hrana se smatra posebnim proizvodima koji ukoliko zadovoljavaju uslove mogu biti označeni simbolom FOSHU i kod kojih je funkcionalna komponenta značajnija od ukusa, dok u Evropi i SAD-u koncept funkcionalne hrane podrazumeva da se tradicionalni i konvencionalni proizvodi obogate nekim funkcionalnim sastojkom, pri čemu takva hrana se ne izdvaja u posebnu kategoriju (Fern, 2007; Hilliam, 1998).

Mnogi državni organi, akademska udruženja i sektor industrije su tokom godina predlagali različite definicije koje se tiču funkcionalne hrane počevši od jednostavnijih: “Hrana koja pored osnovne nutritivne vrednosti može povoljno da utiče na zdravlje”, do složenijih: “Hrana koja je po izgledu slična konvencionalnoj hrani i koja je namenjena da se konzumira kao deo uobičajne ishrane, ali koja je izmenjena da pored zadovoljavanja nutritivnih potreba ima i određenu fiziološku ulogu (Bech-Larsen i Grunert, 2003). Dodatno, da bi takva hrana se smatrala funkcionalnom, njom bi moralo da se zadovolji i preporučeni dnevni unos date relevantne supstance (Grashorn, 2007).

U Evropi je od strane Evropske Komisije u saradnji sa ILSI (International Life Science Institute) institutom na sledeći način definisana funkcionalna hrana: “ Hrana ili proizvod se može smatrati funkcionalnim ukoliko pored osnovne hranljive vrednosti ima povoljan efekat na jednu ili više funkcija u ljudskom organizmu, tako što ili poboljšava generalno i fizičko stanje i/ili smanjuje rizik od nastanka bolesti. Količina unosa i izgled funkcionalne hrane trebalo bi da bude uobičajen, sličan konvencionalnoj hrani koja se koristi u ishrani, odnosno ne može biti u obliku tablete ili kapsule” (Siró i sar., 2009; Diplock i sar., 1999)

Funkcionalna hrana je naročito interesantna sa ekonomskog aspekta zato što pruža proizvođačima mogućnost da uvedu nove proizvode visokog kvaliteta na tržište za koje bi potrošači bili spremni da plate 15-20% više od cene konvencionalnih proizvoda (Siró i sar., 2008). Benkouider (2004) je procenio tržište funkcionalne hrane 2004. godine na oko 61 milijardu US\$. Ovo tržište je 2010. godine procenjeno na više od 150 milijardi US\$ sa godišnjim rastom od 10% (Granato i sar., 2010), a očekuje se da će prihod od svetskog tržišta funkcionalne hrane porasti od 2019. do 2025. godine

sa 174,75 milijardi US\$ na preko 275,77 milijardi US\$ (<https://www.statista.com/statistics/252803/global-functional-food-sales>). Tržište funkcionalne hrane živinskih proizvoda u Srbiji se susreće sa problemima, što potvrđuju i studije Rodić i sar. (2010a) i Rodić i sar. (2010b) u kojima je pokazano da većina potrošača nije spremna da prihvati značajan porast u ceni jaja i mesa piladi. Studija o stavovima potrošača i želji da uključe funkcionalne proizvode u svoju ishranu izvedena od strane Verbeke (2005), pokazala je da stariji ljudi i ljudi koji imaju bolesne članove porodice lakše prihvataju ovakvu hranu, međutim samo mali procenat njih je spreman da pravi kompromis ukoliko ukus funkcionalne hrane dosta odstupa od ukusa konvencionalne hrane.

### **2.6.1. Meso kao funkcionalna hrana**

Meso je visoko vredna namirnica, sa velikom bioraspoloživošću hranljivih materija, koja je dosta cenjena kod potrošača zbog karakterističnog ukusa i arome. Različiti su načini kojima se meso i proizvodi od mesa mogu obogatiti bioaktivnim jedinjenjima koja su i inače prisutna u mesu. U neka od takvih jedinjenja koja utiču na fiziološke procese kod ljudi ubrajaju se anserin, kmozin, glutation, L-karnitin, kreatin i taurin. Da bi se neki sastojak hrane smatrao funkcionalnim u obzir mora da se uzme nivo unosa, efikasnost u ostvarivanju pozitivnih efekata na fiziološke funkcije, stabilnost i tehnološke karakteristike (stabilnost tokom skladištenja, uticaj na senzorske karakteristike) (Decker i Park, 2010). Neki esencijalni nutrijenti, koji se smatraju funkcionalnim, a mogu se naći u mesu i proizvodima od mesa, su vitamin A, E i C i minerali magnezijum, kalcijum i kalijum. Neka neesencijalna jedinjenja koja se suplementacijom u hrani za životinje i reformulacijom proizvoda mogu naći u mesu i proizvodima od mesa su PUFA n-3 masne kiseline, CLA, antioksidansi, dijetna vlakna, bioaktivni peptidi, probiotske bakterije i prebiotici (Khan i sar., 2011).

### **2.7. Kvalitet mesa piladi**

Meso piladi se od ostalih vrsta mesa, kao što su goveđe i jagnjeće, razlikuje po nižem sadržaju gvožđa (0,7 mg/100 g u poređenju sa 2 mg/100 g). Meso piladi značajan je izvor esencijalnih polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), naročito n-3 masnih kiselina. Preporučeni dnevni unos niacina za odrasle obezbeđuje se sa 100 g, dok za decu sa 50 g mesa piladi. Sadržaj masti u pilećem mesu varira u zavisnosti od provenijencije, mase i ishrane brojlera. Analizirajući različite delove trupa živine, kao i celog trupa, utvrđen je sledeći sadržaj masti: 2,8 g/100 g grudi, 10 g/100 g celog trupa, 13 g/100 g bataka sa kožom i 70 g/100 g kože (Barroeta, 2007). Kao što je navedeno, meso grudi, koje spada u tzv. belo meso, sadrži manje od 3 g masti/100 g. Više od polovine ovog sadržaja čine poželjne mononezasićene masne kiseline, dok samo jednu trećinu čine zasićene masti.

Značajno veći udeo zasićenih masti je u crvenom mesu drugih životinja (goveđe, ovčije i svinjsko meso) i crvenom mesu živine (batak s karabatakom). Zbog ovakvog masnokiselinskog sastava meso piladi se smatra “zdravim” mesom, a dodatno ne sadrži ni trans masti koje se u većoj količini mogu naći u goveđem i jagnječem mesu, a koje se dovode u vezu sa nastankom koronarne bolesti srca (Bošković i sar., 2015). Svetske organizacije koje se bave istraživanjem kancera (World Cancer Research Fund) dale su mišljenje da konzumiranje velike količine crvenog mesa (više od 500 g nedeljno), naročito proizvoda od mesa, ali ne i mesa piladi, može biti nezdravo (Bingham, 2006). Naime, konzumacijom crvenog mesa u debelom crevu ljudi formiraju se N-nitroso jedinjenja koja se smatraju jednim od značajnih faktora koji utiču na povećani rizik od nastanka kolorektalnog kancera (Pisulewski, 2005).

### **2.7.1. Mogućnosti dobijanja obogaćenog mesa modifikacijama u ishrani živine**

Istraživači iz oblasti ishrane životinja poslednjih godina razvijaju različite efikasne strategije koje za cilj imaju da se dobiju namirnice animalnog porekla sa poboljšanim nutritivnim sastavom, a koje bi dodatno mogle da imaju pozitivni efekat na zdravlje ljudi. Tako npr. modifikacijom obroka može se dobiti meso sa smanjenim sadržajem ukupne masti, sa promenjenim masnokiselinskim sastavom i poboljšanom oksidativnom stabilnošću (Pisulewski, 2005). Kada se govori konkretno o živinarskoj proizvodnji, razvijeno je niz programa kojima se dobija meso i jaja sa smanjenim sadržajem masti i holesterola (Nikolova i sar., 2009; Stanačev i sar., 2005). Imajući u vidu da ishrana brojlera može dosta da varira, odnosno da je pogodna različitim modifikacijama, pokazano je da se sadržaj značajnih masnih kiselina, vitamina, makro i mikroelemeneta lako može povećati u mesu piladi za razliku od mesa drugih životinja (Marković i sar., 2018a; Marković i sar., 2018b; Branković Lazić, 2015; Drljačić, 2013).

Meso piladi i jaja imaju dobar potencijal kao funkcionalna hrana zato što živina ima veliku sposobnost da nutrijente od interesa konvertuje iz hrane u proizvode. Zbog višeg sadržaja masti u jajima, ona su se pokazala kao bolja za modifikaciju u potencijalnu funkcionalnu hranu u poređenju sa mesom (Perić i sar., 2011).

#### **2.7.1.1. Polinezasićene n-3 masne kiseline i CLA**

Najviše ispitivana fiziološki aktivna (funkcionalna) jedinjenja, za koje je pokazano da smanjuju rizik od nastanka nekoliko hroničnih nezaraznih bolesti, sa najvećom efikasnošću u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja, su polinezasićene masne kiseline (n-6 i n-3) i konjugovana linolna kiselina (conjugated linoleic acid-CLA) (Lopez-Garcia i sar., 2004). Za CLA pored antiaterogenog, dokazano je da ima i antikancerogene i imunomodulatorske efekte kod životinja i ljudi. Zbog toga je niz istraživanja bilo posvećeno strategijama u ishrani živine kako bi se dobilo meso obogaćeno

PUFA i CLA, koje bi se smatralo “funkcionalnim”, odnosno koje bi moglo da ostvaruje pozitivne efekte na zdravlje ljudi i poveća otpornost organizma prema različitim bolestima (Milanković i sar., 2019; Branković Lazić, 2015; Pisulewski, 2005).

Dodavanje različitih izvora PUFA (biljna ulja (laneno, uljane repice, suncokretovo), riblje ulje, ulje morskih algi) u smeše za ishranu brojlera za rezultat su imale inkorporaciju ovih masnih kiselina u lipide trupa brojlera. Masnokiselinski sastav ovakvog mesa bio je nutritivno povoljniji, zbog čega se ovaj pristup smatra dosta dobrim načinom za dobijanje funkcionalnog mesa piladi (Pisulewski, 2005). Međutim pored uticaja vrste ulja i drugi faktori utiču na dobijanje obogaćenog mesa čime se proces dodatno komplikuje. Tako npr. različite masne kiseline se različito deponuju u zavisnosti od vrste mišićnog tkiva (n-3 PUFA se primarno deponuje u fosfolipidima mesa grudi brojlera) (Zanini i sar., 2004). Dodavanjem različitih suplemenata u malim količinama, kao što su npr. suplementi linoleinske kiseline, laneno ulje ili CLA, sadržaj n-3 PUFA u mesu bataka može se povećati sa 86 mg na 283 mg/100 g. Na obogaćenje mesa piladi polinezasićenim masnim kiselinama utiče i sadržaj i odnos ostalih masti u mesu. Tamno pileće meso (batak i karabatak) uvek sadrži veću količinu PUFA u poređenju sa mesom grudi brojlera (Farrell, 2013).

#### **2.7.1.2. Antioksidansi**

Sa većim udelom n-3 masnih kiselina u hrani za brojlere veći je i sadržaj ovih jedinjenja u mesu, i to primarno u fosfolipidnom dvosloju ćelijskih membrana mišićnih ćelija, pa samim tim, pored promena u boji, ukusu, teksturi i nutritivnoj vrednosti, ovakav pristup je doveo do smanjenja oksidativne stabilnosti mesa tokom skladištenja. Kako bi se sprečila oksidacija lipida tokom skladištenja mesa, ali i poboljšao kvalitet mesa, s obzirom da je za antioksidanse kao što su  $\alpha$ -tokoferol i selen utvrđeno da smanjuju rizik od nastanka raka i kardiovaskularnih oboljenja kod ljudi (Grashorn, 2007), niz istraživanja je posvećen odgovarajućoj metodologiji suplementacije hrane za brojlere. Tako se s jedne strane radilo na povećanju aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (glutation peroksidaza, superoksid dismutaza, katalaza), dok se s druge strane radilo na povećanju sadržaja antioksidanasa male molekulske mase kao što su  $\alpha$ -tokoferol, askorbinska kiselina i  $\beta$ -karoten u mesu brojlera (Ruiz i sar., 1999). Pored toga što je utvrđeno da se  $\alpha$ -tokoferol lako i u visokom procentu inkorporira u lipide trupa brojlera, njegovo deponovanje zavisi od više faktora (izvor masti u ishrani-laneno, riblje ulje i ulje uljane repice; vrsta mišićnog tkiva-meso grudi i batak s karabatom). Takođe je pokazano da stepen deponovanja vitamina E i selena u mišićno i masno tkivo direktno zavisi od unosa ovih antioksidanasa hranom (Drljačić, 2013; Wenk i sar., 2000). Yaroshenko i sar. (2004) tvrde da sadržaj selena u mesu se može povećati od 3 do 4 puta, čime se obezbeđuje do 60% preporučenog dnevnog unosa selena kod ljudi. Za razliku od ova dva antioksidansa, vitamin C i  $\beta$ -karoten se jako malo deponuju u mesu brojlera, a  $\beta$ -karoten ispoljava

antioksidativnu aktivnost samo u sinergizmu, odnosno ukoliko vitamin E dostigne određeni nivo u tkivu (Ruiz i sar., 1999). Razmatrajući efikasnost endogenog obogaćenja mesa vitaminom E i C (putem hrane) u odnosu na egzogeno obogaćenje (tehnološki postupak-dodavanje antioksidanasa na površinu mesa), pokazano je da vitamin E mora da bude inkorporiran u fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane kako bi uspešno neutralisao slobodne radikale koji nastaju tokom oksidacije lipida, dok vitamin C u ishrani nije tako efikasan kao vitamin E. Aplikovanje vitamina C na površinu mesa nema efekta na održivost. Slično vitaminu E, i  $\beta$ -karoten je mnogo efikasniji endogeni nego egzogeni antioksidans (Mitsumoto, 2000).

## **2.8. Sadržaj izoflavona u hrani animalnog porekla**

Većina studija koje su se bavile ispitivanjem sadržaja izoflavona u hrani odnosile su se na hranu biljnog porekla (voće, povrće, semena, orašasti plodovi), isključujući mleko i neku drugu hranu animalnog porekla koja takođe može biti izvor izoflavona, pa samim tim se nije imao pravi uvid u dnevni unos ovih jedinjenja. Za analizu prisustva fitoestrogena u hrani prvo su korišćene tečna hromatografija visokih performansi sa UV detektorom (HPLC-UV) i gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC/MS). Nešto kasnije su Kuhnle i sar. (2008) modifikovali i prilagodili metodu čvrsto-fazne ekstrakcije i tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (UHPLC-MS/MS) za koju je pokazano da se lako prilagođava različitim fitoestrogenima i vrstama hrane i da ima dobru ponovljivost. Ovom metodom su ispitali 115 različitih uzoraka hrane animalnog porekla mleko, sir, maslac, sladoled, jogurt, jaja, meso i riba (Tabela 2.3.).

Tabela 2.3. Sadržaj fitoestrogena u hrani animalnog porekla (Kuhnle i sar., 2008)

Hrana	Fitoestrogeni	Izoflavoni	Lignani	Kumestrol	Ekvol	Enterolakton
Mleko-punomasno	12	6	1	<1	1	4
Mleko-obrano	20	14	1	<1	1	3
Mleko u prahu-obrano	58	5	8	1	8	37
Čedar	36	10	2	1	14	10
Čedar-smanjen procenat masti	62	14	17	2	8	22
Mocarela	24	4	6	<1	6	6
Parmezan	27	6	5	1	4	11
Švapski sir	11	2	2	<1	1	7
Maslac	13	10	2	<1	-	-
Sladoled-čokolada	36	20	9	1	1	5
Meso nosilja-kavezni sistem	12	6	3	<1	2	1
Meso nosilja-slobodni uzgoj	11	6	3	<1	1	1
Goveđe meso-pečeno	19	3	16	1	-	-
Pileće meso (grudi)-pečeno	6	4	2	<1	-	-
Pileće meso (batak s karabatakom)-pečeno	4	2	1	-	-	-
Jagnjeće meso-pečeno	5	1	4	<1	-	<1
Svinjsko meso-pečeno	4	1	3	<1	-	-
Losos	4	3	1	-	-	-
Kozice	8	3	4	1	-	-
Tuna-konzerva	6	5	<1	<1	-	-

Iz prethodno navedene tabele može se videti da sadržaj fitoestrogena u sirevima dosta varira, takođe ne može se uočiti jasna veza između vrste sira i nivoa fitoestrogena. U jajima, i to predominantno u žumancetu, sadržaj fitoestrogena (uglavnom izoflavona) je niži nego u mleku i mlečnim proizvodima, ali u poređenju sa napicima na bazi soje (sojino mleko i sojin jogurt) u mlečnim proizvodima je do 500 puta niži sadržaj fitoestrogena.



### **2.8.1. Izoflavoni u proizvodima od mesa**

Dodavanje proteina biljnog porekla (većinom poreklom iz soje) u proizvode od mesa pokazalo se vrlo efikasnim, kako sa nutritivnog, tako i sa funkcionalnog aspekta. Naime, različiti oblici sojinog proteina (sojino brašno, koncentrat sojinog proteina i izolovani sojin protein) značajno povećavaju sposobnost vezivanja vode u proizvodu, samim tim smanjuju gubitak mase (kalo), stabilizuju mesnu emulziju, i povećavaju nutritivnu vrednost proizvoda (Chin i sar., 2000). Pokazano je da sojin protein povećava održivost viršli tako što smanjuje broj bakterija u proizvodu, smanjuje gubitak mase prilikom kuvanja i aglomeraciju masti u mesnom nadevu, dok istovremeno povećava kohezivnost proizvoda (Youssef i Barbut, 2011). Mnoga FOSHU hrana - hrana za specifične zdravstvene potrebe, formulisana je sa dodatkom proteina soje i dijetnih vlakana. Khan i sar. (2011) su pokazali da konzumacija niskomasnih kobasica sa dodatkom sojinog proteina utiče na snižavanje nivoa holesterola u krvi (Khan i sar., 2011).

### **2.8.2. Obogaćenje jaja i mesa živine dodavanjem izoflavona u hrani**

Transfer i akumuliranje izoflavona iz hrane za životinje u hranu animalnog porekla pruža novu mogućnost da ove namirnice budu dodatni izvori izoflavona u ishrani ljudi (Lin i sar., 2004). Za ekvol i *O*-DMA je pokazano da su biološki aktivniji od svog prekursora daidzeina, odnosno da imaju veći afinitet prema estrogenim receptorima (Atkinson i sar., 2005). Na osnovu prethodno navedenog može se zaključiti da dodavanjem izoflavona u hranu farmskih životinja kvalitet dobijenih proizvoda se može povećati prisustvom aktivnijih formi (metabolita) izoflavona (Wei i sar., 2011). Obogaćivanjem mesa i jaja živine izoflavonima, među koje spada i genistein, dobija se funkcionalna hrana koja potencijalno može ostvariti pozitivan efekat na zdravlje ljudi (Akdemir i Sahin, 2009). Naročiti izazov u industriji hrane je registracija i sertifikacija novih "obogaćenih" proizvoda, kontrola njihovog kvaliteta i naučna potvrda o njihovom pozitivnom uticaju na zdravlje i dobrobit potrošača (Marković i sar., 2015).

#### **2.8.2.1. Jaja**

Najveći deo proteina u ishrani živine obezbeđuje se sojinom sačmom, a izoflavoni koji se nalaze u soji se mogu prebaciti i akumulirati u meso i jaja, čime se dobijaju proizvodi obogaćeni izoflavonima koji mogu potencijalno biti funkcionalna hrana u ishrani ljudi (Marković i sar., 2015; Jiang i sar., 2007b; Lin i sar., 2004). Pored toga, dodavanjem izoflavona, koji su moćni antioksidansi, u ishranu živine značajno se može poboljšati oksidativna stabilnost jaja i mesa što se odražava nižim sadržajem malondialdehida (MDA) u ovim proizvodima (Akdemir i Sahin, 2009). Naime, potvrđena je obrnuta proporcionalnost između nivoa MDA, koji je indikator lipidne peroksidacije, i nivoa antioksidanasa u živinskim proizvodima (Sahin i sar., 2008). Akdemir i Sahin, (2009) su suplementacijom genisteina u količini od 400 i 800 mg/kg hrane tokom 90 dana

značajno povećali sadržaj genisteina u jajima japanskih prepelica (2,71 i 5,71  $\mu\text{g}/\text{žumancetu}$ ), u poređenju sa kontrolom (1,82  $\mu\text{g}/\text{žumancetu}$ ), bez promene u sadržaju vitamina A i E. Konzumacijom dva, na ovaj način genisteinom obogaćena jaja, obezbeđuje se dnevni unos od 10,42  $\mu\text{g}$  genisteina. Genistein u žumancima jaja su detektovali Lin i sar. (2004) i Saitoh i sar. (2001) nakon suplementacije nosilja i prepelica genisteinom i sojinim izoflavonima u formi glikozida. Konjugovani izoflavoni se transportuju iz krvi u rastuću oocistu najverovatnije kao kompleksi sa lipoproteinskim prekursorima žumanceta kao što je vitelogenin. Više doze genisteina *per os* rezultirale su višim koncentracijama genisteina u žumancima (Lin i sar., 2004). Nakon suplementacije sojinim izoflavonima u formi glikozida uočeno je da se u žumancetu (granularnoj frakciji žumanceta) dominantno akumulira konjugat ekvola koji je metabolit daidzeina (Saitoh i sar., 2001) i da čini ne manje od 60% ukupnih konjugata izoflavona u žumancetu.

### **2.8.2.2. Meso**

Meso je mnogo slabiji alergen od hrane kao što su soja, mleko, žitarice, jaja, kikiriki, voće, školjke, orašasti plodovi (Nishimura i sar., 1988), i zbog toga je interesantno s aspekta obogaćenja različitim biološki aktivnim supstancama. Za razliku od jaja, meso živine nakon suplementacije izoflavonima je ispitivano u kontekstu kvaliteta i održivosti, dok se o akumulaciji ovih jedinjenja u tkivu malo zna (Kamboh i sar., 2019; Marković i sar., 2015). Kamboh i Zhu (2013a) su suplementacijom 5 mg/kg genisteina u hrani za brojlere značajno povećali masu trupa pre hlađenja i sposobnost vezivanja vode u mesu, dok je stvaranje MDA u mesu grudi nakon 15 dana skladištenja na temperaturi frižidera bilo značajno smanjeno. Bolju mesnatost trupova i niži sadržaj masti su utvrdili Payne i sar. (2001a) kod brojlera koji su u hrani dobijali izoflavone. Kamboh i sar. (2013b) su utvrdili da se dodavanjem 5 mg/kg genisteina u hrani smanjuje nivo kreatin kinaze i laktat dehidrogenaze u mesu grudi brojlera izloženih toplotnom stresu. Pokazano je da genistein sam (5 mg/kg hrane) i u kombinaciji sa hesperidinom (20 mg/kg hrane) povećava ukupni antioksidativni kapacitet i aktivnost superoksid dismutaze, a smanjuje broj mikroorganizama kvara u mesu grudi brojlera nakon 15 dana skladištenja na temperaturi do 4 °C (Kamboh i sar., 2018). Na masnokiselinski sastav mesa grudi brojlera genistein u količini od 5 mg/kg hrane utiče tako što smanjuje udeo C14:0, C18:0 i ukupnih zasićenih masnih kiselina (SFA), a takođe u mesu grudi snižava i nivo holesterola (Kamboh i Zhu, 2013c). Jiang i sar. (2007b) su utvrdili da dodavanje sojinih izoflavona u količini od 40 do 80 mg/kg hrane za brojlere značajno poboljšava  $L^*$  vrednost mesa, sposobnost vezivanja vode i pH, povećava aktivnost katalaze i superoksid dismutaze i smanjuje produkciju MDA.

Kao što je prethodno napomenuto, ne raspolaže se sa dovoljno informacija vezanih za sadržaj izoflavona u tkivu životinja, kao i izloženost ljudi izoflavonima nakon konzumiranja ovih

namirnica. Urpi-Sarda i sar. (2008) su pratili distribuciju izoflavona u različitim tkivima ovaca nakon konzumacije silaže crvene deteline. Utvrdili su najviše koncentracije ekvola i daidzeina u bubrezima i jetri, dok u ostalim organima, među kojima su bili i mišići, sadržaj ukupnih izoflavona bio je niži od 10 nmol/g. Gatta i sar. (2013) su ispitivali sadržaj izoflavona u mišiću *m. longissimus lumborum* svinja hranjenih sojinom sačmom sa dodatkom graška ili boba tokom 150 dana eksperimenta. Utvrdili su da se koncentracija daidzeina kretala od 0,31 do 0,78 µg/g, koncentracija genisteina je bila nešto niža (od 0,1 do 0,69 µg/g), dok glicitein i ekvol nisu detektovani u mišićima. Mogućnost da se genistein deponuje u mišićima pastirmke, kao i zavisnost doze (0, 500, 1000 i 3000 mg/kg genisteina) u hrani na nivo genisteina u tkivu pratili su D'Souza i sar. (2005). Pokazali su da je sadržaj genisteina bio viši nakon 6, nego nakon 12 meseci suplementacije genisteinom. Studija koja se bavila sadržajem izoflavona u tkivu nosilja izvedena je od strane Vargas Galdos (2009). Pokazano je da nakon 28 dana suplementacije izoflavonima u mišiću nosilja sadržaj daidzeina je bio 97 µg/100g, sadržaj genisteina i ekvola je bio ispod nivoa kvantifikacije, dok glicitein takođe nije bio detektovan.

Fundamentalne informacije o bioraspoloživosti, metabolizmu i deponovanju najznačajnijeg izoflavona genisteina u organizmu proizvodnih životinja ključno je u proceni i razumevanju bioefikasnosti genisteina unetog preko hrane animalnog porekla u prevenciji bolesti i zaštiti zdravlja ljudi. Pored brojnih studija u kojima se ispitivao uticaj ishrane, vrste, pola i starosti životinja na bioraspoloživost genisteina, i dalje nije dovoljno razjašnjen uticaj ovih faktora na njegovu koncentraciju u tkivima (Chen i Bakhiet, 2006). Iz navedenih razloga postoji potreba da se utvrdi da li deponovanje genisteina u mišićima brojlera može dostići određeni nivo da se meso brojlera može smatrati relevantnim izvorom genisteina u ishrani ljudi.

### **3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA**

Poslednjih godina veliki deo naučne javnosti bavi se mogućnostima ekstrakcije, formulisanja i primene različitih biljnih ekstrakata i pojedinačnih aktivnih supstanci poreklom iz biljaka u hrani za životinje u cilju dobijanja novih aditiva koji bi potencijalno imali pozitivni efekat na proizvodne performanse i zdravlje životinja i koji bi se mogli deklarirati kao stimulatori rasta. Imajući u vidu niz uslova koji aditivi u hrani za životinje moraju da ispunjavaju (identifikacija, interakcija, efikasnost, bezbednost), za derivate biljaka kao što su ekstrakti izoflavona, ograničena su saznanja o mehanizmima dejstva i kompleksnosti njihovog fitohormonalnog efekta, zbog čega se i javljaju problemi u vezi legislative ovakvih proizvoda. Kako postoji dosta podataka u literaturi vezanih za preparate koji su mešavine različitih flavonoidnih jedinjenja, a malo je studija koje su se bavile uticajem čiste supstance genisteina u hrani brojlera i to samo tokom šest nedelja tova, a uzimajući u obzir uticaj doze i starosti životinja na estrogenu efikasnost genisteina, cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je ispitivanje opravdanosti upotrebe izoflavona genisteina u ishrani brojlera i njegov efekat na zdravstveni status, proizvodne rezultate, antioksidativni kapacitet, histomorfološke parametre, mikrobiotu digestivnog trakta i kvalitet i prinos mesa brojlera. Za ostvarenje ovog cilja tokom tova (konvencionalni tov do 42. dana i produženi tov do 58. dana), definisani su sledeći zadaci:

- ispitivanje hemijskog sastava potpunih smeša za tov brojlera I (1.-10. dana tova), II (11.-20. dana tova) i III (21.-58. dana tova) i antioksidativnog kapaciteta potpune smeše za tov brojlera III sa dodatkom različitih količina ekstrahovanog izoflavona genisteina;
- ispitivanje uticaja različitih koncentracija ekstrahovanog izoflavona genisteina na zdravstveno stanje brojlera (praćenje morbiditeta i mortaliteta);
- ispitivanje proizvodnih rezultata (telesna masa piladi, dnevni i ukupni prirast, dnevna i ukupna konzumacija, konverzija);
- ispitivanje uticaja genisteina na histomorfološke karakteristike pojedinih segmenata digestivnog trakta brojlera;
- ispitivanje uticaja različitih količina genisteina u hrani na broj bakterija mlečne kiseline u cekumu brojlera;
- ispitivanje uticaja dodavanja genisteina u hrani za brojlere na sadržaj ukupnih proteina jetre i aktivnost enzima antioksidativne zaštite superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GSH-Px) u homogenatima jetre;

- ispitivanje koncentracije ukupnog holesterola i triglicerida u krvnom serumu brojlera;
- ispitivanje sadržaja genisteina u mesu grudi brojlera;
- ispitivanje uticaja rastućih količina genisteina u hrani na apsolutnu i relativnu masu tibije, sadržaj pepela, Ca i P;
- ispitivanje uticaja dodavanja različitih količina genisteina u hrani za brojlere na parametre prinosa mesa (masa trupa, randman, masa delova trupa i njihovo učešće u masi trupa, masa i učešće mesa, kostiju, kože grudi i bataka s karabatakom), apsolutnu i relativnu masu slezine, jetre, srca i jajnika (udeo u telesnoj masi), kvalitet i održivost mesa (hemijski sastav mesa, pH vrednost, sposobnost vezivanja vode, sadržaj malondialdehida, senzorske karakteristike);
- ispitivanje ekonomske isplativosti korišćenja izoflavona genisteina u ishrani brojlera.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1.1. Etičko odobrenje

Sprovođenje oglada i sve procedure koje su izvedene odobrene su od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, kao i od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede – Uprava za veterinu (Rešenje br. 323-07-00364/2017/05/2, od 13.07.2017. godine u Beogradu).

### 4.1.2. Izbor materijala, uslovi gajenja i hranjenja brojlera

Za ogled su korišćena jednodnevna pilad provenijencije Cobb 500 koji su poreklom bili iz komercijalne inkubatorske stanice. Ispitivanja su izvedena na piladima oba pola prosečne inicijalne mase  $44,11 \pm 4,25$  g. Smeštaj brojlera po svim normativima (preventivne mere i nega) bio je prilagođen podnom načinu uzgoja, gde je hranjenje i pojenje bilo po volji (*ad libitum*) sa kontinuiranim osvetljenjem. Tokom oglada pilad je držana u zoohigijenskim i mikroklimatskim uslovima koji su u potpunosti odgovarali tehnološkim standardima određenim vodičem za uzgoj brojlera Cobb 500 provenijencije (Anon, 2012).

Brojleri su do 21. dana bili hranjeni potpunim smešama standardnog sirovinskog i hemijskog sastava za ishranu piladi u početnoj fazi tova (od 1. do 10. dana potpuna smeša za tov piladi I u obliku drobljenih peleta; od 11. do 20. dana potpuna smeša za tov piladi II u obliku peleti dužine 1 cm) (Tabela 4.1.). Nakon druge faze tova ukupno 360 brojlera starosti 21 dan izmereni su i podeljeni po grupama tako da mase piladi, kao i odnos muških i ženskih jedinki, bude sličan među eksperimentalnim grupama. Ptice su bile podeljene u pet grupa (po 72 jedinke) sa po šest bokseva. Trideset odeljaka u proizvodnom objektu sa betonskim podom, površine po  $3 \text{ m}^2$  bila su prekrivena prostirkom od drvene strugotine debljine 12 cm, tako da je po 12 brojlera bilo raspoređeno po odeljku (boksu). U završnoj fazi tova, od 21. do 42. i od 43. do 58. dana, brojleri su bili hranjeni potpunom smešom za tov piladi III (Tabela 4.1.). Smeše na bazi kukuruza i sojine sačme su bile izbalansirane i u potpunosti su zadovoljavale potrebe životinja u svim fazama tova (NRC, 1994).

Tabela 4.1. Sirovinski i kalkulatívni sastav smeša (kontrolne i oglednih grupa) za ishranu brojlera u tovu

	<i>Potpuna smeša za tov piladi I</i>	<i>Potpuna smeša za tov piladi II</i>	<i>Potpuna smeša za tov piladi III</i>
<b>Komponente (%)</b>			
Kukuruz, zrno	50,85	44,15	44,95
Pšenica, zrno	/	10,00	15,00
Sojin griz	15,00	17,00	20,00
Sojina sačma (44%)	12,40	1,00	1,00
Sojina pogača (41,5%)	17,00	23,30	14,70
Monokalcijum fosfat	1,20	1,00	0,90
Stočna kreda	1,60	1,60	1,60
Stočna so	0,35	0,35	0,35
Premiks*	1,00	1,00	1,00
Lizin	0,20	0,20	0,10
Metionin	0,20	0,20	0,20
Adsorbent	0,20	0,20	0,20
Ukupno	100	100	100,0
<b>Kalkulatívni sastav smeša (%)</b>			
Metabolička energija (MJ/kg)	12,64	12,96	13,22
Pepeo	6,30	6,03	5,55
Mast	6,04	6,65	7,19
Sirova vlakna	3,22	3,08	3,47
Sirovi proteini	22,68	21,80	19,05
Vlaga	11,16	11,27	10,41
Lizin	1,49	1,42	1,10
Metionin+cistein	0,84	0,83	0,82
Triptofan	0,31	0,28	0,22
Kalcijum	1,08	1,02	1,08
Fosfor	0,61	0,58	0,71
BEM <sup>†</sup>	49,18	51,18	54,33

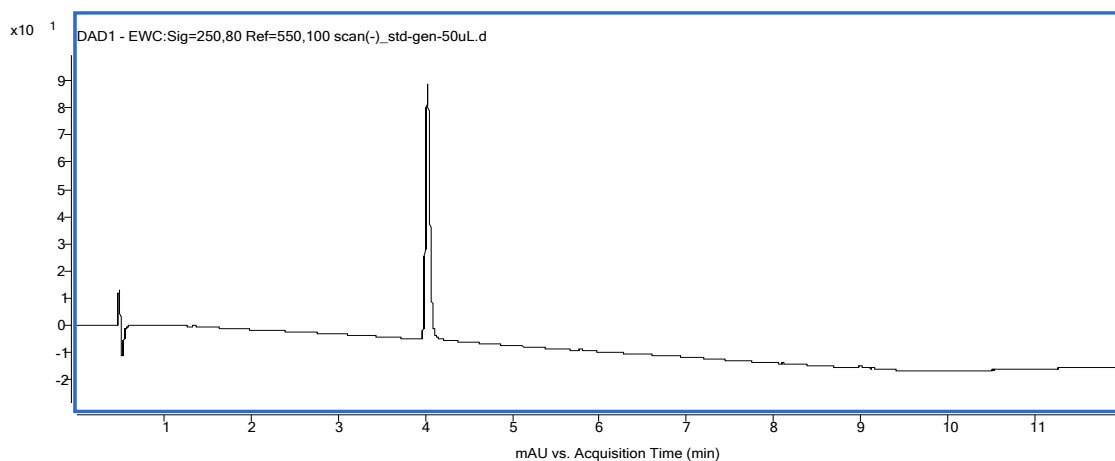
\* Mineralno-vitaminski premiks po kg smeše obezbeđuje: Vitamin A 15000 IU; Vitamin D3 5000 IU; Vitamin E 80 IU; Vitamin B1 3,76 mg; Vitamin B2 6,26 mg; Vitamin B6 3,76 mg; Vitamin B12 0,02 mg; Vitamin K3 3,78 mg; Holin 400 mg; Nikotinska kiselina 62,5 mg; Pantotenska kiselina 10 mg; Folna kiselina 1.25 mg; D-biotin 0,10 mg; Cink 80 mg; Magnezijum 120 mg; Gvožđe 78,5 mg; Bakar 19,92 mg; Kobalt 1,4 mg; Selen 2,2 mg; Antioksidans 100 mg

<sup>†</sup> Bezazotne ekstraktivne materije

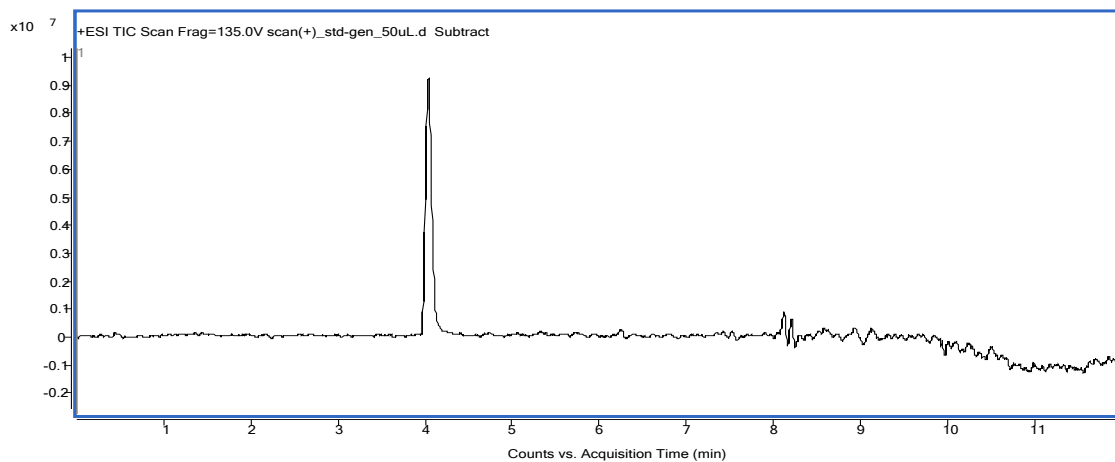
U hranu oglednih grupa brojlera dodata je različita količina preparata “High quality Genistein 98% 446-72-0 HPLC” (Xi'AnHuilin Bio-Tech Co., Ltd., Xian, Shaanxi, P.R. China) koji je 99,6% čisti ekstrakt genisteina dobijen iz korena biljaka *Sophora subprostrata* Chun et T. Chen i *Genista tinctoria* L. Tako su sve eksperimentalne grupe brojlera dobijale hranu standardnog sirovinskog i hemijskog sastava u završnoj fazi tova, s tim da kontrolna grupa (K) nije u hranu dobijala preparat genisteina, ogledna grupa I (O-I) je dobijala 200 mg/kg, ogledna grupa II (O-II) 400 mg/kg, ogledna grupa III (O-III) 600 mg/kg i ogledna grupa IV (O-IV) 800 mg/kg hrane preparata genisteina. Eksperiment se sastojao iz dva dela: prvi period koji je trajao 21 dan (od 21. do 42. dana tova) i drugi period produženog tova koji je trajao 37 dana (od 21. do 58. dana tova).

### 4.1.3. Čistoća ekstrakta genisteina

Za određivanje čistoće ekstrakta prvo je napravljan rastvor ekstrakta u metanolu koncentracije 1 mg/ml, koji je zatim razblažen 1000 puta 80% metanolom i profiltriran kroz 0,45 µm membranski filter od regenerisane celuloze. Ovako pripremljen uzorak je analiziran HPLC-DAD-ESI-MS/MS tehnikom prema prethodno validovanoj i publikovanoj metodi od strane Orčić i sar. (2014). Značajne količine primesa u ekstraktu nisu uočene ni na UV hromatogramu, ni u MS hromatogramima snimljenim u pozitivnom i negativnom modu (Grafici 4.1.; 4.2.; 4.3.).

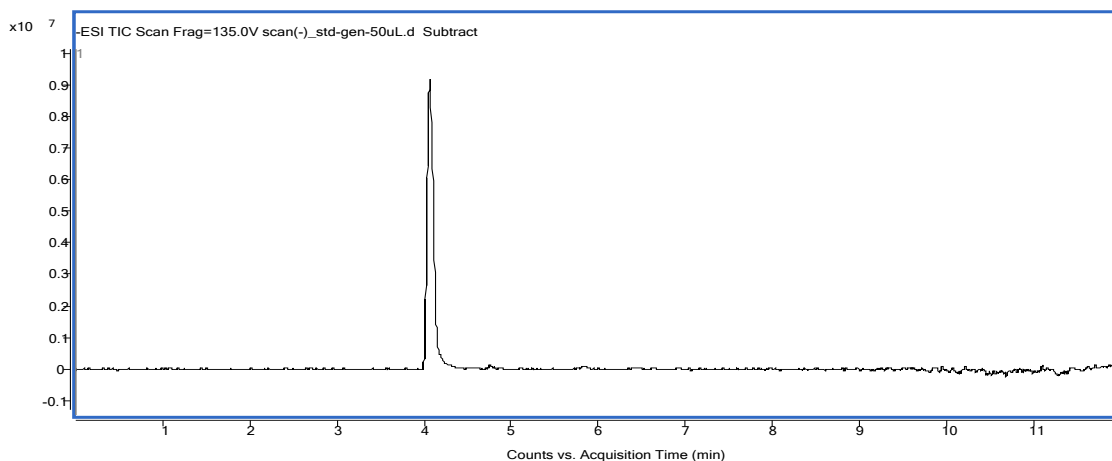


Grafik 4.1. LC-UV hromatogram ekstrakta genisteina



Grafik 4.2. LC-MS hromatogram ekstrakta genisteina snimljen u pozitivnom modu





Grafik 4.3. LC-MS hromatogram ekstrakta genisteina snimljen u negativnom modu

#### 4.1.4. Plan ispitivanja

Na početku prve i druge faze tova (1. i 10. dan) uzimani su uzorci potpunih smeša za ishranu brojlera I i II, a 21. dana eksperimenta, kada su brojleri podeljeni po grupama, ispitan je hemijski sastav, antioksidativni kapacitet i sadržaj genisteina u potpunoj smeši za tov brojlera III. Na kraju svake faze tova, kao i na kraju konvencionalnog (do 42. dana) i produženog (do 58. dana) tova brojlera, utvrđeni su parametri za ispitivanje proizvodnih rezultata (telesna masa, prirast, konzumacija i konverzija). Na klanici, zaklano je 36 jedinki po grupi nakon 42. i 58. dana tova, i uzimani su uzorci krvnog seruma za određivanje lipidnog statusa, utvrđeni su parametri mesnatosti trupova i parametri fizičkih osobina mesa (pH, temperatura, sposobnost vezivanja vode). Takođe, uzeti su uzorci za histološka ispitivanja pojedinih segmenata creva, uzorci crevnog sadržaja za mikrobiološku analizu, uzorci jetre za određivanje sadržaja ukupnih proteina i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT i GSH-Px), uzorci mesa za hemijsku analizu i senzornu analizu i uzorci kostiju za ispitivanje sadržaja Ca i P. Uzorci su, u zavisnosti od vrste analize, bili zamrzavani na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  ili fiksirani u puferisanom 10% formalinu do momenta analize.

## 4.2. Metode ispitivanja

### 4.2.1. Zdravstveno stanje

Tokom čitavog ogleada zdravstveno stanje brojlera bilo je praćeno korišćenjem standardnih procedura. Sve ogledne jedinice su se nalazile pod stalnom veterinarskom kontrolom. Svakodnevna opservacija je vršena pojedinačnom i grupnom adspekcijom i sve promene zdravstvenog stanja su praćene i zabeležene.

#### 4.2.2. Hemijske analize hrane

Za hemijska ispitivanja hrane za ishranu brojlera tokom oglada korišćene su sledeće procedure:

- *Određivanje sadržaja sirovih proteina (SRPS ISO 5983:2000)*

*Princip metode:* zagrevanjem uzorka sa koncentrovanom sumpornom kiselinom organske materije se oksiduju do ugljene kiseline, a azot, koji se pri tome oslobađa u obliku amonijaka, gradi sa sumpornom kiselinom amonijum sulfat. Dejstvom baze na stvoreni amonijum sulfat oslobađa se amonijak koji se titruje kiselinom poznatog molariteta. Na osnovu određene količine amonijaka preračunava se količina azota u ispitivanom uzorku (User Manuel™ Digestor, 1001 3846/Rev.4, Foss, Sweden; Manuel book – Kjeltex Auto 1030 Analyzer, Tecator, Sweden).

- *Određivanje sadržaja vlage i drugih isparljivih materija (SRPS ISO 6496:2001)*

*Princip metode:* gubitak mase dela uzorka za ispitivanje koji nastaje sušenjem na  $103 \pm 2$  °C.

- *Određivanje sadržaja masti (SRPS ISO 6492:2001)*

*Princip metode:* vrši se hidroliza dela uzorka za ispitivanje sa hlorovodoničnom kiselinom uz zagrevanje. Nakon hlađenja i filtriranja rastvora, ostatak se ispere i osuši, a zatim se mast iz ostatka ekstrahuje petroletrom korišćenjem aparature po Soxhlet-u. Rastvarač se ukloni destilacijom i sušenjem, a ostatak se izmeri.

- *Određivanje sadržaja sirovog pepela (SRPS ISO 5984:2013)*

*Princip metode:* razgradnja organske materije iz dela uzorka za ispitivanje žarenjem na 550 °C i merenje dobijenog pepela.

- *Određivanje sadržaja kalcijuma (volumetrijska metoda) (SRPS ISO 6490-1:2001)*

*Princip metode:* sagorevanje dela uzorka za analizu, tretiranje pepela hlorovodoničnom kiselinom i taloženje kalcijuma u obliku kalcijum-oksalata. Talog se rastvori u sumpornoj kiselini, a oslobođena oksalna kiselina se titruje standardnim rastvorom kalijum-permanganata.

- *Određivanje sadržaja fosfora (spektrometrijska metoda) (SRPS ISO 6491:2002)*

*Princip metode:* spaljivanje dela uzorka za ispitivanje krečom na 550 °C i zagrevanje sa kiselinom. Alikvotni deo kiselog rastvora pomeša se sa molibdovanadat reagensom i meri se apsorbancija dobijenog žutog rastvora na talasnoj dužini od 430 nm.

- *Određivanje sadržaja sirove celuloze (metoda sa međufiltracijom) (SRPS ISO 6865:2004)*

*Princip metode:* deo uzorka za ispitivanje tretira se ključalom razblaženom sumpornom kiselinom. Ostatak se odvaja filtracijom, ispira i tretira ključalim rastvorom kalijum-hidroksida. Nakon odvajanja ostatka filtracijom, ispiranja, sušenja i merenja, ostatak se žari. Gubitak mase nakon žarenja odgovara masi sirove celuloze u delu uzorka za ispitivanje.

- *Određivanje bezazotnih ekstraktivnih materija (BEM)*

Sadržaj bezazotnih ekstraktivnih materija (BEM) (%) se određuje računski prema formuli:  $BEM = 100 - (\% \text{ vlaga} + \% \text{ pepeo} + \% \text{ celuloza} + \% \text{ proteini} + \% \text{ mast})$  (Sinovec i Ševković, 2008).

#### **4.2.2.1. Analiza genisteina u hrani**

*Priprema uzorka:* po 2 g uzoraka hrane ekstrahuje se sa po 20 ml metanola, tokom 1 h uz mućkanje i ceo proces ekstrakcije se ponavlja 3 puta. Spojeni ekstrakti se profiltriraju. Nakon uparavanja do suva i rekonstituisanja u 1 ml DMSO (dimetilsulfoksid) ekstrakt se razblaži 400 puta 80% metanolom i profiltrira kroz 0,45 µm membranski filter od regenerisane celuloze.

*Postupak:* Sadržaj genisteina u uzorcima hrane određen je HPLC-DAD-ESI-MS/MS tehnikom prethodno opisanom od strane Orčić i sar. (2014). Injektuje se po 5 µl uzorka. Kao mobilna faza A koristi se 0,05% V/V mravlja kiselina, a kao faza B – MeOH. Komponente se eluiraju u gradijentnom režimu: 0 min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, post time 3 min (ukupno vreme analize 15 min), uz konstantan protok od 1 ml/min. Standardi se prave u seriji od 7 duplih razblaženja u opsegu od 97,7 ng/ml do 6250 ng/ml. Razdvajanje se postiže na Rapid Resolution HT Zorbax Eclipse XDB-C18 50 mm x 4,6 mm, 1,8 µm koloni (Agilent Technologies) temperiranoj na 50 °C, ispred koje je vezan in-line filter (2 mm, 0,2 µm, Agilent Technologies). Celokupna količina eluata prosleđuje se u maseni spektrometar. Parametri jonskog izvora su: protok gasa za sušenje (N<sub>2</sub>) 10 l/min, temperatura 350 °C, pritisak gasa za nebulizaciju 50 psi, napon na kapilari 4 kV, negativni polaritet. Genistein se prati u SRM modu (eng. selected reactions monitoring), uz optimizovane parametre: m/z prekursora 269, m/z produkta 133, napon fragmentora 145 V, napon kolizione ćelije 32 V, scan time 200 ms. Kvantifikacija se radi metodom eksternog standarda. Za svaki uzorak koriste se samo 4 najbliža standarda.

#### 4.2.2.2. Antioksidativni kapacitet hrane

Za analizu antioksidativne aktivnosti hrane korišćena su dva testa: sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (LP) i FRAP test.

*Priprema metanolnih ekstrakata hrane:* Uzorci hrane se podvrgnu postupku maceracije koristeći metanol kao ekstragens (2 g hrane ekstrahuje se tri puta sa po 20 ml metanola u toku 60 min uz konstantno mućkanje). Nakon filtriranja, ekstrakt se upari do suva, a suvi ostaci se rastvore u 1 ml DMSO. Dobijeni ekstrakti su koncentracije 2 g hrane/1 ml.

##### – Inhibicija lipidne peroksidacije (LP)

Sposobnost ispitivanih ekstrakata da inhibiraju lipidnu peroksidaciju određena je TBA metodom (Miller i Aust, 1989). Polinezasićene masne kiseline izolovane iz semena lana, ekstrakcijom po Soxhlet-u, koriste se kao supstrat za lipidnu peroksidaciju izazvanu  $Fe^{2+}$  jonima u sinergizmu sa askorbatom. Krajnji produkt lipidne peroksidacije, MDA (malondialdehid), sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) gradi obojeni kompleks.

*Reagensi:* (1) Fosfatni pufer, pH=7,4; 0,067 M: 1,7506 g  $KH_2PO_4$  i 9,6334 g  $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$  u 1000,0 ml destilovane vode (n.s.). (2) Emulzija masnih kiselina iz lanenog ulja u vodi, 0,035%: 35  $\mu$ l lanenog ulja i 250  $\mu$ l Tween-80 u 100,0 ml fosfatnog pufera pH=7,4, 0,067 M držati na ultrazvučnom kupatilu 90 min. (3) Rastvor gvožđe-(II)-sulfata, 4,58 mM: 0,0127 g  $FeSO_4 \times 7H_2O$  u 10 ml destilovane vode. (4) Osnovni rastvor askorbinske kiseline, 3,49 M: 0,0615 g  $C_6H_8O_6$  rastvoreno u 100 ml destilovane vode (n.s.). (5) Radni rastvor askorbinske kiseline, 0,087 mM: 10  $\mu$ l osnovnog rastvora pomešano sa 390  $\mu$ l destilovane vode. (6) Rastvor dinatrijumove soli etilendiamin-tetrasirćetne kiseline (EDTA), 3,72%: 1,86 g  $Na_2H_2EDTA$  u 50,0 ml destilovane vode. (7) TBA reagens: 3,0 g tiobarbiturne kiseline (TBA), 120,0 g trihlorsirćetne kiseline (TCA) i 10,4 ml perhlorne kiseline ( $HClO_4$ ) u 800,0 ml destilovane vode.

*Uzorci:* Pripremljena je serija dvostrukih razblaženja ispitivanih ekstrakata hrane u DMSO, u intervalu početnih koncentracija 0,06-2 g hrane/ml (6 razblaženja).

*Postupak:* Za svaku koncentraciju ekstrakta hrane pripremljene su po tri radne probe i jedna korekcija. Radne probe sadrže: 1,5 ml emulzije masnih kiselina, 20  $\mu$ l uzorka, 10  $\mu$ l  $Fe_2SO_4$ , 10  $\mu$ l askorbata. Korekcije sadrže: 1,5 ml pufera, 20  $\mu$ l uzorka, 10  $\mu$ l  $Fe_2SO_4$ , 10  $\mu$ l askorbata. Kontrole sadrže: 1,5 ml emulzije masnih kiselina, 20  $\mu$ l DMSO, 10  $\mu$ l  $Fe_2SO_4$ , 10  $\mu$ l askorbata. Po isteku 60 minuta inkubacije na 37 °C, u sve probe doda se 100  $\mu$ l EDTA i 1 ml TBA reagensa. Nakon toga,

sve epruvete se zagrevaju na ključalom vodenom kupatilu u toku 15 min, centrifugiraju 10 minuta na 3500 o/min, a apsorbancija se meri na 532 nm. Faktor razblaženja u epruveti: 10/2640.

– *FRAP test (Feric ion Reducing Antioxidant Power)*

FRAP test se zasniva na redukciji  $[\text{Fe}^{3+}\text{-}2,4,6\text{-tris}(2\text{-piridil})\text{-s-triazin}]$  kompleksa do intenzivno plavo obojenog  $[\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}]$  kompleksa u kiseloj sredini (Benzie i Strain, 1996).

*Reagensi:* (1) Acetatni pufer, pH=3,6: 155,0 mg  $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$  i 800  $\mu\text{l}$   $\text{ccCH}_3\text{COOH}$  u 50 ml destilovane vode (n.s.). (2) 2,4,5-tripiridil-s-triazin (TPTZ), 10 mM rastvor u 40 mM HCl: 15,6 mg TPTZ u 5 ml 40 mM HCl (20  $\mu\text{l}$  36% HCl u 4,980 g  $\text{dH}_2\text{O}$ ). (3) Gvožđe (III)-hlorid, 20 mM: 27,0 mg  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  u 5 ml destilovane vode. FRAP reagens se dobija mešanjem pripremljenih rastvora (1), (2) i (3) u odnosu 50:5:5.

*Kalibraciona kriva:* Askorbinska kiselina, 1,024 mg/ml: 0,1024 g askorbinske kiseline u 100 ml destilovane vode (n.s.).

*Uzorci:* Početne koncentracije uzoraka hrane u DMSO su: 2,0 g/ml, 1,0 g/ml i 0,5 g/ml.

*Postupak:* Ispitivanja se rade sa tri koncentracije svakog uzorka. Radne probe se rade u tri ponavljanja. Radne probe sadrže: 300  $\mu\text{l}$  Frap reagensa i 10  $\mu\text{l}$  uzorka. Korekcije sadrže: 300  $\mu\text{l}$  destilovane vode i 10  $\mu\text{l}$  uzorka. Slepa proba sadrži: 300  $\mu\text{l}$  FRAP reagensa i 10  $\mu\text{l}$  destilovane vode. Po isteku 6 minuta, apsorbancije se mere na talasnoj dužini od 593 nm na čitaču mikrotitar ploča (Multiskan reader). Faktor razblaženja u well-u: 10/310.

#### **4.2.3. Proizvodni rezultati**

Kontrolna merenja oglednih jedinki izvršena su pri useljavanju jednodnevnih brojlera (1. dan), a zatim i nakon svake faze tova (10., 21., 42. i 58. dan). Merenja su izvršena na elektronskoj vagi sa tačnošću od 1 g. Iz razlika telesnih masa na početku i kraju svake faze tova, kao i na osnovu trajanja svake faze tova, izračunat je ukupni i dnevni prirast za svaku fazu tova. Na kraju svake faze, tokom celog oglada, izmerena je količina utrošene hrane i rastur hrane za svaku grupu (ova merenja su vršena po boksevima, 6 po grupi). Iz dobijenih podataka o utrošku i rasturu hrane izračunata je ukupna i dnevna konzumacija posebno za svaku fazu tova. Na osnovu podataka o utrošku hrane (konzumaciji) i prirastu izračunata je konverzija hrane za svaku fazu tova (pri ovom izračunavanju boks je bio eksperimentalna jedinica).

#### **4.2.4. Analiza krvnog seruma (holesterol i trigliceridi)**

Uzorci krvi uzimani su na klanici za oba eksperimentalna perioda u epruvetama za separaciju seruma koje sadrže inertni gel (8 ml). U toku 1 h uzorci su centrifugirani 15 minuta na 3000g kako bi se izdvojio serum. Enzimskim, kolorimetrijskim GPO/PAP i CHOD-PAP testom određena je koncentracija triglicerida i holesterola pri čemu je korišćen automatski biohemijski analizator (RA-1000, Bayer Corp., Tarrytown, NY, USA).

#### **4.2.5. Masa organa**

Nakon evisceracije trupova, po 36 brojlera 42. i 58. dana eksperimenta, sa jetre, slezine, srca i jajnika uklonjeno je sve adherirajuće tkivo i izmerena je masa ovih organa na vagi sa preciznošću od 1 g. Nakon određene apsolutne mase organa izračunata je i relativna masa organa u odnosu na živu masu brojlera za svaki period.

#### **4.2.6. Histološka ispitivanja**

Za oba eksperimentalna perioda (42. dan i 58. dan), odmah nakon klanja, gastrointestinalni trakt 18 brojlera po grupi (3 brojlera po boksu) je izvađen i segmenti dugi približno 1 cm su uzeti iz srednjeg dela duodenuma, jejunuma i ileuma, isprani fiziološkim rastvorom i fiksirani u puferisanom 10% rastvoru formalina [10% formalin (37-40%),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  4.0 g i  $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  6.5 g] tokom 24h. Nakon fiksacije i oblikovanja, uzorci creva (jedan uzorak za svaki od tri intestinalna segmenta po brojleru) su dehidrirani u rastućim koncentracijama etil alkohola, prosvetljeni u ksilolu, infiltrirani parafinom i uklopljeni u parafinske blokove. Preseci debljine od 5-8  $\mu\text{m}$  postavljeni su na staklenu pločicu i bojani Majerovim hematoksilinom i eozinom (Smirnov i sar., 2005). Histomorfometrijske analize izvršene su korišćenjem svetlosnog mikroskopa Olympus BX53, sa kamerom UC50. Na svakom poprečnom preseku odabrano je 10 polja koja su mikroskopski bila ispitana korišćenjem „Olympus cellSens” softvera ([www.olympus-lifescience.com](http://www.olympus-lifescience.com)). Morfometrijska analiza obuhvatala je visinu resica, širinu resica i dubinu kripte. Na osnovu ovih merenja izračunat je odnos Visina resice/Dubina kripte za svaki intestinalni segment (duodenum, jejunum i ileum) (Aptekmann i sar., 2001).

#### **4.2.7. Mikrobiološka ispitivanja**

Na kraju konvencionalnog (42 dana) i produženog (58 dana) tova neposredno nakon klanja i evisceracije brojlera uzet je sadržaj cekuma (po 6 uzoraka iz svake grupe, odnosno jedan uzorak po boksu) radi utvrđivanja ukupnog broja bakterija mlečne kiseline u ovom segmentu digestivnog trakta. Uzorci za bakteriološka ispitivanja uzeti su direktno iz creva sterilnim špricom i transportovani u hladnim uslovima do laboratorije. Oko 1 g crevnog sadržaja, uzet od svakog

uzorka, dodat je u 9 ml fiziološkog rastvora (0,9% NaCl) i homogenizovan tokom 3 minuta na vortex mikseru. Od ovih homogenata su pravljena decimalna razblaženja od  $10^{-2}$  do  $10^{-9}$ . Kako bi se odredio broj *Lactobacillus* spp., 0,1 ml odgovarajućeg razblaženja zasejavano je direktno na selektivnu podlogu MRS agara (MRS, Hi Media, India). Petri ploče su inkubirane pri temperaturi 30 °C tokom 72 h, a mikroaerofilni uslovi su bili obezbeđeni primenom Anaerocult A GasPak CO<sub>2</sub> sistema (Merck, Darmstadt, Germany). Rezultati su izražavani kao log CFU po gramu intestinalnog sadržaja.

#### **4.2.8. Određivanje ukupnih proteina i aktivnosti antioksidativnih enzima u homogenatima jetre**

Na kraju konvencionalnog (42 dana) i produženog (58 dana) tova, neposredno nakon klanja i evisceracije brojlera, uzeti su uzorci jetre i zamrznuti u tečnom azotu (-196 °C). U homogenatima jetre pilića određena je aktivnost superoksid-dizmutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation-peroksidaze (GSH-Px).

*Priprema homogenata:* Homogenati se prave u odnosu 1:3 u 5 mM TRIS-HCl puferu, pH 7,4 (na 500 mg jetre dodato je 1500 µl pufera). Sadržaj se homogenizuje pomoću ultrazvučnog homogenizatora (Bandelin Sonopuls) u toku 30 sekundi. Homogenati se zamrznu pri temperaturi od -20 °C. Nakon odmrzavanja homogenati se centrifugiraju na 7000 o/min na 4 °C u toku 10 min, a supernatant se razblaži 10x sa 5 mM TRIS-HCl puferu, pH=7,4.

##### *– Određivanje ukupnih proteina jetre*

Ukupni proteini određeni su metodom po Gornall i sar. (1949), koja se zasniva na biuretskoj reakciji, tj. osobini peptidne veze da u alkalnoj sredini sa jonima Cu<sup>2+</sup> gradi kompleks plavo-ljubičaste boje sa maksimumom apsorpcije na 540 nm.

*Reagensi:* Osnovni rastvor Biuret reagensa: a) 10% NaOH (10,0 g NaOH se rastvori u 1000 ml destilovane vode), b) 22,5 g K-Na-tartarata, 2,5 g kristalnog CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O i 2,5 g KJ se rastvori u 300 ml 10% NaOH i dopuni do 1000 ml sa destilovanom vodom (dH<sub>2</sub>O). Radni rastvor Biuret reagensa dobija se razblaživanjem osnovnog rastvora sa dH<sub>2</sub>O u odnosu 1:1. Standardni rastvor albumina goveđeg seruma: 1 g albumina goveđeg seruma rastvoren u 100 ml destilovane vode.

*Postupak:* Radna proba: 250 µl radnog rastvora Biuret reagensa i 50 µl homogenata; Slepa proba: 250 µl radnog rastvora Biuret reagensa i 50 µl dH<sub>2</sub>O. Probe se inkubiraju 30 min na sobnoj temperaturi, a potom se meri apsorbanca na talasnoj dužini od 540 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific). Od apsorbanca radne probe oduzima se apsorbanca slepe probe, a zatim izračunava koncentracija proteina u uzorcima na osnovu kalibracione krive za albumin. Za izradu

kalibracione krive koristi se standardni rastvor albumina goveđeg seruma u seriji početnih koncentracija od 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml, 3,125 mg/ml, 1,5625 mg/ml, 0,7813 mg/ml, u dva ponavljanja.

– Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD)

Aktivnost superoksid-dizmutaze određena je po metodi Umasuthan i sar. (2012) u kojoj se prati koncentracija superoksid anjona na osnovu intenziteta obojenjana 560 nm ljubičasto obojenog NBT-formazana nastalog u reakciji superoksid anjona i NBT reagensa. Superoksid anjon se generiše *in situ* dodatkom enzima ksantin-oksidge i njenog supstrata ksantina. Aktivnost SOD je obrnuto proporcionalna koncentraciji superoksid anjona. Aktivnost SOD izražena je u  $\mu\text{mol}$  potrošenog SOA  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteina.

*Reagensi:* a) 50 mM fosfatni pufer pH 8; b) 3 mM ksantin: 0,6 ml 10 mM ksantina u 1M NaOH i 1,4 ml fosfatnog pufera pH 8; c) 3 mM EDTA u destilovanoj vodi; d) 0,15% (w/v) BSA (bovine serum albumin); e) 0,75 mM NBT u destilovanoj vodi; f) 1200 mU/ml ksantin-oksidge.

*Postupak:* Blank proba, kontrola, radna proba i korekcija A za sam homogenat (160  $\mu\text{l}$  pufera, 6,75  $\mu\text{l}$  ksantin, 6,75  $\mu\text{l}$  EDTA, 6,75  $\mu\text{l}$  BSA, 6,75  $\mu\text{l}$  NBT). Po 5  $\mu\text{l}$  pufera blank probe i kontrole, i po 5  $\mu\text{l}$  homogenata radne probe i korekcije stavlja se 10 min na inkubaciju na 25 °C. Zatim se dodaje po 10  $\mu\text{l}$  pufera u blank probu i korekciju, i po 10  $\mu\text{l}$  ksantin oksidge u kontrolu i radnu probu i sve stavlja na inkubaciju 60 min na 25 °C. Nakon inkubacije od 60 min na 25 °C merena je apsorbancija na 560 nm na Multiskan Spectrum čitaču mikroploča (Thermo Fisher Scientific). Rezultati su izračunati na osnovu formule:

aktivnost SOD [U/mg proteina] =  $(\Delta A / (l \text{ (cm)} \times \epsilon \text{ (dm}^3 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})) \times V \text{ (dm}^3)) / (60 \text{ min} \times \text{mg proteina}) \times 1000000$ , gde su:  $\Delta A = \Delta A \text{ kontr} - \Delta A \text{ rp}$ ;  $\Delta A \text{ kontr} = A \text{ kontrole} - A \text{ korekcija kontrole}$ ;  $\Delta A \text{ rp} = A \text{ radne probe} - A \text{ korekcija radne probe}$ ;  $\epsilon = 30000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Witmer, 2012).

– Aktivnost katalaze (CAT)

Za određivanje aktivnosti katalaze korišćena je metoda koja se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju brzine raspadanja vodonik-peroksida delovanjem katalaze iz homogenata jetre (Beers i Sizer, 1952). Brzina raspadanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekvivalentna je brzini smanjenja apsorbance na 240 nm.

*Reagensi:* 50 mM fosfatni pufer pH 7; razblaženi rastvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (70  $\mu\text{l}$  30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 50 ml H<sub>2</sub>O).

*Postupak:* U UV mikrotitar ploču sa 96 bunarčića sa ravnim dnom (Thermo Scientific) odmeravaju se reagensi: radna proba (285  $\mu\text{l}$  pufera pH 7, 10  $\mu\text{l}$  homogenata i 5  $\mu\text{l}$  razblaženog rastvora H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);



slepa proba (290  $\mu$ l pufera pH 7 i 10  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O). Meri se apsorbance na 240 nm (Multiskan Spectrum čitač mikroploča (Thermo Fisher Scientific)) odmah nakon dodatka H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a zatim na svaki minut u toku 3 min. Za izračunavanje aktivnosti CAT uzima se razlika apsorbance između prvog i nultog minuta. Aktivnost CAT izražena je u U po mg proteina.

Rezultati su izračunati na osnovu formule:

aktivnost CAT [U/mg proteina] =  $(\Delta A \times 10^6 \times V_{\text{well}}) / 43,6 \times 10^4 \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{uz}} \times 0,7$ , gde su:  $\Delta A$  – promena apsorbance uzorka u minuti ( $\Delta A = A_{0 \text{ min}} - A_{1 \text{ min}}$ );  $C_{\text{pr}}$  – koncentracija proteina u uzorku [mg/ml];  $V_{\text{well}}$  – zapremina reakcione smeše [dm<sup>3</sup>];  $V_{\text{uz}}$  – zapremina homogenata [ml]; 0,7 – dužina pređenog puta svetlosti [cm];  $10^6$  – prevođenje iz mol u  $\mu$ mol;  $\epsilon = 4,36 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

– Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px)

Korišćena je metoda koja se zasniva na reakciji oksidacije redukovanog GSH do njegove oksidovane forme GSSG posredstvom glutation-peroksidaze u prisustvu supstrata kumol hidroperoksida (Edwards, 1996). Praćeno je smanjenje koncentracije GSH merenjem apsorbance produkta nastalog u reakciji GSH sa DTNB (5,5-ditio-bis (2-nitrobenzojeva kiselina)) na 412 nm.

*Reagensi:* Pufer I – 50 mM TRIS HCl pufer pH=7,6; Pufer II – 4 M TRIS HCl pufer pH=8,9; 0,6 g/l redukovani glutation (GSH) u puferu I; 4 g/l DTNB u puferu II; Kumol hidroperoksid – 50  $\mu$ l kumol hidroperoksida u 10 ml MeOH; 10% trihlorsirćetna kiselina (TCA).

*Postupak:* Radna proba (100  $\mu$ l homogenata, 700  $\mu$ l pufera I, 100  $\mu$ l GSH i 100  $\mu$ l kumol hidroperoksida); kontrola (100  $\mu$ l homogenata, 800  $\mu$ l pufera I i 100  $\mu$ l GSH). Radna proba i kontrola se stavljaju na inkubaciju 10 min na 37 °C. Zatim se reakcija zaustavlja sa 1 ml 10% TCA i centrifugira 10 min na 3000 o/min. Posle centrifugiranja 100  $\mu$ l supernatanta prebacuje se u mikrotitar ploču sa 96 bunarčića sa ravnim dnom, a zatim dodaje 10  $\mu$ l DTNB rastvora i 190  $\mu$ l pufera II. Nakon 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi očitava se apsorbance na 412 nm na Multiskan Spectrum čitaču mikroploča (Thermo Fisher Scientific).

Rezultati su izračunati na osnovu formule:

aktivnost GSH-Px [U/mg proteina] =  $((A_{\text{k}} - A_{\text{uz}}) \times 10^6 \times V_{\text{well}}) / (1,36 \times 10^4 \times C_{\text{p}} \times V_{\text{uz}} \times 0,7) / 10$  min, gde su:  $A_{\text{k}}$  – apsorbance kontrole;  $A_{\text{uz}}$  – apsorbance homogenata;  $C_{\text{p}}$  – koncentracija proteina homogenata [mg/ml];  $V_{\text{well}}$  – zapremina reakcione smeše [dm<sup>3</sup>];  $V_{\text{uz}}$  – zapremina homogenata u probi [ml]; 0,7 – dužina svetlosnog puta [cm];  $10^6$  – prevođenje mol u  $\mu$ mol;  $\epsilon = 1,36 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.9. Analize kostiju

Nakon rasecanja trupova i izdvajanja bataka sa karabatakom, sve meko tkivo i hrskavica su uklonjeni sa leve tibije i izmerena je masa ovih kostiju. Kao i kod ostalih organa, izračunata je i relativna masa tabije u odnosu na živu masu brojlera. Ovako pripremljene kosti (od 6 brojlera po boksu) zamrznute su u plastičnim kesama na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i čuvane do momenta određivanja mineralnog sastava. Nakon sušenja i spaljivanja uzoraka kostiju i određivanja sadržaja pepela, za hemijske analize kostiju korišćene su sledeće metode:

- *Određivanje sadržaja fosfora (spektrometrijska metoda) (SRPS ISO 6491:2002) (identična metodi navedenoj u potpoglavlju 4.2.2.)*

- *Određivanje sadržaja kalcijuma (metoda atomskeapsorpcione spektrometrije) (modifikovana SRPS ISO 6869:2008)*

*Princip metode:* sušenje dela uzorka za ispitivanje na  $103\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , suvo spaljivanje dela uzorka za analizu, tretiranje pepela hlorovodoničnom kiselinom i određivanje sadržaja kalcijuma atomskeapsorpcionom spektrometrijom (AAS) korišćenjem spektrofotometra (Perkin-Elmer AAnalyst 700 MHS, PerkinElmer Life and Analytical Science, Connecticut, United States), plamenom tehnikom iz rastvora uz prisustvo lantan hlorida.

#### 4.2.10. Određivanje prinosa mesa

Na kraju oba eksperimentalna perioda, brojlerima je uskraćena hrana 12 h pre klanja i izmerena je njihova masa pre klanja. Nakon omamljivanja električnom strujom zaklani su presecanjem jugularne vene i izmerena je masa trupova obrađenih na način «spremno za roštilj». Na osnovu dobijenih podataka izračunat je prinos trupova ili randman klanja. Nakon hlađenja i merenja mase, trupovi su rasecani na način propisan Pravilnikom o kvalitetu mesa pernate živine (Anon, 1988) na osnovne delove (batak sa karabatakom, grudi, krila, vrat, leđa sa karlicom) čija masa je takođe određena na vagi sa tačnošću od  $\pm 1\text{ g}$ . Na osnovu mase trupa i mase osnovnih delova izračunat je udeo svakog dela trupa u ohlađenom trupu brojlera. Grudi i batak sa karabatakom su iskošćeni kako bi se utvrdile mase i odnosi tkiva (mišićno tkivo, koža, kosti).

#### 4.2.11. Određivanje hemijskog sastava mesa

Za hemijsku analizu metodom slučajnog odabira (od 6 trupova iz svake grupe) uzimani su uzorci mišićnog tkiva grudi i bataka sa karabatakom, a korišćene su sledeće metode:

- *Određivanje sadržaja proteina prema standardu SRPS ISO 937:1992*
- *Određivanje sadržaja vode prema standardu SRPS ISO 1442:1998*
- *Određivanje sadržaja ukupne masti prema standardu SRPS ISO 1443:1992*
- *Određivanje sadržaja ukupnog pepela prema standardu SRPS ISO 936:1999*

Principi metoda identični su principima za utvrđivanje sadržaja proteina, vode, masti i pepela u uzorcima hrane za životinje navedenim u potpoglavlju 4.2.2.

#### 4.2.12. Merenje pH vrednosti i temperature mesa

Merenje pH vrednosti izvršeno je 15-30 minuta, 24 sata i 48 sati nakon klanja, na kraju konvencionalnog i produženog tova, pH-metrom «Testo 205» (Nemačka) koji meri pH i temperaturu mesa direktnim ubadanjem elektrode, odnosno sonde pH-metra, u muskulaturu grudi (*m. pectoralis*). Pre i tokom upotrebe pH-metar je kalibrisan standardnim fosfatnim puferima (pH pufera za kalibraciju je bio 7,00 i 4,00 na 20 °C). Merenja temperature izvršena su 15-30 minuta nakon klanja za oba eksperimentalna perioda.

#### 4.2.13. Analiza genisteina u mesu grudi

Sadržaj genisteina u mesu grudi brojlera određen je HPLC-DAD-ESI-MS/MS tehnikom po validovanoj metodi (Orčić i sar., 2014), nakon ekstrakcije genisteina iz uzoraka mesa po metodi D'Souza i sar. (2005).

*Priprema uzoraka mesa:* Na 2 g usitnjenog mišićnog tkiva dodaje se 9 ml Tris pufera (45 mmol dm<sup>-3</sup>, pH 7,4) i homogenizuje Ultra Turax-om (T18B, IKA) u toku 1 min. Radi digestije, u homogenat se dodaje 2 ml preparata lipaza i proteaza (1 tableta Digestala® ekstahovana sa 10 ml Tris pufera), 8 ml Tris pufera i inkubira na 37 °C u toku 60 min.

*Ekstrakcija genisteina:* Oslobođanje genisteina iz konjugata izvršeno je dodavanjem 120 µl β-glukuronidaze i aril-sulfataze (iz *Helix pomatia*, Roche Diagnostics GmbH, Germany), 10 ml acetatnog pufera (45 mmol dm<sup>-3</sup>, pH 5) i inkubacijom uzoraka na 37 °C u toku 6 sati. Nakon inkubacije dodaje se 15 ml metanola i 15 ml heksana, smeša se ekstrahuje u toku 10 min, a zatim centrifugira na 3000 g u toku 30 minuta na 4 °C. Vodeno-metanolni sloj se razblaži sa 15 ml vode i

nanosi na SPE kolonu (Agilent Technologies C18 6CC, 500 mg). SPE kolonu je potrebno prethodno kondicionirati sa po 4 ml etil-acetata, 4 ml metanola i 4 ml vode. Nakon nanošenja uzorka kolona se ispere sa 4 ml 10% metanola. Analit se eluira sa 4 ml metanola i uparava na vakuum uparivaču do suva. Za HPLC analizu, suvi ostatak je rastvoren u 1 ml metanola.

*Postupak kvantitativnog određivanja genisteina:* Izvrši se injektovanje po 5  $\mu$ l uzorka. Kao mobilna faza A koristi se 0,05% V/V mravlja kiselina, a kao faza B – MeOH. Komponente se eluiraju u gradijentnom režimu: 0 min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, post time 3 min (ukupno vreme analize 15 min), uz konstantan protok od 1 ml/min. Standardi se prave u seriji od 6 duplih razblaženja u opsegu 3,05 ng/ml do 97,70 ng/ml. Razdvajanje se postiže na Rapid Resolution HT Zorbax Eclipse XDB-C18 50 mm  $\times$  4,6 mm, 1,8  $\mu$ m koloni (Agilent Technologies) temperiranoj na 50 °C, ispred koje je vezan in-line filter (2 mm, 0,2  $\mu$ m, Agilent Technologies). Celokupna količina eluata prosleđuje se u maseni spektrometar. Parametri jonskog izvora su: protok gasa za sušenje (N<sub>2</sub>) 10 l/min, temperatura 350 °C, pritisak gasa za nebulizaciju 50 psi, napon na kapilari 4 kV, negativni polaritet. Genistein se pratiti u SRM modu (eng. selected reactions monitoring), uz optimizovane parametre: m/z prekursora 269, m/z produkta 133, napon fragmentora 145 V, napon kolizione ćelije 32 V, scan time 200 ms. Kvantifikacija je urađena metodom eksternog standarda.

#### **4.2.14. Određivanje sposobnosti vezivanja vode**

Sposobnost vezivanja vode određena je preko gubitka tečnosti bez primene spoljašnje sile (pritiska), tzv. „bag“ metodom prema Honikel (1998).

*Postupak:* Komadi mišićnog tkiva grudi brojlera, približno istog oblika i veličine, mase oko 100 g, izmere se na vagi sa tačnošću  $\pm 0,01$  g. Uzorci se okače o konac i stavljaju u staklene sudove sa poklopcem, osiguravši da meso nema kontakt sa unutrašnjim površinama sudova i iscetkom koji nastaje usled izdvajanja tečnosti i čuvaju se pri +4 °C. Posle stajanja u sudovima 24, odnosno 48 sati, uzorci se vade, a zatim se pre merenja površina uzoraka obriše papirnim ubrusima. Uzorci se mere na vagi sa tačnošću  $\pm 0,01$  g. Gubitak tečnosti je prikazan kao procenat gubitka mase nakon 24, odnosno 48 sati čuvanja na +4 °C.

#### **4.2.15. Metode određivanja TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)**

Nakon klanja, uzorci mesa karabataka za oba eksperimentalna perioda, aerobno su spakovani, zamrznuti i skladišteni pri temperaturi -20 °C tokom 1, 3, 6, 9 i 12 meseci. Za određivanje malondialdehida (MDA) korišćen je TBK test koji se bazira na spektrofotometrijskom određivanju ružičastog kompleksa formiranog nakon reakcije MDA sa dva molekula 2-tiobarbiturne kiseline.

TBK testom se određuju takozvane TBK-reaktivne supstance (TBARS), a rezultat testa se zbirno izražava kao TBK-broj (mg MAL/kg) (Tarladgis i sar., 1960).

#### **4.2.16. Senzorska analiza**

U kvantitativnoj deskriptivnoj analizi učestvovalo je deset obučениh ocenjivača sa Fakulteta veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, odabranih prema standardima (SRPS EN ISO 8586-2:2012; SRPS EN ISO 8586:2015). Uzorci mesa grudi, odnosno bataka sa karabatakom, odmrznuti su pri temperaturi frižidera (4 °C) i termički obrađeni na 180 °C u standardnoj komercijalnoj rerni tokom 40 min. Komadi mesa su isečeni i posluženi panelistima koji su ocenjivali boju, miris, ukus, mekoću, sočnost i ukupnu prihvatljivost na skali u opsegu od 1 do 7. Prihvatljivim su se smatrali svi parametri koji su dobili ocenu višu od 3,5 (SRPS ISO 6564:2001).

#### **4.3. Izračunavanje ekonomičnosti proizvodnje**

Na osnovu strukture obroka i cene pojedinih sirovina izračunata je cena koštanja jednog kilograma hrane za svaku eksperimentalnu grupu. Ekonomski pokazatelji (ekonomičnost, cena koštanja i finansijski rezultat) izračunati su na kraju ogleada, i za konvencionalnu dužinu tova (42 dana), i za produženi tov (58 dana), preko ostvarene vrednosti i troškova proizvodnje. Konstrukcija kalkulacije proizvodnje mesa brojlera izvršena je na osnovu strukture cene koštanja, tako što su učešće troškova amortizacije, lični dohodak, indirektni troškovi, troškovi početne supstance i ostalih materijalnih troškova fiksni za sve grupe piladi, a samo troškovi hrane imaju varijabilan karakter (Tešić i sar., 2013).

#### **4.4. Statistička obrada podataka**

U statističkoj analizi dobijenih rezultata korišćene su kao osnovne statističke metode i deskriptivni statistički parametri (aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška, minimalna, maksimalna vrednost i koeficijent varijacije). Značajnost razlika između srednjih vrednosti ispitivanih grupa brojlera utvrđena je univarijantnom analizom varijanse (ANOVA) uz Tukey *post-hoc* test. Za proizvodne rezultate boks se smatrao eksperimentalnom jedinicom, dok su svi ostali parametri analizirani na pojedinačnim životinjama. Statistička značajnost je određena na nivou  $P < 0,05$ . Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Statistička analiza dobijenih rezultata urađena je u statističkom paketu PrismaPad 6.00 za Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 5. REZULTATI ISPITIVANJA

### 5.1. Hemijski sastav hrane za brojlere

Hemijski sastav potpunih smeša za ishranu brojlera za sve tri faze tova, kao i za produženi tov (do 58. dana) prikazan je u Tabeli 5.1. Sve eksperimentalne grupe su dobijale hranu istog hemijskog sastava. Potpune smeše za ishranu piladi III (finišer) u svim ispitivanim grupama su bile izoenergetske i izoproteinske i razlikovale su se samo u količini dodatog čistog ekstrakta genisteina (0 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg, 600 mg/kg i 800 mg/kg). Sadržaj proteina je opadao od prve do treće faze tova, tako da je najviši bio u starteru (potpunoj smeši za ishranu piladi I) (22,4%), a najniži u finišeru (18,19%). U istom opadajućem nizu (starter>grover>finišer) bio je i sadržaj pepela, kalcijuma i fosfora. U potpunoj smeši za ishranu piladi II (grover) sadržaj vlage, masti i sirove celuloze je bio najviši, dok je sadržaj BEM-a bio najniži. Sadržaj vlage, masti i sirove celuloze je bio viši u starteru (12,61%, 6,89%; 2,74%, pojedinačno), u odnosu na finišer (10,54%; 6,48%; 2,59%, pojedinačno), dok je sadržaj BEM-a bio niži u starteru (50,04%) nego u finišeru (57,09%).

Tabela 5.1. Hemijski sastav smeša za ishranu brojlera kontrolne i oglednih grupa

	<i>Starter</i>	<i>Grover</i>	<i>Finišer</i>
<b><i>Hemijski sastav smeša (%)</i></b>			
Vlaga	12,61	13,32	10,54
Sirovi pepeo	5,32	5,20	5,11
Sirovi proteini	22,40	20,85	18,19
Mast	6,89	7,90	6,48
Sirova celuloza	2,74	3,39	2,59
Ca	0,85	0,77	0,76
P	0,67	0,58	0,56
BEM*	50,04	49,35	57,09

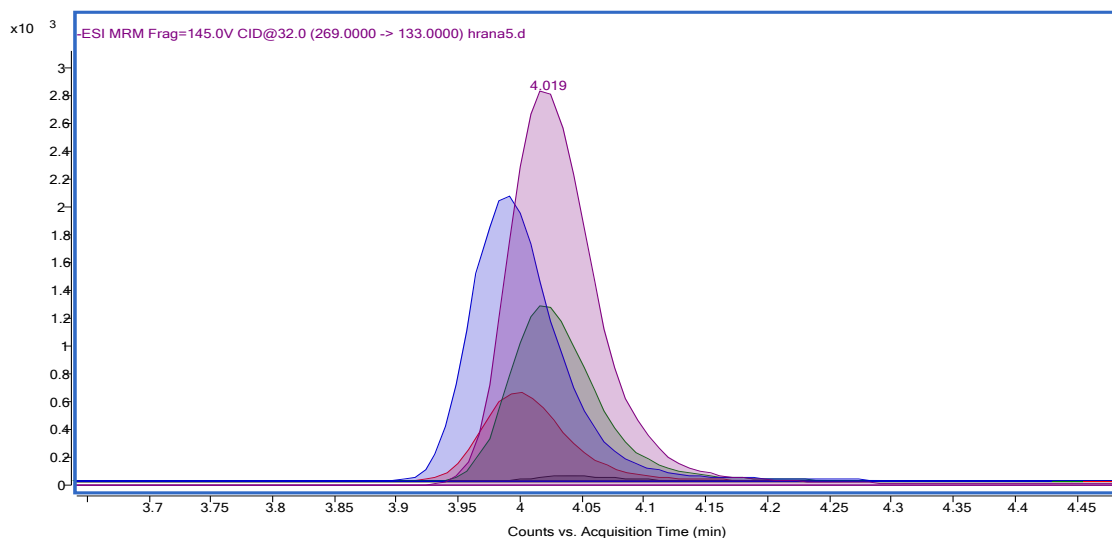
\*Bezazotne ekstraktivne materije

### 5.2. Analiza genisteina u hrani

U Tabeli 5.2. prikazan je analitički sadržaj genisteina u potpunim smešama za ishranu piladi III određen HPLC-DAD-ESI-MS/MS tehnikom. U hrani koju je dobijala kontrolna grupa brojlera utvrđeno je da je sadržaj genisteina bio niži od 20 mg/kg. U hrani oglednih grupa brojlera, nakon mešanja i peletiranja, sadržaj genisteina bio je 97, 213, 432 i 651 mg/kg, za grupe kojima je dodato 200 (O-I), 400 (O-II), 600 (O-III) i 800 (O-IV) mg genisteina/kg hrane u praškastom obliku. Na grafiku 5.1. mogu se videti hromatogrami u SRM modu (Selected Reactions Monitoring) ispitivanih uzoraka finišera za kontrolnu i ogledne grupe brojlera.

Tabela 5.2. Kvantitativni sadržaj genisteina u kontrolnoj i hrani sa dodatim ekstraktom genisteina

<i>Uzorak</i>	<i>Area</i>	<i>Cg (ng/ml) u vialu</i>	<i>mg/kg hrane</i>
Hrana_K	355	<100	<20
Hrana_O-I	3287	484.87	97
Hrana_O-II	6435	1066.07	213
Hrana_O-III	10398	2160.05	432
Hrana_O-IV	14470	3253.17	651



Grafik 5.1. SRM hromatogrami ispitivanih uzoraka hrane

### 5.3. Antioksidativni kapacitet hrane

Antioksidativna aktivnost metanolnog ekstrakta hrane koju su dobijali brojleri kontrolne i oglednih grupa tokom završne i produžene faze tove (od 21. do 58. dana tova) određena inhibicijom lipidne peroksidacije (LP) i FRAP testom prikazana je u Tabeli 5.3. Vrednosti LP testa su bile značajno više za hranu u kojoj je dodato 200 mg/kg genisteina (11,6 mg/ml) u poređenju sa svim ostalim uzorcima hrane ( $P < 0,05$ ). Ekstrakti kontrolnih uzoraka i hrane sa dodatim 400 mg/kg, 600 mg/kg i 800 mg/kg genisteina se nisu razlikovali u sposobnosti da inhibiraju lipidnu peroksidaciju i date vrednosti bile su u opsegu od 6,3 do 8,8 mg/ml ( $P > 0,05$ ). Vrednosti FRAP testa ispitivanih ekstrakata hrane bile su u opsegu od 14,7 do 16,9  $\mu\text{g eq askorbinske kiseline/g hrane}$ , pri čemu se antioksidativni kapacitet svih uzoraka nije značajno razlikovao ( $P > 0,05$ ).

Tabela 5.3. Antioksidativna aktivnost smeša za ishranu brojlera kontrolne i oglednih grupa

<i>Uzorak</i>	<i>LP</i>	<i>FRAP</i>
	IC <sub>50</sub> (mg hrane/ml)*	(µg eq Askorbinske kiseline/g hrane)
Hrana_K	7,0±0,8 <sup>a</sup>	16,9±4,5
Hrana_O-I	11,6±1,9 <sup>abcd</sup>	15,4±1,6
Hrana_O-II	6,8±1,9 <sup>b</sup>	14,7±5,1
Hrana_O-III	6,3±1,4 <sup>c</sup>	15,1±3,9
Hrana_O-IV	8,8±2,1 <sup>d</sup>	16,1±4,3

Legenda: IC<sub>50</sub> vrednosti – koncentracija hrane u *well*-u pri kojoj se postiže 50% inhibicije LP; U istoj koloni ista slova a,b,c,d-P<0,05;

#### 5.4. Zdravstveno stanje

Tokom svih faza konvencionalnog, kao i tokom produženog tova, brojleri kontrolne i oglednih grupa bili su normalne telesne građe, pravilno razvijenog koštano-mišićnog sistema, živahnog temperamenta i dobre kondicije. Koža i vidljive sluznice bile su uobičajnog izgleda. Appetit je bio dobar kod svih eksperimentalnih grupa, a feces uobičajno formiran za datu provenijenciju. Sposobnost aktivnog kretanja bila je usklađena. Tokom celog eksperimenta nije došlo do poremećaja zdravstvenog stanja i/ili ispoljavanja kliničkih simptoma bolesti i nije utvrđeno uginjavanje brojlera.

#### 5.5. Proizvodni rezultati

##### 5.5.1. Masa brojlera tokom ogleđa

Prosečna masa jednodnevne piladi na početku ogleđa bila je 44,11±4,25 g, dok je 10. dana tova prosečna masa svih brojlera bila 343,10±32,14 g. Dvadeset i prvog dana eksperimenta prosečna masa piladi je bila ujednačena po grupama, nije se značajno razlikovala (P=0,2645) i iznosila je od 966,90 g (K grupa) do 993,30 g (O-II grupa). Nakon konvencionalnog tova (42. dan) prosečna masa brojlera koji su u hrani dobijali 400 i 600 mg/kg genisteina bila je značajno veća od mase kontrolne grupe brojlera (P=0,0012). Sa produženim davanjem hrane koja je bila suplementirana različitim količinama genisteina, tokom 37 dana (58. dan eksperimenta), masa piladi kontrolne i oglednih grupa se nije značajno razlikovala (P=0,0870) (Tabela 5.4.).

Tabela 5.4. Telesne mase brojlera tokom tova ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Telesna masa (g)</i>						
1. dan <sup>1</sup>			44,11±4,25			/
10. dan <sup>1</sup>			343,10±32,14			/
21. dan <sup>2</sup>	966,90±57,1	980,30±46,3	993,30±68,5	971,90±52,4	979,40±57,2	0,2645
42. dan <sup>2</sup>	2623±347,4 <sup>ab</sup>	2727±281,2	2847±322,9 <sup>a</sup>	2781±354,9 <sup>b</sup>	2772±327,2	0,0012
58. dan <sup>3</sup>	4021±396,8	4029±516,5	4122±401,4	3835±536,8	4095±475,0	0,0870

Legenda: U istom redu ista slova a,b-P<0,05; <sup>1</sup>-n=360; <sup>2</sup>-n=6 (12×6=72); <sup>3</sup>-n=6 (6×6=36); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina



### 5.5.2. Prirast brojlera tokom oglada

Prosečan ukupni i dnevni prirast brojlera tokom celog tova prikazan je u Tabeli 5.5. Tokom prve i druge faze tova, kada pilad nije bila raspodeljena prema grupama, ukupni, odnosno dnevni prirast, iznosio je 299 g i 635,3 g, odnosno 29,9 g i 63,53 g, pojedinačno. Od 21. do 42. dana tova uočen je značajan pozitivni efekat dodavanja 400 mg/kg, 600 mg/kg i 800 mg/kg genisteina u hrani na ukupni i dnevni prirast brojlera u poređenju sa kontrolnom grupom ( $P=0,0003$ ). Tokom produženog tova, od 43. do 58. dana, zabeležen je značajno niži ukupni i dnevni prirast kod brojlera O-III grupe koja je u hrani dobijala 600 mg/kg genisteina (1139 g i 75,92 g, pojedinačno) u poređenju sa kontrolnom i ostalim oglednim grupama brojlera ( $P<0,0001$ ).

Tabela 5.5. Prosečan ukupni i dnevni prirast brojlera tokom tova ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Ukupni prirast (g)</i>						
1-10. dan <sup>1</sup>			299,00±28,27			/
11-20. dan <sup>1</sup>			635,30±32,24			/
21-42. dan <sup>2</sup>	1656±292,9 <sup>abc</sup>	1747±237,5	1854±257,3 <sup>a</sup>	1809±305,1 <sup>b</sup>	1793±272,9 <sup>c</sup>	0,0003
43-58. dan <sup>3</sup>	1293±221,7 <sup>a</sup>	1298±259,9 <sup>b</sup>	1323±173,1 <sup>c</sup>	1139±264,1 <sup>abcd</sup>	1407±171,9 <sup>d</sup>	<0,0001
<i>Dnevni prirast (g)</i>						
1-10. dan <sup>1</sup>			29,90±2,83			/
11-20. dan <sup>1</sup>			63,53±3,22			/
21-42. dan <sup>2</sup>	82,81±14,65 <sup>abc</sup>	87,33±11,87	92,68±12,86 <sup>a</sup>	90,45±15,26 <sup>b</sup>	89,63±13,64 <sup>c</sup>	0,0003
43-58. dan <sup>3</sup>	86,19±14,78 <sup>a</sup>	86,51±17,33 <sup>b</sup>	88,21±11,54 <sup>c</sup>	75,92±17,60 <sup>abcd</sup>	93,78±11,46 <sup>d</sup>	<0,0001

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d</sup>- $P<0,05$ ; <sup>1</sup>- $n=360$ ; <sup>2</sup>- $n=6$  ( $12 \times 6=72$ ); <sup>3</sup>- $n=6$  ( $6 \times 6=36$ ); ); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

### 5.5.3. Konzumacija i konverzija hrane tokom oglada

Ukupna i dnevna konzumacija hrane prikazana je u Tabeli 5.6. Od prvog do desetog dana tova, ukupan, odnosno dnevni unos hrane, iznosio je 341,4 g i 34,14 g, dok od jedanaestog do dvadesetog dana oglada je iznosio 847,3 g i 84,73 g, pojedinačno. Tokom konvencionalne završne faze tova, kao i tokom produženog tova, nije uočena razlika u količini unete hrane između kontrolne i oglednih grupa brojlera ( $P=0,0821$  i  $P=0,5720$ , pojedinačno). Ukupna konzumacija za period od 21. do 42. dana bila je u opsegu od 2959 g (O-IV grupa) do 3293 g (O-II), a dnevna u opsegu od 140,9 g (O-IV grupa) do 156,8 g (O-II). Za period od 43. do 58. dana tova ukupna konzumacija bila je od 3251 g kod brojlera O-I grupe do 3484 g kod O-III grupe brojlera, dok je dnevna konzumacija bila od 216,7 g do 232,3 g za iste grupe brojlera.

Tabela 5.6. Prosečna ukupna i dnevna konzumacija brojlera tokom tova ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Ukupna konzumacija (g)</i>						
1-10. dan <sup>1</sup>			341,40±6,88			/
11-20. dan <sup>1</sup>			847,30±66,47			/
21-42. dan <sup>2</sup>	3236±250,6	3133±214,7	3293±308,0	2964±230,6	2959±206,0	0,0821
43-58. dan <sup>3</sup>	3460±305,2	3251±256,3	3484±376,2	3282±294,8	3332±244,0	0,5720
<i>Dnevna konzumacija (g)</i>						
1-10. dan <sup>1</sup>			34,14±0,69			/
11-20. dan <sup>1</sup>			84,73±6,65			/
21-42. dan <sup>2</sup>	154,1±11,93	149,2±10,22	156,8±14,67	141,1±10,98	140,9±9,81	0,0821
43-58. dan <sup>3</sup>	230,7±20,34	216,7±17,09	232,3±25,08	218,8±19,65	222,1±16,27	0,5720

Legenda: <sup>1</sup>-n=360; <sup>2</sup>-n=6 (12×6=72); <sup>3</sup>-n=6 (6×6=36); ); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

Za period od 21. do 42. dana tova značajno bolju konverziju hrane su imali brojleri O-III i O-IV grupe, u poređenju sa kontrolnom grupom (P=0,0023). Za vreme produženog tova uočena je značajno viša konverzija kod brojlera koji su u hrani dobijali 600 mg/kg genisteina u poređenju sa kontrolnom i grupama koje su hranjene hranom sa 200 mg/kg i 800 mg/kg genisteina. Dodatno, grupa koja je u hrani dobijala 800 mg/kg genisteina je imala i najbolju konverziju koja je bila značajno niža od kontrolne grupe brojlera (P=0,0008) (Tabela 5.7.).

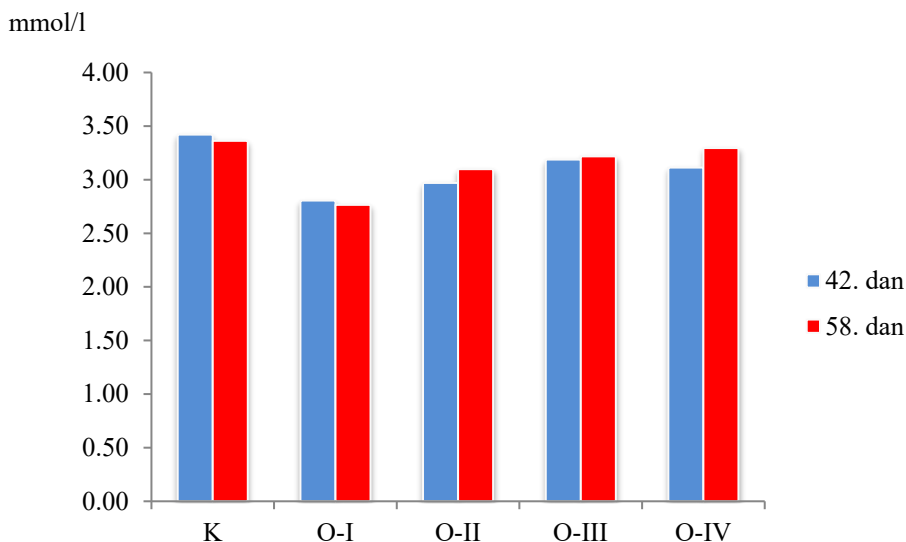
Tabela 5.7. Konverzija hrane tokom tova ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Konverzija (g)</i>						
1-10. dan <sup>1</sup>			1,14±0,03			/
11-20. dan <sup>1</sup>			1,33±0,11			/
21-42. dan <sup>2</sup>	1,96±0,15 <sup>ab</sup>	1,79±0,11	1,78±0,17	1,64±0,12 <sup>a</sup>	1,65±0,11 <sup>b</sup>	0,0023
43-58. dan <sup>3</sup>	2,68±0,20 <sup>ab</sup>	2,50±0,08 <sup>c</sup>	2,63±0,23	2,88±0,19 <sup>acd</sup>	2,37±0,16 <sup>bd</sup>	0,0008

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05; <sup>1</sup>-n=360; <sup>2</sup>-n=6 (12×6=72); <sup>3</sup>-n=6 (6×6=36); ); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

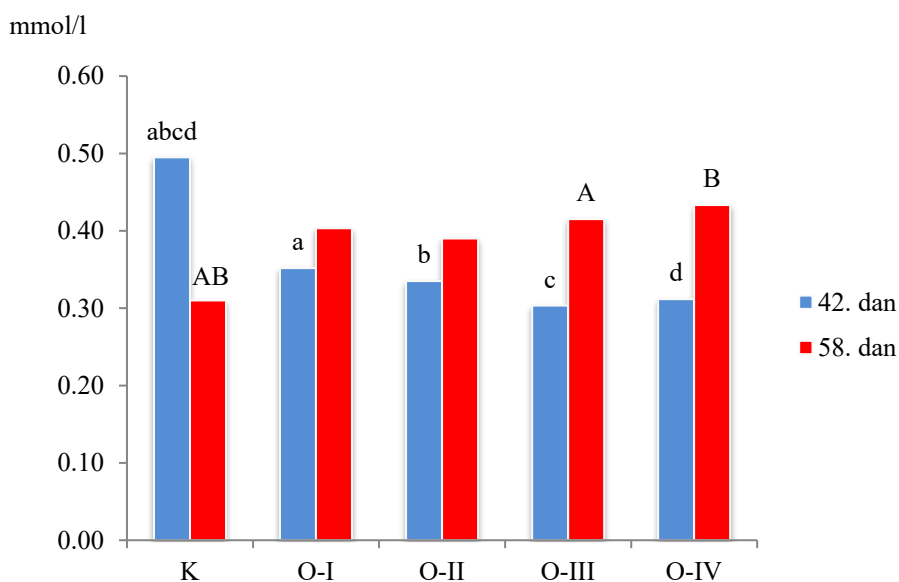
## 5.6. Biohemijske analize krvi

Rezultati određivanja koncentracije ukupnog holesterola u serumu kontrolne i oglednih grupa brojlera prikazani su na Grafiku 5.2. Nakon konvencionalnog i produženog tova najviša koncentracija holesterola bila je u kontrolnoj grupi (3,42 i 3,36 mmol/l, pojedinačno), dok je najniža zabeležena u O-II grupi brojlera (2,81 i 2,77 mmol/l, pojedinačno). Međutim, pokazano je da suplementacija 200, 400, 600 i 800 mg/kg genisteina nije imala značajan efekat na koncentraciju holesterola u serumu brojlera za oba eksperimentalna perioda (42. i 58. dan tova) (P>0,05).



Grafik 5.2. Koncentracija holesterola u krvnom serumu brojlera

Za razliku od holesterola, suplementacija genisteinom u svim količinama značajno je snizila koncentraciju triglicerida u serumu tokom prvog eksperimentalnog perioda (42. dan) u svim oglednim grupama u poređenju sa kontrolnom grupom ( $P=0,0014$ ) (Grafik 5.3.). S druge strane, negativni efekat na ovaj parametar je uočen dužim hranjenjem brojlera hranom u kojoj je dodato 600 i 800 mg/kg genisteina, tako da je u ovim grupama koncentracija triglicerida bila značajno viša (0,42 i 0,43 mmol/l, pojedinačno) nego u kontrolnoj grupi brojlera (0,31 mmol/l) ( $P=0,009$ ).



Grafik 5.3. Koncentracija triglicerida u plazmi brojlera

Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>- $P<0,05$  između grupa 42. dana tova; Ista slova <sup>A,B</sup>- $P<0,05$  između grupa 58. dana tova

### 5.7. Mase organa

Apsolutne mase organa kontrolne i oglednih grupa brojlera za oba eksperimentalna perioda prikazane su u Tabeli 5.8. Iz priložene tabele može se uočiti da je suplementacija 800 mg/kg genisteina u hrani tokom dvadeset i jednog dana dovela do povećanja mase slezine (3,87 g), koja se značajno razlikovala od svih ostalih ispitivanih grupa brojlera ( $P < 0,0001$ ), i mase srca (17,33 g) koja je bila značajno veća u poređenju sa kontrolnom (12,27 g) i O-I grupom brojlera (12,73 g) ( $P = 0,0002$ ). Nakon 42. dana tova masa jetre između svih ispitivanih grupa se nije razlikovala ( $P = 0,1110$ ), dok masa jajnika je bila manja od 1 g za sve ispitivane grupe brojlera. Produženi tov nije uticao na razlike u masi jetre, slezine i srca ( $P > 0,05$ ), masa jajnika kontrolne grupe je i dalje bila  $< 1$  g, dok je masa jajnika O-IV grupe brojlera bila značajno niža u odnosu na O-I i O-III grupu brojlera ( $P = 0,0036$ ).

Tabela 5.8. Apsolutna masa organa brojlera ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Jetra</i>						
42. dan	41,60±5,18	44,00±7,36	45,07±7,64	46,07±5,16	47,87±6,63	0,1110
58. dan	63,07±12,82	60,07±9,15	58,40±7,06	57,20±9,72	56,60±10,45	0,4082
<i>Slezina</i>						
42. dan	2,13±0,35 <sup>a</sup>	2,07±0,26 <sup>b</sup>	2,27±0,70 <sup>c</sup>	2,33±0,62 <sup>d</sup>	3,87±1,19 <sup>abcd</sup>	<0,0001
58. dan	3,80±1,01	3,93±1,10	3,87±1,19	3,80±1,15	3,40±1,06	0,7085
<i>Srce</i>						
42. dan	12,27±2,79 <sup>a</sup>	12,73±2,99 <sup>b</sup>	14,67±3,56	15,47±2,59	17,33±3,74 <sup>ab</sup>	0,0002
58. dan	22,33±4,94	19,13±4,58	21,87±4,31	21,33±3,83	19,47±3,40	0,1527
<i>Jajnik*</i>						
42. dan	<1	<1	<1	<1	<1	/
58. dan	<1	2,17±0,41 <sup>a</sup>	1,67±0,52	1,83±0,41 <sup>b</sup>	1,17±0,26 <sup>ab</sup>	0,0036

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d</sup>- $P < 0,05$ ; n=36 (6×6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina; \*-n=18 (3×6)

Slični rezultati su dobijeni i izražavanjem mase organa prema živoj masi brojlera pre klanja (Tabela 5.9.). Relativna masa slezine O-IV grupe (0,137%) 42. dana tova bila je značajno viša u odnosu na sve ostale grupe brojlera ( $P < 0,0001$ ), dok se relativna masa srca ove grupe razlikovala samo u odnosu na grupu koja dobijala 200 mg/kg genisteina u hrani ( $P = 0,0158$ ). Nakon drugog eksperimentalnog perioda značajno niža je bila samo relativna masa jajnika O-IV grupe u poređenju sa O-I i O-III grupom brojlera ( $P = 0,0053$ ).

Tabela 5.9. Relativna masa organa (% žive mase) brojlera ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Jetra</i>						
42. dan	1,69±0,21	1,63±0,22	1,56±0,20	1,63±0,18	1,68±0,21	0,4004
58. dan	1,57±0,30	1,49±0,17	1,42±0,14	1,49±0,18	1,38±0,14	0,0733
<i>Slezina</i>						
42. dan	0,088±0,017 <sup>a</sup>	0,077±0,013 <sup>b</sup>	0,079±0,024 <sup>c</sup>	0,083±0,025 <sup>d</sup>	0,137±0,043 <sup>abcd</sup>	<0,0001
58. dan	0,096±0,028	0,101±0,037	0,094±0,029	0,101±0,029	0,083±0,027	0,5174
<i>Srce</i>						
42. dan	0,50±0,10	0,47±0,11 <sup>a</sup>	0,51±0,12	0,55±0,13	0,61±0,11 <sup>a</sup>	0,0158
58. dan	0,55±0,11	0,47±0,08	0,53±0,09	0,56±0,09	0,47±0,05	0,1730
<i>Jajnik*</i>						
42. dan	nd	nd	nd	nd	nd	/
58. dan	nd	0,060±0,012 <sup>a</sup>	0,045±0,016	0,055±0,014 <sup>b</sup>	0,032±0,008 <sup>ab</sup>	0,0053

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05; n=36 (6×6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina; \*-n=18 (3×6); nd-nije detektovano

### 5.8. Ispitivanje sadržaja ukupnih proteina i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite u jetri brojlera

Dodavanje rastućih količina genisteina u hrani za brojlere tokom prvog eksperimentalnog perioda (21. - 42. dana tova) nije imalo uticaja na sadržaj ukupnih proteina jetre (P=0,0967) i aktivnost enzima katalaze (CAT) (P=0,5017). Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) je bila značajno niža u grupi koja je u hrani dobijala 400 mg/kg genisteina u poređenju sa grupom suplementiranom sa 200 mg/kg genisteina (P=0,037), dok dodavanje 600 mg/kg genisteina značajno je smanjilo aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GSH-Px) u jetri brojlera O-III grupe u poređenju sa kontrolnom i ostalim oglednim grupama (P=0,0014). Nakon drugog eksperimentalnog perioda, koji je trajao 37 dana, uočen je značajno niži sadržaj proteina jetre (3,25 mg proteina/ml), i viša aktivnost enzima SOD i CAT (1,23 mU/mg proteina i 1,75 mU/mg proteina, pojedinačno) u grupi brojlera koja je dobijala 200 mg/kg genisteina u hrani (O-I grupa) u odnosu na ostale ispitivane grupe brojlera, dok je aktivnost GSH-Px ove grupe (229,9 mU/mg proteina) bila značajno viša u odnosu na K, O-III i O-IV grupu brojlera. Kod O-III grupe brojlera utvrđena je značajno niža aktivnost enzima SOD (0,91 mU/mg proteina) u poređenju sa O-IV grupom, i enzima CAT (0,83 mU/mg proteina) u poređenju sa kontrolnom i O-IV grupom brojlera. Pedeset i osmog dana eksperimenta i aktivnost enzima GSH-Px u jetri brojlera hranjenih sa 400 mg/kg genisteina (208,0 mU/mg proteina) bila je značajno viša od kontrolne i grupe brojlera koji su u hrani dobijali 600 mg/kg genisteina (Tabela 5.10.).

Tabela 5.10. Ukupni proteini jetre i aktivnost enzima antioksidativne zaštite jetre brojlera kontrolne i oglednih grupa ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Ukupni proteini jetre (mg proteina/ml)</i>						
42. dan	3,58±0,30	3,40±0,27	3,79±0,33	3,85±0,22	3,77±0,38	0,0967
58. dan	4,05±0,54 <sup>a</sup>	3,25±0,15 <sup>abcd</sup>	3,84±0,27 <sup>b</sup>	4,28±0,35 <sup>c</sup>	3,88±0,19 <sup>d</sup>	0,0003
<i>SOD (mU/mg proteina)</i>						
42. dan	1,01±0,09	1,07±0,11 <sup>a</sup>	0,94±0,07 <sup>a</sup>	0,93±0,06	1,02±0,02	0,0370
58. dan	0,96±0,13 <sup>a</sup>	1,23±0,06 <sup>abcd</sup>	1,03±0,06 <sup>b</sup>	0,91±0,05 <sup>ce</sup>	1,05±0,04 <sup>de</sup>	<0,0001
<i>CAT (mU/mg proteina)</i>						
42. dan	1,46±0,44	1,69±0,50	1,80±0,41	1,61±0,35	1,47±0,16	0,5017
58. dan	1,27±0,35 <sup>ab</sup>	1,75±0,11 <sup>acde</sup>	1,09±0,23 <sup>c</sup>	0,83±0,13 <sup>bdf</sup>	1,32±0,27 <sup>ef</sup>	<0,0001
<i>GSH-Px (mU/mg proteina)</i>						
42. dan	230,8±25,98 <sup>a</sup>	238,4±27,06 <sup>b</sup>	232,9±42,57 <sup>c</sup>	175,6±31,57 <sup>abcd</sup>	261,6±25,93 <sup>d</sup>	0,0014
58. dan	129,5±9,61 <sup>ab</sup>	229,9±68,69 <sup>acd</sup>	208,0±9,39 <sup>bc</sup>	142,70±27,59 <sup>ce</sup>	169,20±13,24 <sup>d</sup>	<0,0001

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup>-P<0,05; n=36 (6×6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

### 5.9. Histomorfometrijska ispitivanja

Nakon 42. dana eksperimenta u duodenumu brojlera iz grupa koje su u hrani dobijale genistein visina resica je bila viša, međutim od kontrolne grupe značajno se razlikovala samo O-II grupa brojlera (P=0,0015). Dodavanje 400, 600 i 800 mg/kg genisteina značajno je smanjilo širinu resica u duodenumu (P<0,0001). Dodatno, u svim oglednim grupama brojlera koje su hranjene hranom sa dodatim genisteinom dubina kripte je bila značajno niža, a odnos visina resice/dubina kripte značajno viši u poređenju sa kontrolnom grupom (P<0,0001; P<0,0001, pojedinačno). Nakon drugog eksperimentalnog perioda (58. dan) genistein nije imao efekat na visinu resica, širina resica je bila značajno smanjena u grupi koja je u hrani dobijala 800 mg/kg genisteina, dok je dubina kripte značajno manja bila u O-II, O-III i O-IV grupama brojlera. Suplementacija od 800 mg/kg značajno je poboljšala odnos visina resica/dubina kripte (8,02) u duodenumu u poređenju sa svim ostalim ispitivanim grupama brojlera (Tabela 5.11.).

Nakon prvog eksperimentalnog perioda efekat genisteina na morfologiju crevnih resica jejunuma bio je varijabilan. Tako npr. na parametar visine resica najbolji efekat je postignut sa 400 mg/kg genisteina (1132  $\mu$ m), dok je 800 mg/kg genisteina značajno smanjio i visinu (880,1  $\mu$ m) i širinu crevnih resica (62,5  $\mu$ m) u jejunumu. Značajno dublje kripte i značajno niži odnos visina resice/dubina kripte u odnosu na kontrolnu grupu zabeleženi su u O-III i O-IV grupama brojlera. Nakon produžene suplementacije genisteina u hrani za brojlere uočen je pozitivan efekat na sve ispitivane morfometrijske parametre jejunuma. Visina resica i odnos visina resica/dubina kripte bili su značajno viši u svim oglednim grupama (P<0,0001), dok širina resica značajno veća je bila u O-II, O-III i O-IV grupama brojlera u poređenju sa kontrolnom grupom. Dodavanje 200 i 800 mg/kg

genisteina značajno je smanjilo dubinu kripti u mukozi jejunuma ovih grupa brojlera ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 5.11.).

Još izraženija nedoslednost u rezultatima uočena je na morfometrijskim parametrima mukoze ileuma, naročito u vezi širine resica i dubine kripti. Rastuće količine genisteina uticale su na smanjenje visine resica u ileumu brojlera, gde nakon 42. dana tova značajno su se razlikovale grupe sa 600 i 800 mg/kg genisteina u hrani, dok nakon 58. dana sve grupe koje su dobijale genistein u hrani su imale značajno nižu visinu resica u odnosu na kontrolnu grupu brojlera. U svim oglednim grupama dodavanje genisteina je negativno uticao na odnos visina resice/dubina kripti, sa najnižim odnosom u O-III grupi (3,63) za oba eksperimentalna perioda (Tabela 5.11.).

Tabela 5.11. Uticaj različitih količina genisteina u hrani na intestinalne morfometrijske parametre brojlera ( $\bar{X} \pm Sd$ )

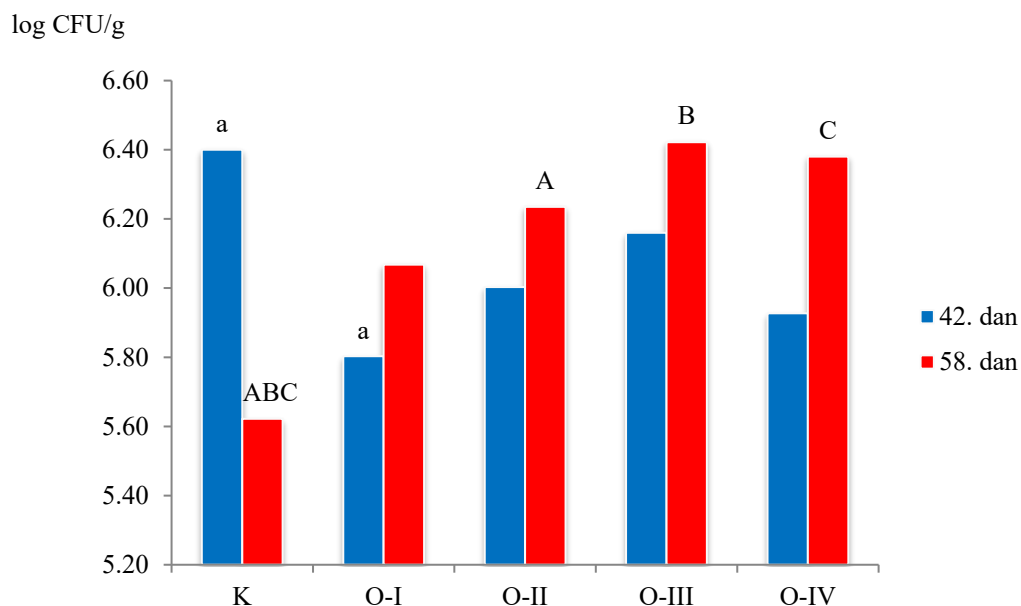
Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Duodenum</i>						
Visina resice ( $\mu\text{m}$ )						
42. dan	1197 $\pm$ 73,9 <sup>a</sup>	1212 $\pm$ 79,8 <sup>b</sup>	1284 $\pm$ 68,5 <sup>ab</sup>	1226 $\pm$ 126,2	1257 $\pm$ 87,6	0,0015
58. dan	996,1 $\pm$ 102,7	962,8 $\pm$ 92,11	964,1 $\pm$ 63,17	944,5 $\pm$ 63,8	969,2 $\pm$ 79,13	0,1904
Širina resice ( $\mu\text{m}$ )						
42. dan	101,5 $\pm$ 11,33 <sup>abc</sup>	101,7 $\pm$ 7,7 <sup>def</sup>	87,0 $\pm$ 12,75 <sup>adg</sup>	76,4 $\pm$ 10,92 <sup>beg</sup>	79,5 $\pm$ 9,61 <sup>cf</sup>	<0,0001
58. dan	77,57 $\pm$ 11,60	77,50 $\pm$ 9,67	81,36 $\pm$ 7,01 <sup>a</sup>	84,85 $\pm$ 7,59 <sup>b</sup>	72,85 $\pm$ 15,3 <sup>ab</sup>	0,0004
Dubina kriпти ( $\mu\text{m}$ )						
42. dan	162,9 $\pm$ 19,8 <sup>abcd</sup>	133,6 $\pm$ 11,7 <sup>a</sup>	131,3 $\pm$ 11,0 <sup>b</sup>	131,4 $\pm$ 14,4 <sup>c</sup>	125,9 $\pm$ 13,8 <sup>d</sup>	<0,0001
58. dan	153,7 $\pm$ 10,3 <sup>abc</sup>	147,6 $\pm$ 17,1 <sup>def</sup>	135 $\pm$ 15,1 <sup>adg</sup>	137 $\pm$ 17,4 <sup>beh</sup>	122 $\pm$ 11,4 <sup>cfgh</sup>	<0,0001
Visina resice/Dubina kriпти						
42. dan	7,48 $\pm$ 1,10 <sup>abcd</sup>	9,10 $\pm$ 0,90 <sup>ae</sup>	9,86 $\pm$ 1,09 <sup>b</sup>	9,38 $\pm$ 0,85 <sup>c</sup>	10,10 $\pm$ 1,32 <sup>de</sup>	<0,0001
58. dan	6,50 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	6,63 $\pm$ 1,15 <sup>b</sup>	7,22 $\pm$ 0,85 <sup>c</sup>	7,02 $\pm$ 1,15 <sup>d</sup>	8,02 $\pm$ 1,07 <sup>abcd</sup>	<0,0001
<i>Jejunum</i>						
Visina resice ( $\mu\text{m}$ )						
42. dan	978,7 $\pm$ 92,8 <sup>ab</sup>	950,6 $\pm$ 81,0 <sup>c</sup>	1132 $\pm$ 132,4 <sup>acde</sup>	991 $\pm$ 133,4 <sup>df</sup>	880,1 $\pm$ 91,2 <sup>bef</sup>	<0,0001
58. dan	813 $\pm$ 108 <sup>abcd</sup>	965,7 $\pm$ 156,3 <sup>a</sup>	960,4 $\pm$ 96,2 <sup>b</sup>	938,6 $\pm$ 89,6 <sup>c</sup>	904 $\pm$ 112,1 <sup>d</sup>	<0,0001
Širina resice ( $\mu\text{m}$ )						
42. dan	81,2 $\pm$ 10,19 <sup>ab</sup>	76,2 $\pm$ 10,32 <sup>c</sup>	74,3 $\pm$ 9,48 <sup>ad</sup>	75,2 $\pm$ 7,01 <sup>e</sup>	62,5 $\pm$ 8,94 <sup>bcde</sup>	<0,0001
58. dan	80,54 $\pm$ 9,25 <sup>abc</sup>	82,60 $\pm$ 9,69	88,00 $\pm$ 8,07 <sup>a</sup>	87,83 $\pm$ 9,45 <sup>b</sup>	88,33 $\pm$ 8,21 <sup>c</sup>	0,0009
Dubina kriпти ( $\mu\text{m}$ )						
42. dan	98,3 $\pm$ 13,2 <sup>abc</sup>	104,9 $\pm$ 12,5 <sup>de</sup>	108,6 $\pm$ 9,4 <sup>af</sup>	121,7 $\pm$ 11,7 <sup>bdf</sup>	114,2 $\pm$ 9,7 <sup>ce</sup>	<0,0001
58. dan	148,9 $\pm$ 11,3 <sup>ab</sup>	134,7 $\pm$ 10,2 <sup>a</sup>	142,2 $\pm$ 16,3 <sup>c</sup>	143,5 $\pm$ 13,7 <sup>d</sup>	127,4 $\pm$ 11,9 <sup>bcd</sup>	<0,0001
Visina resice/Dubina kriпти						
42. dan	10,09 $\pm$ 1,42 <sup>ab</sup>	9,17 $\pm$ 1,20 <sup>cde</sup>	10,61 $\pm$ 1,54 <sup>cfg</sup>	8,21 $\pm$ 1,27 <sup>adf</sup>	7,75 $\pm$ 0,99 <sup>beg</sup>	<0,0001
58. dan	5,51 $\pm$ 0,96 <sup>abcd</sup>	7,26 $\pm$ 1,59 <sup>a</sup>	6,85 $\pm$ 1,07 <sup>b</sup>	6,51 $\pm$ 0,88 <sup>c</sup>	7,13 $\pm$ 0,86 <sup>d</sup>	<0,0001
<i>Ileum</i>						
Visina resice ( $\mu\text{m}$ )						
42. dan	563,3 $\pm$ 46,39 <sup>ab</sup>	541,5 $\pm$ 85,2	542,3 $\pm$ 47,0	503,6 $\pm$ 44,77 <sup>a</sup>	503,9 $\pm$ 46,33 <sup>b</sup>	<0,0001
58. dan	590,1 $\pm$ 78,2 <sup>abcd</sup>	505,9 $\pm$ 57,2 <sup>a</sup>	531,1 $\pm$ 78,15 <sup>b</sup>	492,3 $\pm$ 38,35 <sup>c</sup>	493,7 $\pm$ 53,83 <sup>d</sup>	<0,0001
Širina resice ( $\mu\text{m}$ )						
42. dan	66,6 $\pm$ 5,83 <sup>ab</sup>	71,0 $\pm$ 6,64 <sup>acde</sup>	60,2 $\pm$ 5,02 <sup>bef</sup>	65,2 $\pm$ 5,06 <sup>df</sup>	64,1 $\pm$ 7,25 <sup>c</sup>	<0,0001
58. dan	65,53 $\pm$ 6,53 <sup>abc</sup>	71,52 $\pm$ 6,96 <sup>ad</sup>	63,95 $\pm$ 7,72 <sup>def</sup>	72,85 $\pm$ 5,95 <sup>be</sup>	74,28 $\pm$ 6,99 <sup>cf</sup>	<0,0001
Dubina kriпти ( $\mu\text{m}$ )						
42. dan	118,5 $\pm$ 11,5 <sup>abc</sup>	135,1 $\pm$ 12,6 <sup>ad</sup>	141,8 $\pm$ 10,3 <sup>be</sup>	139,5 $\pm$ 12,9 <sup>cf</sup>	120,1 $\pm$ 10,6 <sup>def</sup>	<0,0001
58. dan	131,3 $\pm$ 17,51	130,4 $\pm$ 9,79	136,3 $\pm$ 9,53 <sup>a</sup>	136,1 $\pm$ 8,02 <sup>b</sup>	125,1 $\pm$ 10,04 <sup>ab</sup>	0,0010
Visina resice/Dubina kriпти						
42. dan	4,79 $\pm$ 0,56 <sup>abcd</sup>	4,06 $\pm$ 0,81 <sup>ae</sup>	3,84 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	3,63 $\pm$ 0,36 <sup>cef</sup>	4,22 $\pm$ 0,52 <sup>df</sup>	<0,0001
58. dan	4,54 $\pm$ 0,67 <sup>abcd</sup>	3,90 $\pm$ 0,54 <sup>ae</sup>	3,93 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>	3,63 $\pm$ 0,37 <sup>c</sup>	3,97 $\pm$ 0,48 <sup>d</sup>	<0,0001

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup>-P<0,05; n=18 (3 $\times$ 6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina



### 5.10. Broj bakterija mlečne kiseline (*Lactobacillus* spp.) u cekumu brojlera

Broj bakterija mlečne kiseline (BMK) u cekumu nije se značajno razlikovao između oglednih grupa nakon 42. dana tova, dok sa dodavanjem 200 mg/kg genisteina u hrani njihov broj se značajno smanjio (5,80 log CFU/g) u poređenju sa kontrolnom grupom (6,40 log CFU/g). Međutim nakon produženog tova (58. dan), broj BMK u cekumu brojlera je bio značajno viši ( $P=0,0009$ ) u grupama koje su u hrani dobijale genistein u količinama od 400, 600 i 800 mg/kg (6,24, 6,42, 6,38 log CFU/g, pojedinačno) (Grafik 5.4.).



Grafik 5.4. Ukupan broj *Lactocacillus* spp. u cekumu brojlera;

Isto slovo <sup>a</sup>- $P<0,05$  između grupa 42. dana tova; Ista slova <sup>A,B,C</sup>- $P<0,05$  između grupa 58. dana tova

### 5.11. Masa i hemijski sastav tibije brojlera

Grupe koje su u hrani dobijale genistein u količini od 200, 400 i 600 mg/kg imale su značajno veću apsolutnu masu tibije u odnosu na kontrolnu grupu, dok sa produženim tovom nije uočen efekat dodavanja genisteina na apsolutnu masu tibije ispitivanih grupa brojlera. Relativna masa tibije za oba eksperimentalna perioda se nije razlikovala između grupa i bila je 42. dana u opsegu od 0,47% u O-IV grupi do 0,55% u O-I i O-II grupama brojlera, a 58. dana u opsegu od 0,44% u O-II grupi do 0,48% u O-IV grupi brojlera (Tabela 5.12).

Sadržaj pepela tibije grupa brojlera suplementiranih sa 200, 400 i 600 mg/kg genisteina bio je značajno viši u odnosu na kontrolnu grupu brojlera nakon 42. dana tova ( $P<0,0001$ ), dok je nakon produženog tova uočen značajno niži sadržaj pepela tibije u O-I i O-II grupi brojlera (36,77% i 39,05%, pojedinačno) u poređenju sa kontrolnom grupom (42,96%) ( $P<0,0001$ ) (Tabela 5.12).

Nakon prvog eksperimentalnog perioda suplementacija sa 200 i 400 mg/kg genisteina uticala je na povećanje sadržaja kalcijuma tibije ove dve grupe brojlera (17,33% i 16,75%, pojedinačno) koji je bio značajno viši u poređenju sa kontrolnom grupom (15,32%), dok je sa produženom suplementacijom ovih količina genisteina uočen negativni efekat na posmatrani parametar (12,95% i 13,66%, pojedinačno). Najniži sadržaj kalcijuma nakon 42. dana tova uočen je u O-IV grupi brojlera (14,24%), međutim nakon produženog tova sadržaj kalcijuma tibije ove grupe (14,74%) nije se značajno razlikovao od kontrolne grupe (14,91%) (Tabela 5.12).

Grupe koje su u hrani dobijale 200 i 400 mg/kg genisteina nakon 42. dana tova imale su značajno viši sadržaj fosfora u uzorcima tibije u poređenju sa grupama koje su bile suplementirane sa 600 i 800 mg/kg genisteina. Nakon 58. dana tova grupa koja je dobijala 400 mg/kg genisteina je imala najviši (8,13%), a grupa sa 200 mg/kg genisteina u hrani najniži (6,68%) sadržaj fosfora i po ovom parametru se nisu značajno razlikovale od kontrolne grupe brojlera (7,35%) (Tabela 5.12).

Tabela 5.12. Uticaj genisteina na apsolutnu i relativnu masu i mineralni sastav tibije brojlera ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Masa (g)</i>						
42. dan	12,00±1,12 <sup>abc</sup>	14,67±1,12 <sup>a</sup>	15,33±1,41 <sup>bd</sup>	14,00±1,41 <sup>c</sup>	13,33±1,41 <sup>d</sup>	<0,0001
58. dan	17,89±2,76	18,89±2,47	19,00±2,69	17,56±2,07	20,00±2,24	0,2498
<i>Relativna masa (% žive mase brojlera)</i>						
42. dan	0,51±0,08	0,55±0,05	0,55±0,09	0,49±0,08	0,47±0,05	0,0719
58. dan	0,43±0,08	0,46±0,09	0,44±0,05	0,45±0,09	0,48±0,07	0,6305
<i>Pepeo (%)</i>						
42. dan	42,15±1,8 <sup>abc</sup>	49,19±0,6 <sup>ade</sup>	49,27±0,61 <sup>bfgh</sup>	44,24±0,41 <sup>cdfh</sup>	41,62±0,82 <sup>egh</sup>	<0,0001
58. dan	42,96±0,44 <sup>ab</sup>	36,77±1,58 <sup>acd</sup>	39,05±1,45 <sup>b</sup>	40,94±1,69 <sup>c</sup>	41,32±2,78 <sup>d</sup>	<0,0001
<i>Kalcijum (Ca) (%)</i>						
42. dan	15,32±0,35 <sup>abc</sup>	17,33±0,11 <sup>adef</sup>	16,75±0,33 <sup>bdgh</sup>	15,53±0,31 <sup>egi</sup>	14,24±0,29 <sup>cfhi</sup>	<0,0001
58. dan	14,91±0,28 <sup>ab</sup>	12,95±0,35 <sup>acd</sup>	13,66±0,23 <sup>b</sup>	14,35±0,33 <sup>c</sup>	14,74±1,52 <sup>d</sup>	<0,0001
<i>Fosfor (P) (%)</i>						
42. dan	8,23±0,34	8,60±0,66 <sup>ab</sup>	8,34±0,20 <sup>cd</sup>	7,63±0,17 <sup>ac</sup>	7,55±0,50 <sup>bd</sup>	0,0254
58. dan	7,35±0,22	6,68±0,38 <sup>a</sup>	8,13±0,69 <sup>abc</sup>	7,28±0,52 <sup>b</sup>	7,24±0,41 <sup>c</sup>	0,0005

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i</sup>-P<0,05; n=36 (6×6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

## 5.12. Klanični parametri brojlera

### 5.12.1. Parametri prinosa mesa brojlera

Prosečna masa trupova, obrađenih na način »spremno za roštilj«, i prinos mesa, izračunat kao udeo mase trupa u masi živih životinja pre klanja, prikazana je u Tabeli 5.13. Iz date tabele može se videti da su sve ogledne grupe brojlera imale značajno višu masu trupa nakon klanja 42. dana eksperimenta u odnosu na kontrolnu grupu (P<0,0001). Produžena suplementacija genisteina u

količini od 600 mg/kg uticala je da masa trupa brojlera O-III grupe bude najniža (2808 g), pri čemu se značajno razlikovala od mase trupa brojlera O-II i O-IV grupe (3074 g i 3085 g, pojedinačno,  $P=0,0078$ ), dok u poređenju sa kontrolnom grupom razlika u ovom ispitivanom parametru nije uočena ( $P=0,4689$ ). Nakon konvencionalnog tova (42. dan) dodavanje genisteina u hrani povećalo je prinos mesa brojlera, a u odnosu na kontrolnu grupu značajno su se razlikovale samo grupe koje su dobijale 200 i 800 mg/kg genisteina u hrani ( $P=0,0020$ ). S druge strane, produžena suplementacija (58. dan) značajno je povećala randman u svim oglednim grupama u odnosu na kontrolnu grupu, s tim da su grupe koje su u hrani dobijale 200 i 800 mg/kg i dalje imale najbolji randman (75,35% i 75,29%, pojedinačno), koji se značajno razlikovao i od O-III grupe brojlera (73,34%) ( $P<0,0001$ ).

Tabela 5.13. Masa trupova i prinos mesa (randman) brojlera ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Masa trupova (g)</i>						
42. dan	1718±292,6 <sup>abcd</sup>	1898±177,0 <sup>a</sup>	2004±243,4 <sup>b</sup>	1980±284,7 <sup>c</sup>	2005±222,9 <sup>d</sup>	<0,0001
58. dan	2876±347,9	3036±386,6	3074±335,9 <sup>a</sup>	2808±370, <sup>7ab</sup>	3085±370,9 <sup>b</sup>	0,0078
<i>Randman (%)</i>						
42. dan	69,06±1,26 <sup>ab</sup>	70,25±1,48 <sup>a</sup>	69,26±1,71	69,32±1,51	70,13±1,06 <sup>b</sup>	0,0020
58. dan	71,40±3,49 <sup>abcd</sup>	75,35±1,57 <sup>ae</sup>	74,50±2,08 <sup>b</sup>	73,34±2,14 <sup>cef</sup>	75,29±1,39 <sup>df</sup>	<0,0001

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup>- $P<0,05$ ; n=36 (6×6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

### 5.12.2. Masa i udeo pojedinih delova trupa brojlera

Iz Tabele 5.14. može se uočiti da tretman koji je podrazumevao dodavanje rastućih količina genisteina u hrani brojlera (200, 400, 600 i 800 mg/kg) nije imao uticaj na masu bataka sa karabatakom i masu vrata nakon prvog eksperimentalnog perioda (42. dan). Masa grudi je bila veća u svim oglednim grupama brojlera, ali od kontrolne grupe značajno su se razlikovale samo grupe koje su suplementirane sa 400, 600 i 800 mg/kg genisteina. Masa krila i masa leđa je takođe bila veća u oglednim grupama, ali sa značajnom razlikom u odnosu na kontrolnu grupu samo u grupi koja je u hrani dobijala 600 mg/kg genisteina ( $P=0,0158$  i  $P=0,0092$ , pojedinačno). Nakon drugog eksperimentalnog perioda (58. dan) masa svih posmatranih delova ohlađenog trupa (grudi, batak sa karabatakom, leđa, krila i vrat) nije se značajno razlikovala između kontrolne i oglednih grupa brojlera ( $P=0,2486$ ;  $P=0,7303$ ;  $P=0,6664$ ;  $P=0,2385$  i  $P=0,0666$ , pojedinačno).

Tabela 5.14. Mase delova trupa brojlera ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Masa grudi (g)</i>						
42. dan	702,6±105,0 <sup>abc</sup>	817,2±47,1	854,8±107,1 <sup>a</sup>	869,6±93,8 <sup>b</sup>	863,8±87,1 <sup>c</sup>	0,0007
58. dan	1267±137,0	1350±134,8	1340±150,5	1277±114,3	1391±154,9	0,2486
<i>Masa bataka sa karabatakom (g)</i>						
42. dan	503,5±78,92	548,2±49,38	572,6±61,75	565,5±66,56	559,7±74,19	0,1715
58. dan	828,0±94,9	870,9±165,5	830,4±120,4	796,0±111,6	849,2±111,9	0,7303
<i>Masa leđa (g)</i>						
42. dan	393,1±69,02 <sup>a</sup>	419,6±43,48	461,3±60,11	486,5±73,59 <sup>a</sup>	449,0±60,38	0,0158
58. dan	592,8±68,59	585,2±105,9	582,3±51,14	549,3±76,17	596,4±70,48	0,6664
<i>Masa krila (g)</i>						
42. dan	173,1±20,98 <sup>a</sup>	187,3±14,04	195,3±23,93	203,5±15,91 <sup>a</sup>	192,9±14,25	0,0092
58. dan	296,4±30,48	305,8±38,17	270,5±48,31	283,5±41,03	304,9±39,20	0,2385
<i>Masa vrata (g)</i>						
42. dan	92,18±27,22	91,00±7,65	93,64±22,83	87,46±12,82	85,45±10,50	0,7922
58. dan	142,0±16,44	141,8±16,92	125,4±22,96	132,2±16,84	123,3±16,53	0,0666

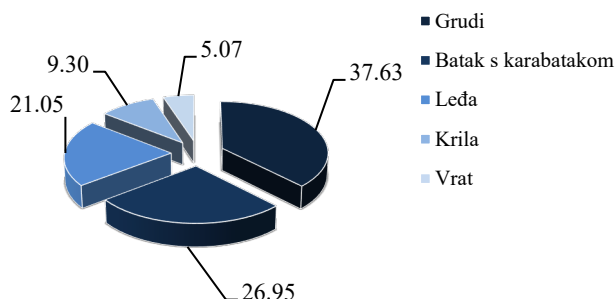
Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup>-P<0,05; n=36 (6×6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

Na sledećim graficima može se videti procentualna zastupljenost mase pojedinih delova trupa (grudi, batak s karabatakom, leđa, krila i vrat) u masi ohlađenog trupa nakon 42. dana tova brojlera K grupe (Grafik 5.5.), O-I grupe (Grafik 5.6.), O-II grupe (Grafik 5.7.), O-III grupe (Grafik 5.8.) i O-IV grupe (Grafik 5.9.). Udeo mase bataka sa karabatakom, mase leđa i mase krila bile su u opsegu od 25,51% (O-III grupa) do 26,95% (K grupa), od 20,30% (O-I grupa) do 21,89% (O-III grupa) i od 8,99% (O-II grupa) do 9,30% (K grupa), pojedinačno, i sve grupe brojlera se nisu razlikovale između sebe prema ovim navedenim parametrima (P=0,0776; P=0,1449; P=0,5322). Udeo mase grudi bio je veći u oglednim grupama brojlera, a značajna razlika je uočena između kontrolne (37,63%) i grupe koja je u hrani dobijala 800 mg/kg genisteina (40,20%) (P=0,0312). Udeo mase vrata bio je značajno veći u kontrolnoj grupi brojlera (5,07%) u odnosu na grupe koje su u hrani dobijale 400 (4,22%), 600 (4,11) i 800 mg/kg genisteina (4,03%) (P=0,0011).

Procentualna zastupljenost mase pojedinih delova trupa (grudi, batak s karabatakom, leđa, krila i vrat) u masi ohlađenog trupa brojlera nakon produženog tova (58. dan) prikazana je na Grafiku 5.10. za kontrolnu grupu, Grafiku 5.11. za O-I grupu, Grafiku 5.12. za O-II grupu, Grafiku 5.13. za O-III grupu i Grafiku 5.14. za O-IV grupu brojlera. Udeo mase grudi bio je u opsegu od 40,54% (K grupa) do 42,62% (O-IV grupa), bio je veći u svim oglednim grupama, ali bez uočene značajne razlike između svih ispitivanih grupa (P=0,1367). Udeo mase bataka sa karabatakom i udeo mase leđa bio je u opsegu od 25,97% (O-IV grupa) do 26,65% (O-I grupa), i od 17,90% (O-I grupa) do 18,97% (K grupa), i za ova dva parametra nisu utvrđene značajne razlike između svih posmatranih grupa brojlera (P=0,8619 i P=0,1347). Udeo mase krila grupe koja je u hrani dobijala 400 mg/kg genisteina (8,58%) značajno je bila niža u poređenju sa kontrolnom grupom (9,49%) (P=0,0321),

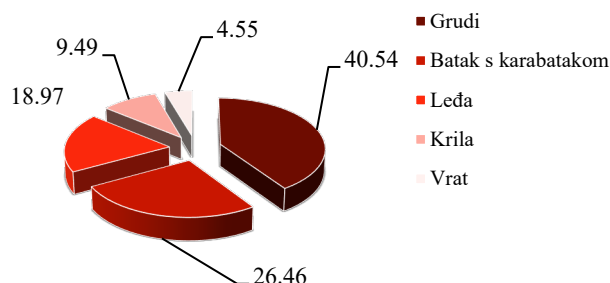
dok grupa koja je dobijala 800 mg/kg genisteina je imala značajno niži udeo mase vrata (3,80%) u odnosu na kontrolnu grupu (4,55%) ( $P=0,0086$ ).

K grupa (%)



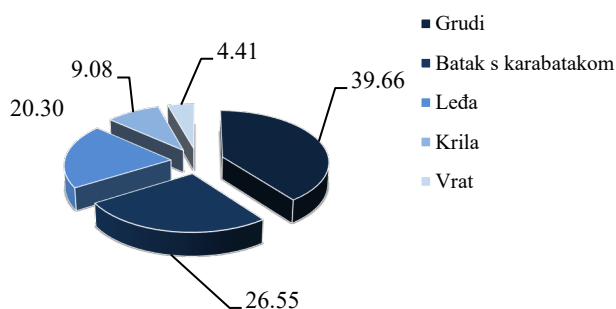
Grafik 5.5. Procentualna zastupljenost mase pojedinih delova trupa u masi ohlađenog trupa brojlera kontrolne grupe nakon 42. dana tova

K-grupa (%)



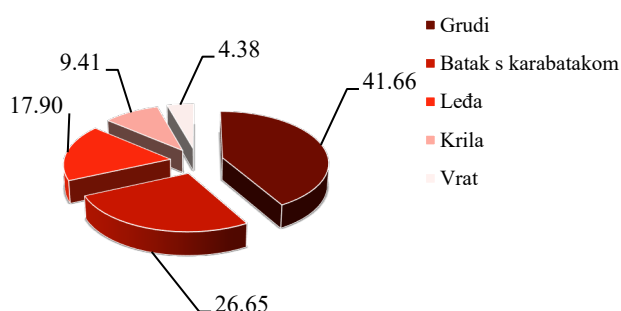
Grafik 5.10. Procentualna zastupljenost mase pojedinih delova trupa u masi ohlađenog trupa brojlera kontrolne grupe nakon 58. dana tova

O-I grupa (%)



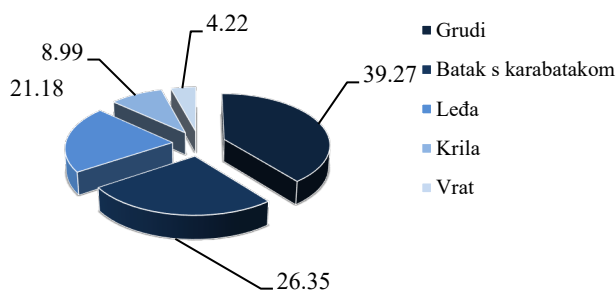
Grafik 5.6. Procentualna zastupljenost mase pojedinih delova trupa u masi ohlađenog trupa brojlera suplementiranih sa 200 mg genisteina/kg hrane nakon 42. dana tova

O-I grupa (%)



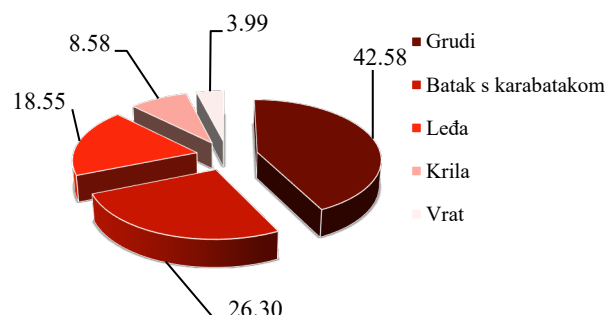
Grafik 5.11. Procentualna zastupljenost mase pojedinih delova trupa u masi ohlađenog trupa brojlera suplementiranih sa 200 mg genisteina/kg hrane nakon 58. dana tova

O-II grupa (%)



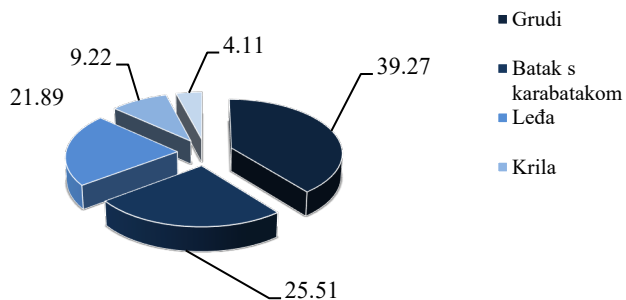
Grafik 5.7. Procentualna zastupljenost mase pojedinih delova trupa u masi ohlađenog trupa brojlera suplementiranih sa 400 mg genisteina/kg hrane nakon 42. dana tova

O-II grupa (%)



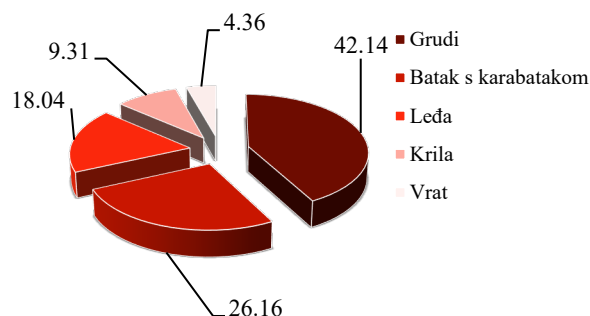
Grafik 5.12. Procentualna zastupljenost mase pojedinih delova trupa u masi ohlađenog trupa brojlera suplementiranih sa 400 mg genisteina/kg hrane nakon 58. dana tova

O-III grupa (%)



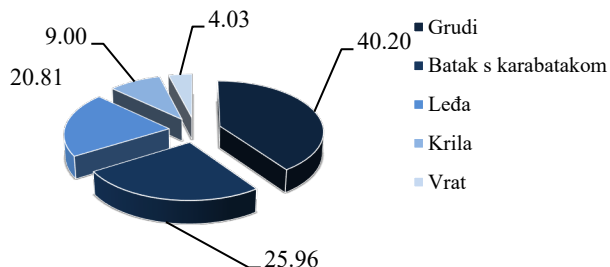
Grafik 5.8. Procentualna zastupljenost mase pojedinih delova trupa u masi ohlađenog trupa brojlera suplementiranih sa 600 mg genisteina/kg hrane nakon 42. dana tova

O-III grupa (%)



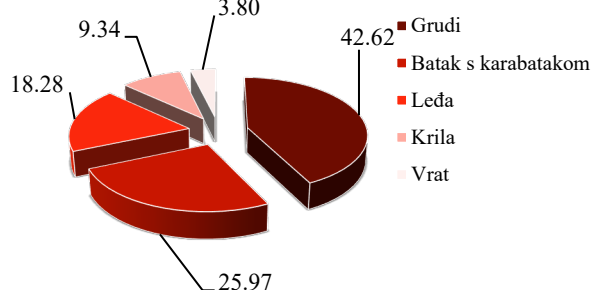
Grafik 5.13. Procentualna zastupljenost mase pojedinih delova trupa u masi ohlađenog trupa brojlera suplementiranih sa 600 mg genisteina/kg hrane nakon 58. dana tova

O-IV grupa



Grafik 5.9. Procentualna zastupljenost mase pojedinih delova trupa u masi ohlađenog trupa brojlera suplementiranih sa 800 mg genisteina/kg hrane nakon 42. dana tova

O-IV grupa



Grafik 5.14. Procentualna zastupljenost mase pojedinih delova trupa u masi ohlađenog trupa brojlera suplementiranih sa 800 mg genisteina/kg hrane nakon 58. dana tova

### 5.12.3. Masa i zastupljenost različitih tkiva grudi i bataka s karabatakom

Iz Tabele 5.15. može se uočiti da je dodavanje različitih količina genisteina u hrani za brojlere u poslednjoj fazi tova tokom dvadeset i jednog dana imalo pozitivni uticaj na masu mesa grudi i masu grudne kosti, dok efekat na masu kože nije uočen ( $P=0,3486$ ). Naime, ogleadne grupe su imale veću masu mišićnog tkiva grudi u poređenju sa kontrolnom grupom brojlera (535,8 g), a značajna razlika je uočena dodavanjem 400, 600 i 800 mg/kg genisteina (653,4 g, 667,8 g i 676,1 g, pojedinačno;  $P=0,0004$ ). Masa grudne kosti u kontrolnoj grupi brojlera bila je 93,2 g, i bila je značajno manja u odnosu na sve ogleadne grupe brojlera u kojima se masa grudne kosti nalazila u opsegu od 127,7 g (O-I grupa) do 133,1 g (O-II grupa) ( $P=0,0158$ ). Suplementacijom rastućih količina genisteina u hrani za brojlere tokom trideset i sedam dana nije uočen efekat na masu mišića, kože i kosti grudi brojlera. Nakon prvog i drugog eksperimentalnog perioda zastupljenost mase različitih tkiva (meso, koža, kost) u masi grudi brojlera nije se značajno razlikovala između svih posmatranih grupa, sa

izuzetkom udela mase kože O-IV grupe (7,01%) 42. dana tova, koji je bio značajno manji od kontrolne grupe brojlera (9,30%) ( $P=0,0039$ ). Dodatno, 42. dana, udeo mase grudne kosti je bio veći u oglednim grupama brojlera (15,68%, 15,42%, 15,39%, 14,95%, za O-I, O-II, O-III i O-IV grupu, pojedinačno), međutim nije uočena značajna razlika u odnosu na udeo mase grudne kosti kontrolne grupe (13,45%) ( $P=0,1353$ ) (Tabela 5.15.).

Tabela 5.15. Masa i udeo tkiva grudi ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Masa (g)</i>						
Meso						
42. dan	535,8±83,94 <sup>abc</sup>	624,5±43,89	653,4±78,58 <sup>a</sup>	667,8±70,96 <sup>b</sup>	676,1±74,26 <sup>c</sup>	0,0004
58. dan	980,6±119,9	1065±104,7	1107±96,33	990,1±98,36	1077±137,3	0,0593
Koža						
42. dan	64,60±12,55	64,40±17,30	71,80±9,31	70,20±13,01	60,90±13,19	0,3486
58. dan	89,9±13,19	98,6±16,63	97,8±15,40	94,8±13,16	91,2±14,10	0,5922
Kost						
42. dan	93,2±23,95 <sup>abcd</sup>	127,7±13,0 <sup>a</sup>	133,1±29,57 <sup>b</sup>	134,1±17,70 <sup>c</sup>	128,7±13,70 <sup>d</sup>	0,0158
58. dan	199,9±23,10	197,0±28,81	218,2±42,53	195,3±24,55	232,2±35,60	0,0507
<i>Udeo (%)</i>						
Meso						
42. dan	77,26±2,65	76,46±2,31	76,21±2,41	76,59±1,67	78,04±1,20	0,3108
58. dan	77,10±1,89	78,27±1,48	77,88±1,73	77,30±1,96	76,83±1,84	0,3801
Koža						
42. dan	9,30±0,99 <sup>a</sup>	7,86±2,02	8,38±0,46	8,02±0,90	7,01±1,28 <sup>a</sup>	0,0039
58. dan	7,09±0,90	7,23±0,87	6,87±0,92	7,42±0,95	6,55±0,97	0,0666
Kost						
42. dan	13,45±2,83	15,68±1,81	15,42±2,33	15,39±1,33	14,95±1,76	0,1353
58. dan	15,81±1,75	14,51±1,79	15,25±1,93	15,28±1,60	16,62±1,91	0,1292

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d</sup>- $P<0,05$ ; n=36 (6×6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

Slični rezultati prethodno navedenim dobijeni su i ispitivanjem mase i procentualne zastupljenosti mase mesa, kože i kostiju bataka sa karabatakom (Tabela 5.16.). Nakon 42. dana tova masa mišićnog tkiva bataka sa karabatakom je bila veća u oglednim grupama, ali bez značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu brojlera ( $P=0,2093$ ). Značajne razlike nisu utvrđene i za masu kože ( $P=0,6036$ ). Slično mišićnom tkivu, masa kostiju (femur i tibija) bila je veća u oglednim grupama, sa značajnom razlikom u odnosu na kontrolnu kod grupa suplementiranih sa 600 i 800 mg/kg genisteina ( $P=0,0459$ ). Nakon drugog eksperimentalnog perioda (58. dan) značajno manja masa kože (48,0 g), a značajno veća masa kostiju (85,8 g) uočena je u O-IV grupi brojlera u odnosu na kontrolnu grupu (62,70 g) i O-III grupu (64,7) ( $P=0,0160$  i  $P=0,0211$ , pojedinačno). Nakon prvog eksperimentalnog perioda uočen je samo značajno manji udeo mase kože u masi bataka sa karabatakom u grupama koje su dobijale 600 i 800 mg/kg genisteina ( $P=0,0230$ ). Nakon drugog eksperimentalnog perioda, u grupi koja je u hrani dobijala 800 mg/kg genisteina održao se najmanji udeo mase kože (11,30%) koji se značajno razlikovao od kontrolne grupe (15,20%) ( $P=0,0247$ ),

dok je udeo mase kostiju iste grupe (19,91%) bio značajno veći u odnosu na sve ostale ispitivane grupe (17,08%, 16,18%, 17,15% i 16,15%, za K, O-I, O-II i O-III grupu, pojedinačno) ( $P=0,0001$ ).

Tabela 5.16. Masa i udeo tkiva bataka sa karabatakom ( $\bar{X} \pm Sd$ )

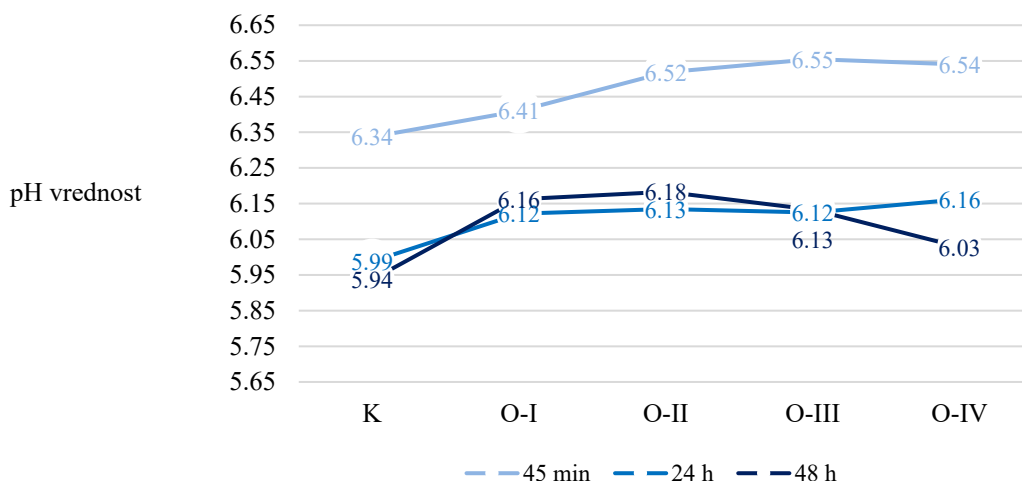
Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Masa (g)</i>						
Meso						
42. dan	169,6±27,51	190,8±20,36	192,1±20,19	194,5±28,72	190,3±30,62	0,2093
58. dan	282,5±32,74	312,1±76,35	298,2±44,65	281,9±48,14	296,1±42,34	0,6619
Koža						
42. dan	38,80±7,16	39,10±8,28	36,60±4,86	35,00±6,91	35,10±9,39	0,6036
58. dan	62,70±9,75 <sup>a</sup>	56,50±9,08	52,60±9,66	53,30±6,43	48,00±10,99 <sup>a</sup>	0,0160
Kost						
42. dan	41,6±10,20 <sup>ab</sup>	48,2±5,57	52,8±14,56	52,0±7,20 <sup>a</sup>	53,0±6,60 <sup>b</sup>	0,0459
58. dan	71,8±15,31	70,3±11,86	73,0±14,64	64,7±12,25 <sup>a</sup>	85,8±14,16 <sup>a</sup>	0,0211
<i>Udeo (%)</i>						
Meso						
42. dan	67,90±1,15	68,55±2,39	68,45±3,44	68,99±2,64	68,22±2,97	0,9164
58. dan	67,73±2,20	70,73±2,81	70,28±2,67	70,33±1,85	68,79±3,34	0,0705
Koža						
42. dan	15,65±2,38 <sup>ab</sup>	14,08±2,57	13,01±0,66	12,47±2,20 <sup>a</sup>	12,65±3,16 <sup>b</sup>	0,0230
58. dan	15,20±2,83 <sup>a</sup>	13,10±2,19	12,58±2,74	13,53±2,20	11,30±2,75 <sup>a</sup>	0,0247
Kost						
42. dan	16,46±2,10	17,37±1,83	18,55±3,23	18,54±1,90	19,13±1,67	0,0687
58. dan	17,08±2,14 <sup>a</sup>	16,18±1,78 <sup>b</sup>	17,15±1,81 <sup>c</sup>	16,15±1,40 <sup>d</sup>	19,91±1,8 <sup>abcd</sup>	0,0001

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d</sup>- $P<0,05$ ;  $n=36$  ( $6 \times 6$ ); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

### 5.13. Vrednost pH i temperatura mesa grudi brojlera

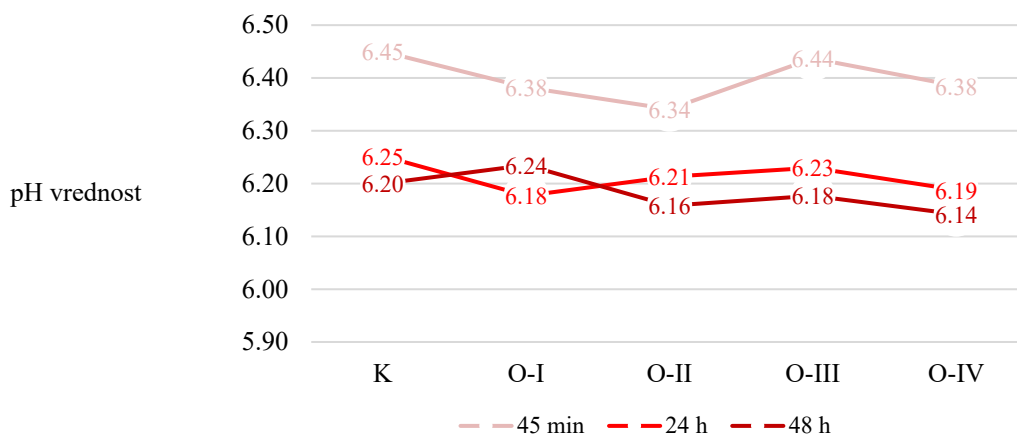
Na Grafiku 5.15 prikazane su pH vrednosti mesa grudi brojlera kontrolne i oglednih grupa nakon prvog eksperimentalnog perioda (42. dan). Uočena je značajno viša pH vrednost 45 minuta nakon klanja u oglednim grupama koje su u hrani dobijale 400, 600 i 800 mg/kg genisteina (6,27, 6,30 i 6,29, pojedinačno) u odnosu na kontrolnu grupu (6,08) ( $P=0,0051$ ). pH vrednosti koje su izmerene 24 h, odnosno 48 h, nakon klanja nisu se razlikovale između svih ispitivanih grupa brojlera i bile su u opsegu od 5,78 (K grupa) do 5,96 (O-IV grupa), odnosno od 5,74 (K grupa) do 5,98 (O-II grupa).





Grafik 5.15. pH vrednost mesa grudi brojlera kontrolne i oglednih grupa 45 min., 24 h i 48 h nakon klanja 42. dana tova

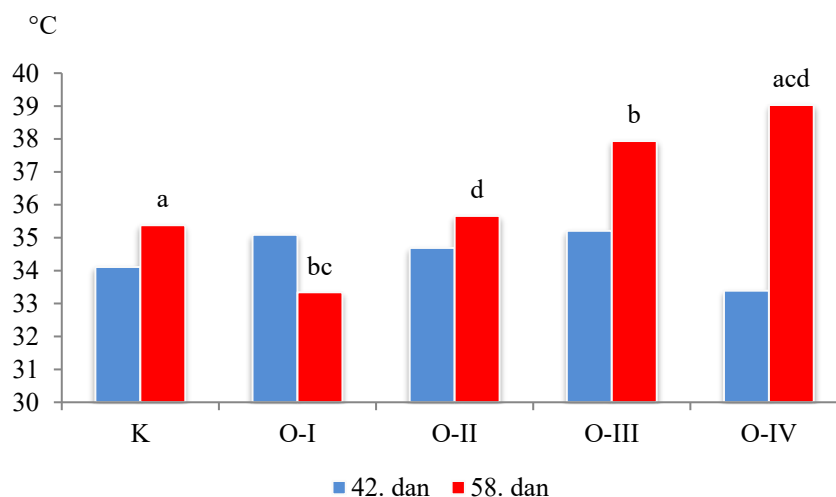
Na Grafiku 5.16. mogu se videti pH vrednosti mesa grudi brojlera 58. dana tova. Rezultati merenja pH vrednosti 45 minuta nakon klanja bili su u opsegu od 6,18 (O-I grupa) do 6,25 (K grupa), bez razlika između posmatranih grupa ( $P=0,1499$ ). Prilikom dva naredna merenja došlo je do pada u pH vrednosti mesa grudi brojlera za oko 0,2, tako da je nakon 24 h ta vrednost bila oko 6,01, a nakon 48 h oko 5,98, za sve ispitivane grupe koje se između sebe nisu značajno razlikovale ( $P=0,8598$  i  $P=0,8740$ , pojedinačno).



Grafik 5.16. pH vrednost mesa grudi brojlera kontrolne i oglednih grupa 45 min., 24 h i 48 h nakon klanja 58. dana tova

Temperatura mesa grudi izmerena 15-20 minuta nakon klanja za prvi eksperimentalni period bila je slična za kontrolnu i ogledne grupe brojlera, oko 34,48 °C. Nakon drugog eksperimentalnog perioda temperatura mesa grudi brojlera koji su u hrani dobijali 800 mg/kg genisteina (39,03 °C) bila je

značajno viša od kontrolne (35,38 °C) i grupe brojlera koje su dobijale 200 i 400 mg/kg genisteina (33,34 °C i 35,66 °C, pojedinačno). Dodatno, grupa koja je bila suplementirana sa 600 mg/kg genisteina imala je značajno višu temperaturu mesa 15-20 minuta nakon klanja (37,94 °C) u poređenju sa O-I grupom ( $P < 0,0001$ ) (Grafik 5.17).



Grafik 5.17. Temperatura mesa grudi 15-20 min. nakon klanja

Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>- $P < 0,05$  između grupa 58. dana tova

#### 5.14. Sposobnost vezivanja vode (SVV)

U Tabeli 5.14. može se videti da je u svim oglednim grupama nakon prvog eksperimentalnog perioda zabeležena značajno bolja sposobnost vezivanja vode u mesu grudi brojlera u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu je najniža SVV vrednost utvrđena u grupi koja je preko hrane dobijala najvišu količinu genisteina, 800 mg/kg (0,55%), a ova vrednost se značajno razlikovala i od ostalih oglednih grupa brojlera ( $P < 0,0001$ ). Nakon produženog tova (58. dan) vrednosti parametra sposobnosti vezivanja vode u grupama koje su bile suplementirane sa 200, 400 i 600 mg/kg genisteina u hrani (0,658%, 0,749% i 0,936%, pojedinačno) bile su značajno niže ( $P < 0,0001$ ) od kontrolne (1,582%) i grupe koja je dobijala 800 mg/kg genisteina (1,422%) koje se između sebe nisu razlikovale ( $P = 0,3720$ ).

Tabela 5.17. Uticaj genisteina na SVV vrednosti mesa grudi brojlera ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
SVV (%)						
42. dan	1,367±0,154 <sup>abcd</sup>	0,867±0,145 <sup>ae</sup>	1,073±0,117 <sup>bf</sup>	0,966±0,261 <sup>cg</sup>	0,55±0,124 <sup>defg</sup>	<0,0001
58. dan	1,582±0,374 <sup>abc</sup>	0,658±0,144 <sup>ad</sup>	0,749±0,141 <sup>be</sup>	0,936±0,14 <sup>cf</sup>	1,42±0,196 <sup>def</sup>	<0,0001

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>- $P < 0,05$ ; n=12 (2×6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

### 5.15. Hemijski sastav mesa brojlera

Nakon konvencionalnog tova (42. dan) sadržaj proteina u mesu grudi brojlera kontrolne i oglednih grupa nije se značajno razlikovao, sa izuzetkom O-III grupe u kojoj je sadržaj proteina (21,33%) bio niži u odnosu na kontrolnu (23,53%) i O-IV grupu (23,77%) ( $P=0,0008$ ). Sadržaj vode bio je viši u grupama koje su dobijale 200, 400 i 600 mg/kg genisteina u hrani u odnosu na kontrolnu grupu ( $P<0,0001$ ). Uočen je niži sadržaj masti u mesu grudi oglednih grupa, sa najnižom vrednošću u O-IV grupi (1,18%) koja se značajno razlikovala od kontrolne (1,99%) i O-I grupe brojlera (1,76%) ( $P<0,0001$ ). Grupe koje su dobijale najveće količine genisteina (O-III i O-IV grupa) imale su značajno niži sadržaj pepela u odnosu na kontrolnu grupu ( $P=0,0049$ ) (Tabela 5.18.). Sadržaj proteina u mesu grudi brojlera nakon 58. dana tova bio je značajno viši u svim oglednim grupama u poređenju sa kontrolnom grupom, a dodatno, grupe koje su dobijale 600 i 800 mg/kg genisteina značajno su se razlikovale i od O-I, i od O-II grupe brojlera ( $P<0,0001$ ). Sadržaj vode mesa grudi u svim oglednim grupama bio je manji u odnosu na kontrolnu grupu ( $P<0,0001$ ), sa najnižom vrednošću u O-III grupi (69,97%) koja se razlikovala i od O-I i O-II grupe brojlera (72,18% i 73,00%, pojedinačno). Suplementacijom sa 400, 600 i 800 mg/kg genisteina postignut je značajno niži sadržaj masti (1,57%, 1,67% i 1,57%, pojedinačno) u mesu grudi brojlera u odnosu na kontrolnu grupu (2,50%) ( $P=0,0007$ ). Sadržaj pepela nije se razlikovao između posmatranih grupa brojlera nakon produženog tova ( $P=0,2242$ ) (Tabela 5.18.).

Tabela 5.18. Hemijski sastav mesa grudi brojlera ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Proteini (%)</i>						
42. dan	23,53±0,25 <sup>a</sup>	22,38±0,19	22,48±0,35	21,33±1,64 <sup>ab</sup>	23,77±1,17 <sup>b</sup>	0,0008
58. dan	21,55±0,96 <sup>abcd</sup>	24,34±1,01 <sup>ae</sup>	24,32±0,43 <sup>bgh</sup>	27,29±1,05 <sup>ceg</sup>	26,54±1,32 <sup>dgh</sup>	<0,0001
<i>Voda (%)</i>						
42. dan	73,38±0,26 <sup>abc</sup>	74,79±0,32 <sup>a</sup>	74,90±0,37 <sup>b</sup>	76,07±1,36 <sup>cd</sup>	74,00±1,09 <sup>d</sup>	<0,0001
58. dan	74,83±0,60 <sup>abcd</sup>	72,18±1,37 <sup>ae</sup>	73,00±0,64 <sup>bfg</sup>	69,97±1,12 <sup>cef</sup>	70,81±1,10 <sup>dg</sup>	<0,0001
<i>Masti (%)</i>						
42. dan	1,99±0,35 <sup>a</sup>	1,76±0,34 <sup>b</sup>	1,57±0,28	1,57±0,38	1,18±0,27 <sup>ab</sup>	<0,0001
58. dan	2,50±0,38 <sup>abc</sup>	2,39±0,57 <sup>de</sup>	1,57±0,25 <sup>ad</sup>	1,67±0,46 <sup>b</sup>	1,57±0,43 <sup>ce</sup>	0,0007
<i>Pepeo (%)</i>						
42. dan	1,10±0,03 <sup>ab</sup>	1,07±0,03	1,05±0,02	1,03±0,03 <sup>a</sup>	1,05±0,03 <sup>b</sup>	0,0049
58. dan	1,12±0,03	1,09±0,03	1,10±0,04	1,07±0,04	1,08±0,04	0,2242

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup>- $P<0,05$ ; n=12 (2×6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

U Tabeli 5.19. prikazan je hemijski sastav mesa karabataka brojlera kontrolne i oglednih grupa za oba eksperimentalna perioda. Nakon 42. dana tova sadržaj proteina i masti se nije razlikovao između grupa, bio je u opsegu od 19,57% (O-IV grupa) do 20,72% (O-II grupa) i od 2,38% (O-IV grupa) do 2,66% (K grupa),  $P=0,1796$  i  $P=0,8016$ , pojedinačno. Grupa koja je dobijala 800 mg/kg genisteina u hrani imala je značajno viši sadržaj vode u odnosu na grupu koja je dobijala 400 mg/kg

genisteina ( $P=0,0232$ ), dok sadržaj pepela je bio viši u kontrolnoj u odnosu na grupu koja je hranjena sa 200 mg/kg genisteina ( $P=0,0474$ ). Nakon 58. dana tova grupe koje su dobijale najviše količine genisteina u hrani, 600 i 800 mg/kg, imale su značajno viši sadržaj proteina u mesu karabataka u odnosu na sve ostale posmatrane grupe ( $P<0,0001$ ). Sadržaj vode bio je najniži u grupi koja je hranjena hranom sa dodatkom 600 mg/kg genisteina (74,64%) i značajno se razlikovao u poređenju sa kontrolnom i ostalim oglednim grupama brojlera ( $P<0,0001$ ). Sadržaj masti u mesu karabataka opadao je sa rastućim količinama genisteina u hrani brojlera, i bio je od 4,83% (K grupa) do 2,10% (O-IV grupa), pri čemu su se sve grupe značajno razlikovale između sebe ( $P<0,0001$ ). Prema sadržaju pepela značajno su se razlikovale samo O-I i O-II grupa brojlera (0,99% i 1,05%,  $P=0,0182$ ).

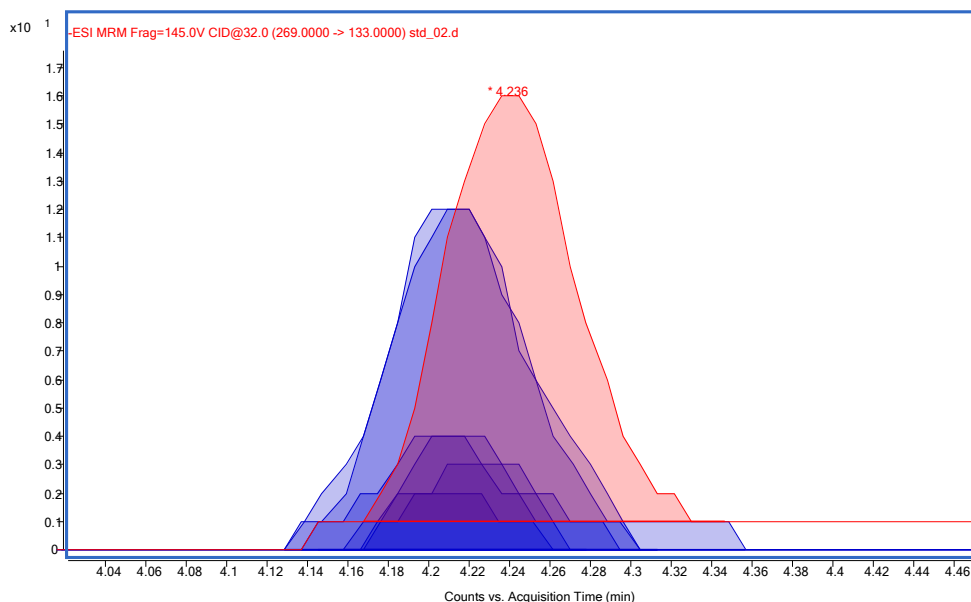
Tabela 5.19. Hemijski sastav mesa karabataka brojlera ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>Proteini (%)</i>						
42. dan	20,14±1,24	19,64±0,63	20,72±0,78	19,58±1,26	19,57±0,52	0,1796
58. dan	18,79±0,54 <sup>ab</sup>	18,94±0,29 <sup>cd</sup>	19,00±0,23 <sup>ef</sup>	21,53±0,68 <sup>ace</sup>	20,94±0,36 <sup>bdf</sup>	<0,0001
<i>Voda (%)</i>						
42. dan	76,10±1,33	76,77±0,23	75,65±0,89 <sup>a</sup>	76,97±0,65	77,01±0,31 <sup>a</sup>	0,0232
58. dan	75,37±0,53 <sup>ab</sup>	75,92±0,29 <sup>c</sup>	76,48±0,32 <sup>ad</sup>	74,64±0,41 <sup>bcd</sup>	75,94±0,30 <sup>e</sup>	<0,0001
<i>Masti (%)</i>						
42. dan	2,66±0,15	2,58±0,62	2,58±0,41	2,41±0,61	2,38±0,38	0,8016
58. dan	4,83±0,20 <sup>abcd</sup>	4,15±0,48 <sup>aefg</sup>	3,47±0,14 <sup>behi</sup>	2,82±0,38 <sup>fhj</sup>	2,10±0,30 <sup>dgij</sup>	<0,0001
<i>Pepeo (%)</i>						
42. dan	1,10±0,04 <sup>a</sup>	1,01±0,03 <sup>a</sup>	1,06±0,05	1,05±0,06	1,04±0,05	0,0474
58. dan	1,01±0,03	0,99±0,02 <sup>a</sup>	1,05±0,03 <sup>a</sup>	1,01±0,02	1,02±0,04	0,0182

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i,j</sup>- $P<0,05$ ; n=12 (2×6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

### 5.16. Sadržaj genisteina u mesu grudi brojlera

Korišćenjem HPLC-DAD-ESI-MS/MS tehnike utvrđeno je da je sadržaj genisteina u mesu grudi brojlera kontrolne i oglednih grupa za oba eksperimentalna perioda bio ispod granice kvantifikacije (<5,6 nmol/kg mesa). Grafik 5.18. predstavlja hromatograme ispitivanih uzoraka mesa grudi kontrolne i grupa brojlera suplementiranih sa 200, 400, 600 i 800 mg/kg genisteina nakon 58. dana tova praćenih u SRM modu (Selected Reactions Monitoring).



Grafik 5.18. SRM hromatogrami ispitivanih uzoraka mesa. Crveni pik označava standardni rastvor najniže ispitivane koncentracije (3,05 ng/ml).

### 5.17. TBARS vrednost u mesu karabataka brojlera

TBARS vrednost u uzorcima mesa karabataka, uzetih nakon klanja 42. dana, na početku i na kraju skladištenja nije se značajno razlikovala između grupa, bila je u opsegu od 0,12 mg MDA/kg (O-IV grupa) do 0,16 mg MDA/kg (K grupa), i od 0,83 mg MDA/kg (O-IV grupa) do 0,96 mg MDA/kg (K grupa),  $P=0,0599$  i  $P=0,0986$ , pojedinačno. Nakon tri i devet meseci skladištenja kontrolna grupa je imala značajno viši sadržaj MDA u uzorcima karabataka u odnosu na grupe koje su u hrani dobijale 200, 400 i 800 mg/kg genisteina ( $P=0,0081$  i  $P<0,0001$ , pojedinačno). Grupa koja je dobijala najvišu količinu genisteina (O-IV grupa) nakon šest meseci skladištenja imala je najniže vrednosti TBARS u uzorcima karabataka (0,27), koje su se značajno razlikovale od kontrolne (0,42) i grupa suplementiranih sa 200 i 600 mg/kg genisteina (0,35 i 0,38,  $P<0,0001$ ). Nakon klanja brojlera 58. dana TBARS vrednost bila je niža u O-IV grupi u odnosu na kontrolnu, O-II i O-III grupu brojlera ( $P<0,0001$ ). Nakon tri meseca skladištenja sadržaj MDA u uzorcima kontrolne grupe brojlera (0,44) bio je značajno viši u poređenju sa svim oglednim grupama, a dodatno, grupa koja je u hrani dobijala 800 mg/kg genisteina imala je najniži sadržaj MDA (0,21) koji se značajno razlikovao od ostalih oglednih grupa ( $P<0,0001$ ). Šestog meseca skladištenja se održala slična dinamika stvaranja produkata lipidne peroksidacije, odnosno kontrolna grupa je i dalje imala značajno višu TBARS vrednost (0,91) u odnosu na sve ogledne grupe (0,59; 0,54; 0,66 i 0,55 mg MDA/kg, za O-I, O-II, O-III i O-IV grupu, pojedinačno) ( $P<0,0001$ ). Nakon devet meseci skladištenja najviša TBARS vrednost bila je u K grupi (0,96), značajno viša od svih oglednih ( $P<0,0001$ ), dok je najniža bila u O-IV grupi (0,61) značajno niža u odnosu na O-II i O-III grupu brojlera ( $P<0,0001$ ). Prilikom poslednjeg merenja MDA u uzorcima mesa karabataka uzetih nakon

produženog tova nije uočena značajna razlika između grupe koja nije dobijala i grupa koje su u hrani dobijale 200, 400, 600 i 800 mg/kg genisteina ( $P=0,0670$ ) (Tabela 5.20.).

Tabela 5.20. Uticaj rastućih količina genisteina na oksidativnu stabilnost mesa karabataka tokom skladištenja pri temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  izražena kao TBARS vrednost (mg malondialdehida/kg mesa) ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Parametar	Eksperimentalne grupe					P vrednost
	K	O-I	O-II	O-III	O-IV	
<i>0. dan</i>						
42. dan	0,16±0,025	0,15±0,025	0,13±0,018	0,15±0,024	0,12±0,027	0,0599
58. dan	0,25±0,043 <sup>a</sup>	0,20±0,037 <sup>b</sup>	0,21±0,033 <sup>c</sup>	0,27±0,047 <sup>bd</sup>	0,14±0,023 <sup>acd</sup>	<0,0001
<i>3. mesec</i>						
42. dan	0,22±0,038 <sup>abc</sup>	0,17±0,019 <sup>a</sup>	0,16±0,020 <sup>b</sup>	0,19±0,026	0,17±0,029 <sup>c</sup>	0,0081
58. dan	0,44±0,058 <sup>abcd</sup>	0,29±0,037 <sup>ac</sup>	0,31±0,040 <sup>bf</sup>	0,33±0,037 <sup>cg</sup>	0,21±0,035 <sup>defg</sup>	<0,0001
<i>6. mesec</i>						
42. dan	0,42±0,051 <sup>ab</sup>	0,35±0,041 <sup>c</sup>	0,31±0,046 <sup>a</sup>	0,38±0,046 <sup>d</sup>	0,27±0,041 <sup>bcd</sup>	<0,0001
58. dan	0,91±0,104 <sup>abcd</sup>	0,59±0,057 <sup>a</sup>	0,54±0,057 <sup>b</sup>	0,66±0,055 <sup>c</sup>	0,55±0,089 <sup>d</sup>	<0,0001
<i>9. mesec</i>						
42. dan	0,82±0,096 <sup>abc</sup>	0,65±0,058 <sup>a</sup>	0,66±0,066 <sup>b</sup>	0,77±0,071 <sup>d</sup>	0,54±0,065 <sup>cd</sup>	<0,0001
58. dan	0,96±0,079 <sup>abcd</sup>	0,68±0,072 <sup>ac</sup>	0,73±0,074 <sup>bf</sup>	0,80±0,062 <sup>ceg</sup>	0,61±0,059 <sup>dfg</sup>	<0,0001
<i>12. mesec</i>						
42. dan	0,96±0,080	0,87±0,093	0,89±0,074	0,91±0,078	0,83±0,070	0,0986
58. dan	1,13±0,102	1,06±0,093	1,01±0,098	1,11±0,085	0,98±0,116	0,0670

Legenda: U istom redu ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>- $P<0,05$ ;  $n=6$  ( $1\times 6$ ); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

### 5.18. Senzorska ispitivanja mesa grudi i bataka sa karabatakom

Rezultati kvantitativne deskriptivne analize uzoraka mesa grudi brojlera kontrolne i oglednih grupa nakon prvog eksperimentalnog perioda prikazani su u Tabeli 5.21. Razlike u ocenama boje, mirisa, mekoće i sočnosti nisu uočene između svih ispitivanih grupa ( $P=0,4287$ ;  $P=0,1321$ ;  $P=0,3825$  i  $P=0,1558$ , pojedinačno). Najnižu ocenu za ukus imala je grupa koja je dobijala 200 mg/kg genisteina u hrani (5,56) i značajno se razlikovala od grupa koje su suplementirane sa 600 i 800 mg/kg genisteina (6,75 i 6,75, pojedinačno) ( $P=0,0136$ ). Dodatno, grupa koja je dobijala 200 mg/kg genisteina u hrani imala je i najnižu ocenu za ukupnu prihvatljivost (5,56), a značajno se razlikovala od O-III grupe koja je bila najbolje ocenjena za ovaj parametar (6,81) ( $P=0,0089$ ).

Tabela 5.21. Senzorska ocena mesa grudi nakon 42. dana tova ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Uzorak	Boja	Miris	Ukus	Mekoća	Sočnost	Ukupna prihvatljivost
K	7,00±0,00	6,88±0,35	6,44±0,78	6,06±0,50	6,13±0,58	6,38±0,58
OI	7,00±0,00	6,94±0,18	5,56±0,90 <sup>ab</sup>	6,00±0,53	5,69±0,65	5,56±0,86 <sup>a</sup>
OII	6,94±0,18	6,69±0,59	6,13±1,03	6,44±0,73	6,44±0,73	6,38±0,69
OIII	7,00±0,00	6,88±0,35	6,75±0,38 <sup>a</sup>	6,50±0,76	6,56±0,73	6,81±0,37 <sup>a</sup>
OIV	7,00±0,00	6,44±0,50	6,75±0,46 <sup>b</sup>	6,00±0,80	6,00±0,96	6,19±0,59

Legenda: U istoj koloni ista slova <sup>a,b</sup>- $P < 0,05$ ;  $n=12$  ( $2 \times 6$ ); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

Nešto izraženije razlike pri senzorskoj oceni uočene su kod ispitivanja uzoraka bataka sa karabatakom (Tabela 5.22.). Slično uzorcima mesa grudi, i uzorci bataka sa karabatakom se nisu razlikovali u oceni boje i mirisa između ispitivanih grupa ( $P=0,6348$  i  $P=0,3364$ ). Međutim uzorci bataka sa karabatakom grupa suplementiranih sa 600 i 800 mg/kg genisteina su dobili najviše ocene za: ukus (značajna razlika u poređenju sa O-II grupom,  $P=0,0099$ ) i mekoću (značajna razlika u poređenju sa O-I i K grupom, pojedinačno,  $P=0,0018$ ). Dodatno, grupa koja je u hrani dobijala 800 mg/kg genisteina je bila najbolje ocenjena za sočnost (6,87), i značajno se razlikovala u odnosu na O-I i O-II grupu (6,12 i 6,06;  $P=0,0061$ ), dok kao najbolje ocenjena za ukupnu prihvatljivost (7,00) značajno se razlikovala od kontrolne i svih ostalih oglednih grupa brojlera ( $P < 0,0001$ ).

Tabela 5.22. Senzorska ocena mesa bataka sa karabatakom nakon 42. dana tova ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Uzorak	Boja	Miris	Ukus	Mekoća	Sočnost	Ukupna prihvatljivost
K	6,87±0,35	6,69±0,59	6,19±0,46	6,00±0,76 <sup>a</sup>	6,56±0,42	6,19±0,46 <sup>ab</sup>
OI	6,81±0,26	6,25±0,65	6,12±0,88	6,00±0,53 <sup>bc</sup>	6,12±0,79 <sup>a</sup>	6,31±0,59 <sup>cd</sup>
OII	6,87±0,35	6,44±0,50	5,94±0,68 <sup>ab</sup>	6,31±0,46	6,06±0,50 <sup>b</sup>	6,19±0,37 <sup>e</sup>
OIII	6,94±0,18	6,69±0,60	6,81±0,37 <sup>a</sup>	6,75±0,38 <sup>b</sup>	6,75±0,38	6,94±0,18 <sup>acf</sup>
OIV	6,69±0,46	6,75±0,38	6,81±0,37 <sup>b</sup>	6,94±0,18 <sup>ac</sup>	6,87±0,23 <sup>ab</sup>	7,00±0,00 <sup>bdef</sup>

Legenda: U istoj koloni ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup>- $P < 0,05$ ;  $n=12$  ( $2 \times 6$ ); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

Nakon produženog tova (58. dan) senzorskom analizom uzoraka mesa grudi nije utvrđena razlika u boji, kontrolna i O-I grupa bile su značajno lošije ocenjene za miris u poređenju sa ostalim oglednim grupama ( $P < 0,0001$ ), dok su grupe O-II i O-IV bile najbolje ocenjene za ukus sa značajnom razlikom u odnosu na kontrolnu, O-I i O-II grupu ( $P < 0,0001$ ). Ocene za mekoću i sočnost bile su u opsegu od 5,50 (K grupa) do 6,93 (O-II grupa) za oba ova parametra, za koje razlika nije uočena samo između O-I i O-III grupe brojlera ( $P > 0,05$ ). Meso grudi grupa suplementiranih sa 400 i 800 mg/kg genisteina bilo je najprihvatljivije (7,00 i 6,86) i značajno se razlikovalo od ostalih grupa brojlera ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 5.23.).

Tabela 5.23. Senzorska ocena mesa grudi 58. dan ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Uzorak	Boja	Miris	Ukus	Mekoća	Sočnost	Ukupna prihvatljivost
K	7,00±0,00	6,07±0,19 <sup>abcd</sup>	5,86±0,24 <sup>ab</sup>	5,50±0,00 <sup>abcd</sup>	5,50±0,00 <sup>abcd</sup>	5,79±0,27 <sup>ab</sup>
OI	7,00±0,00	6,50±0,00 <sup>ae fg</sup>	5,86±0,24 <sup>cd</sup>	6,00±0,00 <sup>ae f</sup>	6,00±0,00 <sup>ae f</sup>	6,07±0,19 <sup>cd</sup>
OII	7,00±0,00	6,93±0,19 <sup>be</sup>	6,93±0,19 <sup>ace</sup>	6,93±0,19 <sup>beg</sup>	6,93±0,19 <sup>beg</sup>	7,00±0,00 <sup>ace</sup>
OIII	7,00±0,00	7,00±0,00 <sup>cf</sup>	6,07±0,19 <sup>ef</sup>	6,07±0,45 <sup>cgh</sup>	5,93±0,45 <sup>cgh</sup>	6,07±0,45 <sup>ef</sup>
OIV	7,00±0,00	6,93±0,19 <sup>dg</sup>	6,86±0,24 <sup>bdf</sup>	6,64±0,38 <sup>d fh</sup>	6,57±0,35 <sup>d fh</sup>	6,86±0,24 <sup>bdf</sup>

Legenda: U istoj koloni ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup>-P<0,05; n=12 (2×6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

Uzorci bataka sa karabatakom nakon drugog eksperimentalnog perioda se nisu razlikovali u pogledu boje i mirisa (P>0,05). Značajno niže ocene za ukus dobila je grupa brojlera sa 600 mg/kg genisteina u hrani (6,00) u odnosu na kontrolnu i grupe sa 200 i 400 mg/kg genisteina (P=0,0013). Kontrolna grupa i grupa suplementirana sa 600 mg/kg genisteina dobile su najniže ocene za mekoću i ukupnu prihvatljivost, gde su se značajno razlikovale od ostalih ispitivanih grupa za oba parametra (P<0,0001 i P<0,0001, pojedinačno). Takođe su dobile i najniže ocene za sočnost (6,00 i 6,36), s tim da između ove dve grupe nije postojala značajna razlika (P>0,05) (Tabela 5.24).

Tabela 5.24. Senzorska ocena mesa bataka sa karabatakom 58. dan ( $\bar{X} \pm Sd$ )

Uzorak	Boja	Miris	Ukus	Mekoća	Sočnost	Ukupna prihvatljivost
K	7,00±0,00	6,64±0,24	6,57±0,35 <sup>a</sup>	6,07±0,19 <sup>abc</sup>	6,00±0,00 <sup>abcd</sup>	6,14±0,24 <sup>abc</sup>
OI	7,00±0,00	6,64±0,38	6,64±0,24 <sup>b</sup>	7,00±0,00 <sup>ad</sup>	6,93±0,19 <sup>ae</sup>	6,79±0,27 <sup>ad</sup>
OII	7,00±0,00	6,71±0,39	6,86±0,24 <sup>c</sup>	6,93±0,19 <sup>bc</sup>	6,93±0,19 <sup>bf</sup>	6,93±0,19 <sup>bc</sup>
OIII	7,00±0,00	6,79±0,39	6,00±0,41 <sup>abc</sup>	6,36±0,24 <sup>def</sup>	6,36±0,24 <sup>cefg</sup>	6,14±0,24 <sup>def</sup>
OIV	7,00±0,00	6,64±0,38	6,43±0,45	6,86±0,24 <sup>cf</sup>	6,93±0,19 <sup>dg</sup>	6,93±0,19 <sup>cf</sup>

Legenda: U istoj koloni ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>-P<0,05; n=12 (2×6); K-kontrola; O-I- 200 mg/kg genisteina; O-II- 400 mg/kg genisteina; O-III- 600 mg/kg genisteina; O-IV- 800 mg/kg genisteina

### 5.19. Izračunavanje ekonomičnosti proizvodnje brojlera u završnoj fazi tova

U Tabeli 5.25. prikazani su različiti pokazatelji ekonomičnosti proizvodnje brojlera kontrolne i oglednih grupa konvencionalne (tokom 21 dana) i produžene završne faze tova (tokom 37 dana). Ukupna potrošnja hrane je izračunata na osnovu ukupne konzumacije za svaku grupu za oba eksperimentalna perioda. Za periode od 21.-42. i od 43.-58. dana tova ukupna potrošnja hrane bila je slična između grupa, oko 224,4 kg i 121,02 kg za sve grupe, pojedinačno. Cena hrane u oglednim grupama je bila viša u odnosu na grupu koja nije dobijala ekstrakt genisteina u hrani. S povećanjem koncentracije za 200 mg genisteina rasla je cena hrane za 9,17 dinara, tako da je kod kontrolne grupe iznosila 40,20 din, a kod O-IV grupe 76,88 din. Množenjem cene sa ukupnom potrošnjom dobijena je ukupna cena hrane za konvencionalnu i produženu treću fazu tova. S obzirom da razlike u potrošnji hrane nisu bile izražene, ovaj parametar je rastao najviše na račun rasta cene hrane po



kilogramu u oglednim grupama. Fiksni troškovi, koji podrazumevaju rad zaposlenih i amortizaciju, bili su isti za sve grupe po periodima. Tako da su za prvi period iznosili 26,83%, a za drugi 24,75% srednje vrednosti varijabilnih troškova za sve grupe brojlera. Ukupni prirast je bio niži u kontrolnoj grupi (119,23 kg) u odnosu na sve ogledne u kojima je ukupni prirast bio u opsegu od 125,78 kg (O-I grupa) do 133,49 kg (O-III grupa) nakon 42. dana tova, dok nakon 58. dana najniži prirast je zabeležen u O-III grupi (41,00 kg), a najviši u O-IV grupi brojlera (50,65 kg).

Tabela 5.25. Parametri ekonomičnosti proizvodnje za dva eksperimentalna perioda

Eksperimentalne grupe	Parametri				
	Ukupna potrošnja hrane	Cena (din/kg)	Ukupna cena hrane	Fiksni troškovi (din)	Ukupni prirast brojlera
<i>Konvencionalni tov (21.-42. dan)*</i>					
K	232,99	40,20	9366,20	3500	119,23
O-I	225,58	49,37	11136,88	3500	125,78
O-II	237,10	58,54	13879,83	3500	133,49
O-III	213,41	67,71	14449,99	3500	130,25
O-IV	213,05	76,88	16379,28	3500	129,10
<i>Produženi tov (42.-58. dan)†</i>					
K	124,56	40,20	5007,31	1750	46,55
O-I	117,04	49,37	5778,26	1750	46,73
O-II	125,42	58,54	7342,09	1750	47,63
O-III	118,15	67,71	7999,94	1750	41,00
O-IV	119,95	76,88	9221,76	1750	50,65

Legenda: \* n=72 (6×12); †n=36 (6×6)

Ukupni troškovi za prvi eksperimentalni period, dobijeni sabiranjem ukupne cene hrane i fiksnih troškova, najniži su bili u kontrolnoj grupi, dok u oglednim grupama su bili viši za 13,76%, 35,08%, 39,51% i 54,51%. Za drugi eksperimentalni period rast ukupnih troškova u O-I i O-II oglednoj grupi bio je manji upoređujući sa konvencionalnim tovom (11,41% i 34,55%), a veći u O-III i O-IV grupi brojlera (44,29% i 62,37%). Vrednost proizvodnje, dobijena množenjem ukupnog prirasta sa cenom žive mase brojlera (160 din), nakon 42. dana tova bila je za ogledne grupe viša u proseku 7% u odnosu na kontrolnu grupu. Nakon 58. dana tova porast vrednosti proizvodnje uočena je u O-I (0,39%), O-II (2,32%) i O-IV (8,81%) grupi u odnosu na kontrolnu grupu, dok je u O-III grupi vrednost proizvodnje bila niža za 11,92%. Finansijski rezultat, izračunat iz razlike vrednosti proizvodnje i ukupnih troškova, za prvi eksperimentalni period bio je u opsegu od 776,7 din (O-IV grupa) do 6210,6 din (K grupa), dok nakon produženog tova je bio negativan u svim oglednim grupama, i to u opsegu od -3190 din (O-III grupa) do -51 din (O-I grupa). Iz odnosa ukupnih troškova i ukupnog prirasta izračinata je cena koštanja po kilogramu koja je nakon konvencionalnog tova rasla sa porastom količine genisteina u hrani, pa je najviša bila u grupi sa 800 mg/kg genisteina 153,98 din, dok je u kontrolnoj grupi iznosila 107,91 din. Za razliku od prvog eksperimentalnog perioda, nakon 58. dana tova najviša cena koštanja je uočena u grupi koja je dobijala 600 mg/kg genisteina u hrani (237,8 din) koja je bila 63,82% viša u odnosu na cenu koštanja kontrolne grupe

(145,16 din). Koeficijent ekonomičnosti (odnos vrednosti proizvodnje i ukupnih troškova) bio je najbolji u kontrolnoj grupi za prvi eksperimentalni period (1,48), a u oglednim grupama se smanjivao za 0,11, 0,25, 0,32 i 0,44 u O-I, O-II, O-III i O-IV grupama, pojedinačno. Produženi tov je takođe doveo do nižih vrednosti koeficijenta ekonomičnosti u oglednim grupama u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu je najlošiju isplativost poslovanja ostvarila grupa suplementirana sa 600 mg/kg genisteina (0,67) (Tabela 5.26.).

Tabela 5.26. Finansijski pokazatelji ostvareni po grupama

Rezultat	Eksperimentalne grupe									
	K		O-I		O-II		O-III		O-IV	
	din	indeks	din	indeks	din	indeks	din	indeks	din	indeks
<i>Konvencionalni tov (21.-42. dan)*</i>										
Ukupni troškovi	12866,2	100	14636,9	113,76	17379,8	135,08	17950	139,51	19879,3	154,51
Vrednost proizvodnje	19076,8	100	20124,8	105,49	21358,4	111,96	20840	109,24	20656	108,28
Finansijski rezultat	6210,6	100	5487,9	88,36	3978,6	64,06	2890	46,53	776,7	12,50
Cena koštanja/kg	107,91	100	116,37	107,84	130,20	120,66	137,81	127,71	153,98	142,69
Koeficijent ekonomičnosti	1,48	100	1,37	92,57	1,23	83,11	1,16	78,39	1,04	70,27
<i>Produženi tov (42.-58. dan)†</i>										
Ukupni troškovi	6757,3	100	7528,3	111,41	9092,1	134,55	9749,9	144,29	10971,8	162,37
Vrednost proizvodnje	7448	100	7476,8	100,39	7620,8	102,32	6560	88,08	8104	108,81
Finansijski rezultat	690,7	100	-51,5	7,45	-1471,3	213,02	-3190	461,84	-2867,8	415,20
Cena koštanja/kg	145,16	100	161,10	110,98	190,89	131,50	237,80	163,82	216,62	149,23
Koeficijent ekonomičnosti	1,10	100	0,99	90	0,84	76,36	0,67	60,91	0,74	67,27

Legenda: \* n=72 (6×12); †n=36 (6×6)

## 6. DISKUSIJA

### 6.1. Hemijski sastav hrane za brojlere

Formulisanje izbalansirane ishrane je osnova isplative i efikasne živinarske proizvodnje i direktno zavisi od nutritivnih potreba brojlera i hemijskog sastava i svarljivosti hraniva. Obroci za živinu se primarno sastoje od mešanjem nekoliko hraniva, kao što su zrnasta hraniva, sojina sačma, hraniva životinjskog porekla, masti i vitaminski i mineralni premiksi. Ovakvi obroci, zajedno sa vodom, obezbeđuju energiju i hranjive materije (proteini, aminokiseline, ugljeni hidrati, masti, minerali i vitamini) koji su esencijalni za rast, razvoj i održavanje zdravlja brojlera (NRC, 1994).

Postoji više faktora koji otežavaju određivanje optimalnog nivoa esencijalnih materija u smešama za ishranu živine, odnosno u sastavljanju obroka kojima se postiže maksimalni profit proizvodnje. Tako npr. pošto nije praktično određivati hemijski sastav i svarljivost svake sirovine u smeši, kako bi se sigurno obezbedio minimum nutritivnih specifikacija (potreba) u smešama za ishranu živine, u smešama se dodaju nešto veće količine pojedinačnih hraniva. Dodatno, teško je utvrditi realnu zavisnost konzumacije i prirasta brojlera u tovu (Pesti i sar., 2009). Brojlerima u tovu je obično dozvoljen *ad libitum* pristup hrani i vodi kako bi u što kraćem roku dostigli klaničnu masu, a na tržištu se mogu naći brojleri različite starosti i telesne mase (900-1000 g; 1,8-2 kg; 2,8-3 kg), u zavisnosti da li se u promet stavljaju kao trupovi, polutke, četvrti ili u osnovnim delovima. Iz navedenih razloga teško je odrediti jedinstvene potrebe koje bi odgovarale svim tipovima proizvodnje brojlera (NRC, 1994).

Sirovinski sastav smeša za ishranu brojlera I, II i III u ovom eksperimentu određen je prema standardnoj recepturi Katedre za ishranu i botaniku Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. Finišer kontrolne i oglednih grupa je bio istog hemijskog sastava, izbalansiran, izoenergetski i izoproteinski, tako da dodavanje genisteina u količini od 200 do 800 mg/kg nije uticao na parametre hemijskog sastava. Analitički hemijski sastav potpunih smeša za ishranu brojlera delimično je odstupao od kalkulativnog sastava (Tabela 4.1.; Tabela 5.1.). Sadržaj vlage i pepela je bio niži, dok sadržaj proteina, masti i sirove celuloze viši kod hemijske analize, što pokazuje da su korišćena hraniva po hemijskom sastavu neznatno odstupala od standardnih vrednosti definisanih programom "NUTRIMIX v7 software" kojim je izračunat kalkulativni sastav smeša u ovom eksperimentu.

Prema uslovima za kvalitet potpune smeše za ishranu kokoši, definisanim članom 61. Pravilnika o kvalitetu hrane za životinje, najmanji sadržaj proteina za starter, grover i finišer je 22%, 19% i 17%, pojedinačno (Anon, 2017). Prema nutritivnim preporukama za Cobb 500 provenijenciju sadržaj proteina za ove tri smeše bi trebalo da iznosi 21-22% za starter, 19-20% za grover i 17-18% za

finišer (Anon, 2012). Dobijeni rezultati sadržaja proteina za sve tri smeše koje su korišćene u ovom eksperimentu (22,40%, 20,85% i 18,19%) bili su u saglasnosti sa prethodno navedenim uslovima, čime je pokazano da ovakva formulacija zadovoljava potrebe u proteinima Cobb 500 brojlera za svaku fazu tova.

Energija koja je neophodna za održavanje metabolizma brojlera namenjenih za proizvodnju mesa potiče od komponenata koje podižu energetska vrednost obroka, primarno ugljeni hidrati i masti, ali takođe i proteini. Vrednosti metaboličke energije koriste se za normiranje potreba brojlera u energiji. Metabolička energija (ME) je energija koja se izražava u megadžulima (MJ) i predstavlja energiju koja preostaje za metabolizam, odnosno energiju koja se dobija oduzimanjem energije urina i gasova od svarljive energije. Metabolička energija smeša za ishranu brojlera iznosila je 12,64, 12,96 i 13,22 MJ/kg (Tabela 4.1.) za starter, grover i finišer. Pravilnikom je određeno da ME ne sme da bude niža od 13 MJ/kg, međutim vodič za uzgoj i ishranu Cobb 500 brojlera preporučuje da sadržaj energije bude 12,45, 12,66 i 13,18 MJ/kg za starter, grover i finišer, pojedinačno (Anon, 2017; Anon, 2012).

Prema istom članu Pravilnika o kvalitetu hrane za životinje sadržaj masti najmanje bi trebalo da bude 5% za starter i grover, sadržaj vlage najviše 13,5%, a pepela 8% za sve tri smeše, sadržaj celuloze 5% za starter i grover i 6% za finišer, kalcijuma od 0,9 do 1,1% za starter, 0,8 do 1,0% za grover i od 0,7 do 0,9% za finišer i sadržaj fosfora od 0,65% do 0,85% za starter, od 0,6 do 0,8% za grover i 0,5 do 0,7% za finišer (Anon, 2017). Iz Tabale 5.1. se može zaključiti da je po svim navedenim parametrima obrok sastavljen prema Tabeli 4.1. hemijski ispunjavao sve Pravilnikom propisane uslove za sve tri faze tova, kao i za produženi tov kontrolne i oglednih grupa brojlera.

## **6.2. Genistein u hrani za životinje**

Sadržaj genisteina u bazalnoj hrani na bazi kukuruza i sojine sačme, i hrani suplementiranoj preparatima izoflavona ili čistom supstancom genisteina, najviše je izučavan u eksperimentima nosilja, gde je praćeno u kojoj količini izoflavoni poreklom iz hrane imaju potencijal da se prenesu i akumuliraju u jajima.

Gjorgovska i Kiril (2013) su utvrdili da sojina sačma sa 44% proteina sadrži 46,3 mg/kg ukupnih izoflavona (genistin, genistein, daidzin, daidzein, glicitin i glicitein). Sojina sačma sa 48% proteina u studiji autora Akdemir i Sahin (2009) imala je 69,1 mg/kg genisteina, a 52,1 mg/kg daidzeina. Hemijskom analizom hrane za nosilje Sahin i sar. (2006) i Onderaci i sar. (2004) su pokazali da starter za nosilje sa sojinom sačmom u količini od 22,85% sadrži 102,8 mg/kg genisteina, a grover sa 23,85% sojine sačme sadrži 107,2 mg/kg genisteina. U studiji Saitoh i sar. (2001) u bazalnoj

hrani za nosilje koja je imala 16% sojine sačme ukupna količina izoflavona bila je 368,7 mg/kg, od čega genistein je činio 10 mg/kg. U bazalnoj hrani za nosilje koja sadrži 25% sojine sačme Vargas Galdos (2009) je utvrdio 204,9 mg/kg genisteina, dok u bazalnoj hrani obogaćenoj sa ekstraktom izoflavona (5 g/100 g) koji je sadržao 5,9 mg/kg genisteina ukupni sadržaj genisteina bio je 288,3 mg/kg. Saitoh i sar. (2004) su nosilje hranili bazalnom hranom i hranom sa dodatkom niže (1800 mg/kg) i više (5300 mg/kg) koncentracije izoflavona ekstrahovanih iz sojinih hipokotiledona. Hemijskom analizom ovako formulisane hrane ukupan sadržaj izoflavona u kontrolnoj hrani iznosio je 22 mg/kg, od čega je bilo 10 mg/kg glicitina, 5 mg/kg genistina i 0,7 mg/kg ostalih izoflavona koji uključuju malonil glikozide, acetil glikozide i aglikone (daidzein, glicitein i genistein). Ukupan sadržaj izoflavona hrane sa niskom i visokom koncentracijom izoflavona bio je 1772 mg/kg i 5281 mg/kg, pojedinačno, što je predstavljalo minimalno odstupanje (1,56% i 0,36%, pojedinačno) od teoretske količine ekstrahovane čiste supstance izoflavona dodate u hranu za nosilje.

Pored navedenih eksperimenata vezanih za ishranu nosilja, rađene su i studije u kojima se ispitivao uticaj izoflavona iz hrane na rast, proizvodne performanse, kvalitet mesa i mogućnost akumuliranja ovih jedinjenja u mesu svinja. U eksperimentu Gatta i sar. (2013) hemijskom analizom sojine sačme, graška i boba pokazano je da su ova tri hraniva bogata fitoestrogenima imala najvišu koncentraciju daidzina i daidzeina, dok je sadržaj genistina bio 7546 mg/kg, 7,7 mg/kg i 8,2 mg/kg, a genisteina 361,8 mg/kg, 1,18 mg/kg i 0,43 mg/kg, pojedinačno. Nakon formulisanja tri različite smeše za ishranu svinja: prva je u sirovinskom sastavu imala 15,1% sojine sačme, druga 8,75% sojine sačme i 20% graška i treća 6,38% sojine sačme i 18% boba, i mešanja sa ostalim hranivima, utvrđeno je da je sadržaj genisteina u prvoj hrani bio 14,65 mg/kg, u drugoj 7,65 mg/kg, a u trećoj 1,59 mg/kg. Cook (1998) smatra da hrana za prasid koja u sirovinskom sastavu ima 35% sojine sačme obezbeđuje 1585 mg ukupnih izoflavona/kg hrane. Takođe je pokazao da je bazalna hrana za ishranu prasidi formulisana sa 38,28% koncentrata sojinog proteina sadržala 17 mg/kg ukupnih izoflavona, dok u drugom eksperimentu smeša za ishranu prasidi sa nižom količinom koncentrata sojinog proteina (28,85%) imala je čak 79 mg/kg genisteina. U eksperimentu izvedenom na pacovima Cook (1998) je utvrdio da bazalna hrana sa 31,19% koncentrata sojinog proteina ima 149 mg/kg ukupnih izoflavona, od čega 84 mg/kg je bio genistein. Suplementacijom ove bazalne hrane ekstraktom izoflavona poreklom iz soje u količini od 431, 862 i 1724 mg/kg, u hrani oglednih grupa pacova sadržaj ukupnih izoflavona bio je 571, 1024 i 1936 mg/kg. U sve tri eksperimentalne hrane je uočen niži sadržaj izoflavona od početno dodatog i taj pad iznosio je 1,5%, 1,29% i 3,36%, pojedinačno (263, 468 i 868 mg/kg, pojedinačno).

U poređenju sa navedenim rezultatima drugih autora, u eksperimentu ove doktorske disertacije uočena je značajno niža količina genisteina u hrani kontrolne grupe brojlera. Naime, potpuna smeša

za ishranu brojlera kontrolne grupe u završnoj i produženoj fazi tova, formulisana sa 20% sojinog griza, 1% sojine sačme i 14,7% sojine pogače, imala je manje od 20 mg/kg genisteina. Dodatno, suplementacijom 200, 400, 600 i 800 mg/kg genisteina, nakon mešanja i peletiranja, hemijskom analizom utvrđen je sadržaj od 97, 213, 432 i 651 mg/kg genisteina, pojedinačno, što predstavlja značajno odstupanje od početno dodate količine, koje se smanjivalo sa višom količinom dodatog genisteina (za 51,5%, 46,75%, 28% i 18,62%, pojedinačno) (Tabela 5.2., Grafik 5.1.).

Sojina sačma sa sadržajem proteina u opsegu od 44-48%, višim sadržajem energije i nižim sadržajem vlakana u poređenju sa ostalim uljanim sačmama predstavlja idealno hranivo pri formulisanju izbalansiranih obroka koji obezbeđuju optimalan rast i proizvodne performanse monogastričnih životinja. S druge strane, cena sojine sačme je viša od drugih hraniva koja predstavljaju biljne izvore proteina (sačma od semena pamuka, suncokretova sačma, sačma uljane repice), što se opravdava višim sadržajem kvalitetnih proteina i povoljnim sastavom visokosvarljivih aminokiselina. Naime cena hraniva je u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem proteina (Nahashon i Kilonzo-Nthenge, 2011).

Nivo izoflavona u soji varira u zavisnosti od više faktora: sorte soje (od 2344 do 4216 mg/kg), klimatskih uslova tokom godine i sezone gajenja (od 2776 do 3309 mg/kg) i mesta uzgoja (od 1176 do 1749 mg/kg). U određenim sortama soje nivo izoflavona dostiže čak 8000 mg/kg (Wang i Murphy, 1994; Kudou i sar., 1991). Pored ukupnog sadržaja izoflavona, javljaju se razlike i u masenoj zastupljenosti pojedinih vrsta izoflavona u zavisnosti od lokaliteta i sezone. Tako da odstupanja mogu da budu u opsegu od 56% do 71% za genistein, od 16% do 38% za daidzein i od 4% do 13% za glicitein (Wang i Murphy, 1994). Od tri izoflavona prisutna u soji, u najvećoj količini je zastupljen genistein (40-55% ukupnog sadržaja izoflavona), dok daidzeina (30-40%) i gliciteina (4-14%) ima u manjim količinama (Wang i Murphy, 1994).

Na varijabilnost u sadržaju, aktivnosti i raspoloživosti bioaktivnih jedinjenja u hrani za životinje značajno utiče i prerada sirovine. Postupci prerade obuhvataju različite mehaničke (ljušćenje, sečenje, drobljenje, presovanje, prosejavanje, filtracija, mešanje) i termičke procese (kuvanje, pečenje, pasterizacija, pritisak pare) (Irina i Mohamed, 2012; Nicoli i sar., 1999). U preradi soje usavršeni su različiti tehnološki postupci primarno u cilju denaturacije termolabilnih antinutritivnih faktora, ali i dobijanja mikrobiološki bezbedne hrane za životinje (kontaminacija sojine sačme salmonelama predstavlja rastući globalni problem) (Nahashon i Kilonzo-Nthenge, 2011). U neke od tih postupaka ubrajaju se kuvanje (autoklaviranje), tretmani sa talasnom emisijom (mikrotalasni tretman, mikronizacija), tretmani sa zagrejanim vazduhom (flekičenje, ekspanzija i “jet sploading“), prženje (uobičajeni rotirajući bubnjevi, prženje u fluidizovanom sloju) i najsofisticiraniji metod

vlažna i suva ekstruzija (Jajić i sar., 2006). Ove metode i varijacije tokom procesa prerade mogu da utiču na sveukupni kvalitet proizvoda od soje, odnosno preterana obrada utiče na smanjenje nutritivne vrednosti proizvoda od soje kroz kvalitet osnovnih hranjivih sastojaka, proteina i ulja. Tako da varijacije u temperaturi, dužini tretmana, vlažnosti i kvalitetu soje utiču na nutritivni sastav sojine sačme i sojinog koncentrata (Nahashon i Kilonzo-Nthenge, 2011; Jajić i sar., 2006; Papadopoulos, 1989). Dodatno, izdvajanje i uklanjanje estrogena i rastvorljivih ugljenih hidrata (oligosaharida) iz vodenno-alkoholnih rastvora ekstrahovanih sojinih ljuspica pri proizvodnji koncentrata sojinog proteina čini da ovaj proizvod ima niži sadržaj oligosaharida i izoflavona u poređenju sa sojinom sačmom (Peisker, 2001). S druge strane, Douglas i Parsons (2000) su pokazali da primena procesa ekspaniranja pre ekstrakcije rastvaračima ne menja značajno hranljivu vrednost sojine sačme. Sojina pogača je proizvod koji se dobija hidrotermičkim tretmanom sojinog zrna sa fazom presovanja i mlevenja, bez upotrebe hemijskih reagenasa, tako da je i u ovom proizvodu zadržana visoka hranljiva i biološka vrednost sastojaka soje. Takođe, Cook (1998) smatra da proces prerade soje pri proizvodnji sojine sačme ne uklanja izoflavone, pa u krajnjem proizvodu je njihova koncentracija slična koncentraciji u sirovoj soji. Kod životinja, kao što su svinje i brojleri, u čijoj ishrani i do 40% može biti zastupljena sojina sačma, količine ovih jedinjenja unetih hranom mogu biti značajne i potencijalno mogu ostvariti efekat na rast i druge biološke parametre (Cook, 1998).

Niži sadržaj genisteina u bazalnoj hrani ovog ogleada se može objasniti prethodno navedenim varijacijama u sirovini i preradi korišćenih sojinih hraniva. Međutim odstupanja u sadržaju genisteina u hrani oglednih grupa brojlera se mogu pripisati gubicima prilikom mešanja i peletiranja koje je podrazumevalo primenu kondicioniranja pritiskom pare. Teško je upoređivati rezultate različitih eksperimenata zato što su razlike postojale kako u sirovinskom i hemijskom sastavu, tako i u formi (obliku) smeša za ishranu živine, a matriks hrane može da bude barijera delovanju visokih temperatura, ili s druge strane da podstiče proces termičke degradacije sastojaka (Irina i Mohamed, 2012). Kondicioniranjem parom finišer za ishranu brojlera kontrolne i oglednih grupa u ovom eksperimentu bio je izložen pritisku pare od 442 kPa, pri čemu temperatura smeše dostiže 80 °C, što je i preporučen postupak za visoko proteinske smeše koja sadrže od 25 do 45% proteina (Sredanović i Lević, 2000).

Termički procesi mogu dosta da utiču na raspoloživost flavonoida u hrani u zavisnosti od temperature i trajanja. Naime, pokazano je da većina termičkih procesa dovode do degradacije fenolnih jedinjenja (Irina i Mohamed, 2012). U zavisnosti od hemijske strukture flavonoidi u vodenim rastvorima su različito osetljivi pri izlaganju visokim temperaturama. Međutim bez obzira na hemijsku strukturu, temperatura iznad 100 °C dovodi do degradacije flavonoidnih jedinjenja

(Buchner i sar., 2006; Friedman, 1997). Temperatura zagrevanja na 50 °C tokom 90 sekundi smanjuje sadržaj ukupnih flavonoida za oko 22% (Viña i Chaves, 2008). Zagrevanje vodenom parom pod pritiskom od 0,2 MPa tokom 40 minuta smanjuje sadržaj flavonoida za 25% (Zhang i sar., 2010). Glikozidi su pokazali veću stabilnost u poređenju sa aglikonskim formama flavonoida, što se pripisuje nemogućnošću stvaranja karbanjona zbog glikozilacije 3-hidroksil grupe na C-prstenu (Buchner i sar., 2006; Friedman, 1997). Pored hemijske strukture i temperature i drugi parametri mogu uticati na razgradnju izoflavona, kao što su npr. pH, interakcija sa različitim fitojedinjenjima i prisustvo ili odsustvo kiseonika pri preradi hrane (Irina i Mohamed, 2012; Buchner i sar., 2006).

### **6.3. Antioksidativni kapacitet hrane**

Široko je prihvaćeno stanovište da ishrana ima centralnu ulogu u održavanju zdravlja, produktivnosti i reproduktivnih performansi živine (Surai, 2007). Masti i ulja koja su dosta zastupljena u smešama za ishranu živine predstavljaju pogodan medijum za nastanak užeglosti. Naime, hraniva u smešama mogu da reaguju sa kiseonikom i da stvaraju slobodne radikale. Užeglost smanjuje nutritivnu vrednost hrane i na taj način dovodi do velikih ekonomskih gubitaka negativno utičući na proizvodne rezultate i zdravlje brojlera (Engberg i sar., 1996). Awad i sar. (1983) su pokazali da unos hrane koja sadrži od 0,2 do 6% užegle masti povećava mortalitet, smanjuje konzumaciju i telesnu masu, a dovodi i do pojave dijareje kod živine. Pored uticaja na kvalitet i održivost hrane za životinje, antioksidansi su jedni od dijetnih faktora koji imaju naročiti značaj za rast, reprodukciju i imunokompetenciju u živinarskoj proizvodnji. Ovaj koncept se zasniva na učešću antioksidanasa u smanjenju štetnih efekata slobodnih radikala i toksičnih metabolita u organizmu životinja (Surai, 2007).

Za nutricioniste u oblasti formulisanja obroka za životinje veliki je izazov da razumeju kada je antioksidativnom sistemu organizma životinja potrebna "pomoć" i u kojoj meri je ta pomoć opravdana većom cenom hrane, zbog toga što su antioksidansi obično skupe komponente u hrani za životinje. Neki od stresogenih faktora u uzgoju brojlera koji dovode do stvaranja slobodnih radikala i koji slabe antioksidativni kapacitet su: transport iz inkubatorske stanice do farme, suboptimalne temperature u objektima, neadekvatna ventilacija (visok nivo amonijaka i CO<sub>2</sub>), pojava bolesti, vakcinacija, mikotoksini, teški metali, dioksini, pesticidi, fungicidi i herbicidi u hrani, peroksidacija masti u hrani, kokcidiostatici u hrani i suficit vitamina A u hrani za brojlere (Surai, 2007).

Prooksidantni/antioksidantni balans u organizmu može biti izmenjen u slučajevima neoptimalne i nedovoljne ishrane, dok pojedini suplementi u hrani za životinje mogu pozitivno uticati na ovaj parametar. Optimiziranjem unosa antioksidanasa putem hrane može se smanjiti oksidativno



oštećenje i poboljšati antioksidativni kapacitet organizma životinje. U neke od sintetskih antioksidanasa u hrani za životinje ubrajaju se Santoquin (etoksikvin-1,2-dihidro-6-etoksi-2,2,4-trimetil-kinolin), Diludin, Termox i EDTA (Waheed i sar., 2004). Pored njih, najčešće u hrani za brojlere, koriste se vitamin E, karotenoidi, flavonoidi, natrijum butirat i askorbinska kiselina. Poslednjih godina su naročito popularni različiti biljni ekstrakti bogati etarskim uljima i aktivnim supstancama koje pored antibakterijskih, imaju i antioksidativna svojstva. Dodatno, u organizmu životinja postoje enzimi čija sinteza direktno zavisi od minerala koji se unose hranom, odnosno minerali su kofaktori ovih enzima. Tako je npr., selen esencijalan za sintezu enzima glutation peroksidaze i tioredoksin reduktaze, cink, bakar i mangan su sastavni deo superoksid dismutaze, dok gvožđe je kofaktor enzima katalaze (Surai, 2014; Surai, 2007).

Slično drugim fenolnim jedinjenjima poreklom iz biljaka, izoflavoni imaju antioksidativna svojstva koja ostvaruju doniranjem vodonika /elektrona hidroksilnih grupa slobodnim radikalima (Mitchell i sar., 1998). Niz metoda, koje obuhvataju različite hemijske i biološke modele, razvijeno je kako bi se izmerila efikasnost antioksidanasa koji se unose hranom, bilo da se radi o čistoj supstanci ili o ekstraktima hrane, kao i da se utvrdi antioksidativna aktivnost plazme kao pokazatelja antioksidativnog statusa *in vivo* (Pulido i sar., 2000; Mitchell i sar., 1998). Ove metode se baziraju na različitim mehanizmima sistema antioksidativne odbrane: uklanjanje kiseoničnih i hidroksilnih radikala, redukcija lipid peroksil radikala, inhibicija lipidne peroksidacije ili heliranje metalnih jona (Pulido i sar., 2000). Antioksidativna aktivnost, predstavljena stehiometrijski, može se značajno razlikovati između testova u zavisnosti od različitih faktora koji određuju redukcionu potencijal hidroksilnih grupa u odnosu na slobodne radikale ili prelazne jone metala koji se koriste u određenom sistemu (Mitchell i sar., 1998). Imajući to u vidu može se zaključiti da na antioksidativni kapacitet uzoraka utiču sledeći faktori: priprema uzorka različitim rastvaračima (etanol, metanol, acetat, DMSO, fosfatni pufer, etanol i  $K_2HPO_4$  - vodeni dvofazni sistem -ATPS, destilovana voda, hidrolizacija) i odabir metode (DPHH test, FRAP test, ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) ili TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) test, NBT (nitro blue tetrazolium) test, ORAC (oxygen radical absorbance capacity) test, DMPD (*N,N*-dimetil-p-fenilendiamin) test (Peurača, 2017; Hanganu i sar., 2016; Zhang i sar., 2013; Rimbach i sar., 2003; Pulido i sar., 2000; Fogliano i sar., 1999). Pored navedenih testova, razvijene su i druge metode za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata: metoda sa fosfomolibdenom, ksantin oksidaza test, Folin-Ciocalteu metoda, inhibicija lipidne peroksidacije kojom se kvantifikuju proizvodi kao što su konjugovani dieni, lipidni peroksidi ili hidroperoksidi, i proizvodi koji nastaju razlaganjem lipidnih peroksida kao što je malondiadehid izražen preko TBARS vrednosti (Boskovic i sar., 2019; Kalaskar i Surana, 2014; Pulido i sar., 2000). Često korišćena nestandardna metoda za

određivanje antiradikalske aktivnosti izoflavona je elektron spin rezonantna (ESR) spektroskopija kojom se detektuju hidroksilni (Fentonova reakcija) i superoksidni anjonski radikali (ksantin oksidaza sistem) (Rimbach i sar., 2003).

Antioksidativna aktivnost genisteina je dobro izučena (Polkowski i Mazurek, 2000). Još 1979. godine Pratt i Birac su pokazali u sistemu linoleinske kiseline i  $\beta$ -karotena da genistein ostvaruje antioksidativne efekte. *In vitro* antioksidativna aktivnost genisteina pokazana je i u mikrozomalnom sistemu korišćenjem  $\text{Fe}^{2+}/\text{ADP}/\text{NADPH}$  i inhibicijom stvaranja superoksida u neutrofilima (Kusunoki i sar., 1992; Jha i sar., 1985). Arteaga i sar. (2004) su određivanjem stepena oksidacije LDL-a (low density lipoproteins) utvrdili da pad koncentracije malonaldehida za 50% genistein postiže u koncentraciji 4,7 puta manjoj u odnosu na prekursor biohanin A i 28,6 puta manjoj u odnosu na daidzein, što je s druge strane izuzetno slab antioksidativni efekat u odnosu na kvercetin i estradiol.

U ovoj doktorskoj disertaciji su uzorci kontrolne hrane i hrane suplementirane sa 200, 400, 600 i 800 mg/kg genisteina pripremljene u metanolnom rastvaraču ispitivane FRAP testom i testom lipidne peroksidacije. FRAP testom nije uočena razlika između antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka, dok je u testu lipidne peroksidacije pokazano da je hrana sa dodatim genisteinom u količini od 200 mg/kg imala najmanji antioksidativni efekat, koji se značajno razlikovao od ostalih uzoraka hrane (Tabela 5.3.).

FRAP test se bazira na merenju sposobnosti supstance da redukuje  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$  i inicijalno je bio namenjen utvrđivanju ukupnog antioksidativnog kapaciteta plazme, a kasnije je od strane istih autora primenjen i na druge supstrate (Benzie i Strain, 1999; 1996). Antioksidativna aktivnost jedinjenja u FRAP testu uglavnom zavisi od transfera elektrona sa jedinjenja na  $\text{Fe}^{3+}$ , i određena je redoks potencijalom supstance koja se ispituje. Kako se antioksidativna aktivnost neke supstance obično direktno dovodi u vezu sa njenim redukcionim kapacitetom, a većina metoda se zasniva na utvrđivanju veze struktura-aktivnost jedinjenja (structure-activity relationships - SAR) i meri kapacitet prema oksidansima, FRAP test predstavlja pouzdan metod za proučavanje antioksidativne aktivnosti različitih jedinjenja uključujući i flavonoide (Benzie i Strain, 1996). Ova metoda je dosta korišćena za brzo određivanje antioksidativnog kapaciteta hrane, pića i različitih biljnih ekstrakata koji sadrže flavonoide (Luximon-Ramma i sar., 2002).

Ranilla i sar. (2009) su ispitivanjem osam različitih biljaka iz roda lupine (*Lupinus*), koje pripadaju porodici mahunarki, utvrdili da su delovi semenjače sa najnižim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja imali manji antioksidativni kapacitet u odnosu na kotiledone i hipokotiledone, međutim značajna korelacija između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta nije

uočena. Ovi autori su antioksidativni kapacitet dovodili u vezu više sa ukupnim sadržajem izoflavona genisteina i njegovih derivata koji su činili većinu fenolnih jedinjenja u ispitivanim biljkama. Naime, utvrđena je značajna pozitivna korelacija između sadržaja ukupnih izoflavona u sva tri dela semena biljaka (semenjača, kotiledoni i hipokotiledoni) i antioksidativnog kapaciteta određenog metodom inhibicije DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala. Za razliku od navedenog, u ovoj doktorskoj disertaciji se nije mogla uočiti veza između količine genisteina i antioksidativne aktivnosti ispitivanih uzoraka hrane. Oomah i sar. (2006) takođe nisu utvrdili zavisnost između antioksidativne aktivnosti ekstrakata semena osam različitih genotipova lupina (*Lupinus angustifolius* L.) i ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja. Međutim, Hanganu i sar. (2016) su utvrdili da je etanolni ekstrakt *Genista tinctoria*, koji je imao veći sadržaj, kako ukupnih polifenolnih jedinjenja, tako i flavonoida, pokazao značajno bolji antioksidativni efekat DPPH, ABTS i ORAC testovima u odnosu na *G. sagittalis*.

Ispitivanjem ekstrakata nadzemnih delova biljaka dve endemske vrste u Turskoj iz roda *Genista* (leguminoze), *G. vuralii* i *G. sandrasica*, Orhan i sar. (2011) su pokazali da pored razlike u sadržaju ukupnih flavonoida (203,82 mg/g i 158,06 mg/g) i ukupnog genisteina (0,363% i 0,582%) ekstrakti ovih biljaka su imali sličnu aktivnost u DPPH i FRAP testu, s tim da su se hidrolizovani ekstrakti pokazali bolji u odnosu na metanolne. U ovoj studiji je pokazano da korišćenjem DPPH i FRAP testa nije uočena, ili je uočena slaba antioksidativna aktivnost genisteina i daidzeina u ispitivanim ekstraktima. Njihovi rezultati su u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije u kojoj su uzorci hrane sa različitim sadržajem genisteina pokazali sličnu aktivnost u FRAP testu. Varijacije u rezultatima različitih testova su utvrdili i Mitchell i sar. (1998), gde ispitivani fitoestrogeni, uključujući i genistein, su pokazali veći antioksidativni kapacitet u TEAC testu u poređenju sa ESR i FRAP metodom.

U poređenju sa drugim podklasama flavonoidnih jedinjenja, izoflavoni daidzein i genistein pokazuju manju antioksidativnu aktivnost FRAP testom najverovatnije zbog manjeg broja OH grupa u molekulu (Firuzi i sar., 2005). Pulido i sar. (2000) smatraju da stepen hidroksilacije i konjugacije fenolnih jedinjenja su glavni kriterijum koji određuje redukcionni kapacitet izoflavona u hrani detektovan FRAP testom. U saglasnosti sa ovim studijama i Mitchell i sar. (1998) su utvrdili manju antioksidativnu aktivnost izoflavona u odnosu na ostale fitoestrogene, s tim da je od svih ispitivanih izoflavona (formononetin, biohanin A, daidzein i genistein) genistein u FRAP testu imao najveći antioksidativni kapacitet.

U studiji Mitchell i sar. (1998) pokazano je i da su izoflavoni relativno slabi inhibitori lipidne peroksidacije u mikrozomima jetre u poređenju sa drugim fitoestrogenima. Naime, IC<sub>50</sub> vrednost za

izoflavone bila je 35, a za halkone i kumestane 22 i 16 puta viša od  $\alpha$ -tokoferola, pojedinačno. U ovoj doktorskoj disertaciji metanolni ekstrakti hrane sa dodatkom 200 i 800 mg/kg genisteina su se pokazali čak kao lošiji inhibitori lipidne peroksidacije u odnosu na uzorke hrane kontrolne grupe. U prethodnim studijama utvrđeno je da je genistein bio efikasan u sprečavanju lipidne peroksidacije u lipozomima indukovane UV svetlošću ili peroksil radikalima, dok nije imao uticaj na sprečavanje stvaranja konjugovanih diena u micelama linoleinske kiseline (Record i sar., 1995). Na osnovu ovih dobijenih rezultata Record i sar. (1995) su zaključili da je genistein antioksidans koji ne prekida lanac kao  $\alpha$ -tokoferol, već uklanja lipidne i druge peroksidne rezidue. S druge strane, metoda obezbojavanja kateholom pokazala je da genistein ne helira gvožđe (Record i sar., 1995). Nemogućnost genisteina da helira gvožđe objašnjava se njegovom fenolnom strukturom koja se razlikuje od katehola, iako postoje i studije u kojima je pokazano da keto grupa na poziciji C4 i hidroksilna grupa na poziciji C5 u molekulu ima mogućnost helacije u određenom stepenu (Pratt, 1993).

Metaboliti *O*-demetilangolensin (*O*-DMA) i 1,2,5-trihidroksibenzen (1,3,5-THB) ABTS testom su pokazali dva puta veći antioksidativni kapacitet u odnosu na prekursore daidzein i genistein, dok za genistein je isto potvrđeno i FRAP testom. Naime, utvrđeno je da metabolizam izoflavona od strane enzima u organizmu životinja i ljudi, kao i od strane mikrobiote digestivnog trakta, može da poveća antioksidativna svojstva ovih jedinjenja (Rimbach i sar., 2003). Takođe je bitno napomenuti da antioksidativni efekat izoflavona nije isključivo posredovan njihovom sposobnošću da neutrališu slobodne radikale, već i drugim mehanizmima (povećanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite), tako da odsustvo antioksidativne aktivnosti uzoraka hrane u *in vitro* testovima ne isključuje eventualni pozitivni efekat genisteina u organizmu životinja (Wei i sar., 1995).

#### 6.4. Proizvodni rezultati

Uticaj različitih izoflavona, uključujući i genistein, na telesnu masu, prirast, konzumaciju i konverziju hrane kod živine je dosta varijabilan. Proizvodni rezultati brojlera kontrolne i oglednih grupa ove doktorske disertacije prikazani su u potpoglavlju 5. u tabelama od 5.4 do 5.7. Može se uočiti da je dodavanje visokih količina genisteina u finišer u trajanju od 21 dan pozitivno uticalo na proizvodne performanse, dok je 600 mg/kg genisteina tokom 37 dana dovelo do značajno manjeg prirasta i veće konverzije. Za oba eksperimentalna perioda nije uočen uticaj genisteina na konzumaciju hrane brojlera. U saglasnosti sa rezultatima ove doktorske disertacije Parvin i Rahman (2015a) takođe nisu uočili promene u konzumaciji kod brojlera koji su u hrani dobijali od 20 do 320 mg/kg genisteina, međutim 80 mg/kg genisteina je značajno poboljšalo prirast i konverziju nakon 28 dana tova. U drugoj studiji istih autora (Parvin i Rahman, 2015b) takođe je uočen pozitivan

uticaj na prirast i konverziju hrane, s tim da je bolji efekat zabeležen u slučaju kada je nivo proteina u hrani bio niži, odnosno zaključeno je da sa suplementacijom genisteina nivo proteina u hrani može biti niži za 1%. Praćenje efekta niske, srednje i visoke količine genisteina u hrani tokom dve faze tova, starter (1.-21. dan) i grover (22.-42. dan), izvršili su Rasouli i Jahanian (2019). Pokazano je da tokom prve faze suplementacija genisteina u količini od 20 do 80 mg/kg značajno je povećala konzumaciju i prosečni dnevni prirast brojlera, sa posledično značajno boljom konverzijom. Nakon druge faze značajno veća konzumacija hrane uočena je samo sa 80 mg/kg genisteina, značajno viši prirast sa 40 i 80 mg/kg genisteina, dok nije uočen efekat na konverziju hrane u svim grupama koje su dobijale genistein. S druge strane, kod grupa brojlera koje su dobijale visoke količine genisteina (160-320 mg/kg) nisu uočeni efekti na ove parametre tokom obe faze tova, izuzev poboljšanja konverzije sa 320 mg/kg genisteina nakon startera. U skladu sa ovom doktorskom disertacijom, nedoslednost u rezultatima proizvodnih performansi utvrdili su i Jiang i sar. (2007b) tokom produženog tova (43. - 63. dana). Naime, u njihovoj studiji 10 i 20 mg/kg čiste supstance gliciteina značajno je poboljšalo telesnu masu, prirast i konzumaciju, a 10 mg/kg je pozitivno uticalo i na konverziju hrane. S druge strane, količina od 40 mg/kg gliciteina nije ostvarila efekat na sve posmatrane proizvodne parametre u poređenju sa kontrolnom grupom, dok duplo viša koncentracija 80 mg/kg je povećala telesnu masu i prirast brojlera, što je u saglasnosti sa rezultatima ove doktorske disertacije. U studiji Lv i sar. (2018a) kod brojlera kojima je u hranu dodato 40 mg/kg genisteina, a koji su dobijeni od nosilja koje su tokom osam nedelja hranjene genisteinom u količini od 400 mg/kg, nakon 21. dana tova prirast i konverzija hrane bile su značajno poboljšane, konzumacija se nije razlikovala od kontrolne grupe brojlera, dok s produženom suplementacijom uočen je uticaj genisteina samo na konverziju hrane. Rasouli i Jahanian (2015) su pokazali da značajno veću konzumaciju su imale grupe brojlera koje su u hranu dobijale od 20 do 80 mg/kg genisteina u odnosu na kontrolnu grupu i grupu brojlera sa višim količinama genisteina u hrani (160 i 320 mg/kg). Grupe koje su dobijale nizak i srednji nivo genisteina (20-80 mg/kg) su pokazale tendenciju ka povećanju dnevnog prirasta, dok količine od 40 i 80 mg/kg genisteina su značajno poboljšale konverziju hrane brojlera. Ovaj povoljni efekat niskih i srednjih doza genisteina su pripisali njegovim antimikrobnim i antioksidativnim svojstvima.

Uticaj visokih doza čiste supstance genisteina u hrani dosta je izučavan kod japanskih prepelica. Svarljivost hrane, sirovih proteina, suve materije i pepela, pratili su Sahin i sar. (2006) kod japanskih prepelica držanih u termoneutralnim uslovima i uslovima toplotnog stresa. Suplementacija genisteinom od 200 do 800 mg/kg nije imala efekta na svarljivost hrane u termoneutralnim uslovima, dok kod izlaganja stresu značajno je poboljšana svarljivost sirovih proteina, suve materije i pepela, sa najboljim efektom postignutim u količini od 400 mg/kg. Onderci

i sar. (2004) su takođe pokazali da genistein u hrani u količini od 400 i 800 mg/kg pozitivno utiče na telesnu masu, prirast, konzumaciju i konverziju japanskih prepelica od 10. do 42. dana starosti.

Za razliku od rezultata ove doktorske disertacije, postoje studije u kojima nije uočen uticaj genisteina na parametre proizvodnih rezultata živine. Dodavanje genisteina u hranu tokom šest nedelja tova u količini od 0 do 10 mg/kg nije uticalo na konzumaciju, prirast i konverziju brojlera (Iqbal i sar., 2014). Kamboh i Zhu (2014) takođe nisu uočili uticaj 5 mg genisteina/kg hrane na prirast, konzumaciju i konverziju brojlera, kako od 1. do 21., tako i od 22. do 42. dana tova. U studiji Kamboh i Zhu (2013a) 5 mg/kg genisteina u hrani nije imao efekat na telesnu masu, konzumaciju i konverziju hrane brojlera na kraju tova (42. dan), dok genistein u kombinaciji sa hesperidinom (1:4) u količini od 10 i 20 mg/kg je ostvario pozitivni efekat na konverziju. Kod nosilja sa sindromom masne jetre, suplementacija genisteinom tokom 64 dana u niskoj (40 mg/kg) i visokoj dozi (400 mg/kg) nije uticala na konzumaciju hrane i konverziju izraženu kao odnos hrana/jaja (Lv i sar., 2018b). Genistein u vodi u količini od 100 ml/l nije uticao na telesnu masu prepelica nakon 30. i 60. dana eksperimenta (Kasim i sar., 2014).

Pored studija posvećenih praćenju suplementacije čiste supstance genisteina, postoji dosta eksperimenata koji su se bavili uticajem kombinacije genisteina sa drugim izoflavonima na proizvodne rezultate kod živine. Payne i sar. (2001a) su bili jedni od pionira u istraživanju izoflavona kao potencijalnih aditiva u hrani za brojlere. Pratili su uticaj koncentrovanog preparata izoflavona Prevasteina u hrani na bazi kukuruza i sojine sačme i na bazi kukuruza i koncentrata sojinog proteina tokom tri faze tova brojlera. U prvom eksperimentu u kojem su grupe dobijale visoke doze izoflavona (dva i pet puta više u odnosu na kontrolnu grupu) nije uočena razlika u završnoj telesnoj masi, prirastu i konzumaciji. Međutim, u druga dva eksperimenta gde su ogledne grupe dobijale hranu koja je i pored dodatka Prevasteina imala niži nivo ukupnih izoflavona od hrane koja je sadržala samo sojinu sačmu, zabeležene su lošije vrednosti proizvodnih rezultata u odnosu na kontrolne grupe. Sa porastom količine preparata izoflavona (koji sadrži 400 mg genisteina, 1700 mg daidzeina i 1000 mg gliciteina na 100 g) u hrani (0, 25, 50 i 100 mg/kg), od 1. do 14., i od 1. do 21. dana tova uočena je bolja konverzija i veći prirast brojlera, bez promena u konzumaciji, a najbolji efekat je postignut sa najvišom količinom preparata u hrani (Shiralinezhad i Shakouri, 2017). Qian i Sun (2009) su pokazali da određena količina  $\beta$ -glukozidaze u hrani za brojlere (enzima koji hidrolizuje glikozide izoflavona soje u aglikone forme koje imaju veću bioraspoloživost), može poboljšati proizvodne performanse i zdravlje brojlera. Oni su potvrdili da efekat na proizvodne performanse zavisi od količine enzima, odnosno samo u količini od 0,2% uočena je bolja iskoristivost hrane, dok to nije bio slučaj sa višim dozama (0,4 i 0,6%). Rezultati studije Gjorgovska i sar. (2016) pokazuju da su izoflavoni efektivni suplementi u hrani za nosilje,

čak i u izuzetno visokim količinama (1800 mg/kg), naročito tokom kasne faze nosivosti (20 nedelja stare nosilje). U drugoj studiji Gjorgovska i sar. (2014) su takođe pokazali pozitivni efekat suplementacije genisteina u količinama od 300 do 1800 mg/kg na telesnu masu nosilja od 6. do 20. nedelje starosti, ali bez uticaja na prirast.

Efekti izoflavona dovode se u vezu sa uslovima gajenja (podno ili kavezno držanje) i sistemom proizvodnje. Utvrđeno je da pozitivni uticaj izoflavona na proizvodne performanse je bolje izražen u slučajevima loše higijene objekta, izloženosti toplotnim ili drugim stresorima sredine, kao i kod životinja sa virusnim i bakterijskim infekcijama (Shiralinezhad i Shakouri, 2017; Sahin i sar., 2006; Onderci i sar., 2004). Ovo potvrđuju i najnovije studije posvećene ispitivanju imunomodulatorskih svojstava genisteina u digestivnom traktu brojlera. Kod brojlera kod kojih je intestinalno oboljenje izazvano bakterijom *Escherichia coli* i endotoksinom lipopolisaharidom (LPS) ove bakterije, genistein u hrani u količini od 20 i 40 mg/kg umanjio je štetni efekat zapaljenskog procesa, a samim tim i smanjio negativne efekte na rast, poboljšanjem intestinalne morfologije, mukozalne imunske funkcije i smanjenjem permeabilnosti i razvoja apoptotičkih procesa u crevima (Lv i sar., 2020; Zhang i sar., 2020). Dodatno, Rasouli i Jahanian (2019) su pokazali da genistein može da smanji broj patogenih bakterija u ileumu. Kako je poznato da izoflavoni mogu da imaju i povoljne i štetne efekte (Greiner i sar., 2001), od velikog je značaja da unos aglikona preko hrane bude dobro izbalansiran. Pored odgovarajuće doze u hrani, Qian i Sun (2009) smatraju da varijabilnost efekata izoflavona na rast životinja može biti posledica više faktora, kao što su vrsta životinje, pol i starost. Rasouli i Jahanian (2015) dodaju da nedoslednost u rezultatima studija vezanih za efekte izoflavona se mogu pripisati i razlikama u hemijskoj strukturi flavonoidnih jedinjenja (vrsta i forma izoflavona), da li se radi o čistim supstancama ili preparatima sa kombinacijom izoflavona, interakciji aktivnih supstanci, dužini perioda primene izoflavona u hrani, endogene koncentracije hormona i specifičnom odgovoru, odnosno individualnom metabolizmu životinje.

## 6.5. Biohemijske analize krvi

Uticaj leguminoza bogatih izoflavonima koje se unose hranom na lipide u krvi je dosta nedosledan (Nestel i sar., 1999). Deficit u estrogenu može dovesti do promena u lipidnom i lipoproteinskom profilu s posledičnim porastom koncentracije holesterola u krvnom serumu (Setchell i Cassidy, 1999). U nekim studijama je pokazano da izoflavoni, ponašajući se kao agonisti estrogenih receptora, utiču na snižavanje koncentracije holesterola (Ali i sar., 2004; Anthony, 2000). U studiji sprovedenoj na 66 žena u postmenopauzi je utvrđeno da su sojini izoflavoni u dozi od 56 i 90 mg dnevno tokom šest meseci značajno smanjili LDL i VLDL holesterol u krvi, a povećali HDL holesterol (Potter i sar., 1998). Slični efekti sojinih izoflavona na LDL i HDL odnos pronađeni su i

kod majmuna (Anthony i sar., 1998). Međutim postoje i studije u kojima ovaj efekat nije uočen (Dewell i sar., 2002; Nestel i sar., 1999).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da visoke doze genisteina u hrani nakon 21 i 37 dana nisu uticale na koncentraciju ukupnog holesterola u serumu brojlera (Grafik 5.2.). Međutim koncentracija triglicerida je bila značajno niža u svim oglednim grupama nakon prve faze finišera, dok nakon prolongirane suplementacije uočen je porast koncentracije triglicerida u grupama koje su dobijale 600 i 800 mg/kg genisteina u hrani (Grafik 5.3.).

U saglasnosti sa ovim rezultatima, u studiji Rasouli i Jahanian (2019) nakon 42. dana tova u serumu brojlera koji su dobijali hranu suplementiranu genisteinom u količini od 10 do 320 mg/kg nije uočena razlika u koncentraciji ukupnog holesterola u odnosu na kontrolnu grupu, kao ni u koncentraciji HDL frakcije, dok su visoke količine genisteina u hrani (160 i 320 mg/kg) značajno smanjile LDL frakciju u serumu. Međutim za razliku od seruma, u jetri brojlera oglednih grupa koje su dobijale od 20 do 320 mg/kg genisteina u hrani koncentracija ukupnog holesterola po jedinici suve materije bila je značajno niža (Rasouli i Jahanian, 2019). Dodatno, genistein u hrani u količini od 80 do 320 mg/kg značajno je smanjio koncentraciju triglicerida u serumu u odnosu na kontrolnu grupu brojlera (Rasouli i Jahanian, 2019), što je takođe u skladu s rezultatima ove doktorske disertacije. Onderci i sar. (2004) takođe nisu uočili efekat visokih doza genisteina na koncentraciju holesterola i triglicerida u krvnom serumu japanskih prepelica držanih u termoneutralnim uslovima. Pozitivni efekat na ove parametre bio je izražen u slučaju izlaganja prepelica toplotnom stresu. U studiji Kamboh i Zhu (2013c) 5 mg/kg genisteina nije imao uticaj na serumske lipidne parametre brojlera nakon 42 dana tova, efekat je uočen samo u kombinaciji genisteina sa najvišom količinom hesperidina (5 mg/kg genisteina i 20 mg/kg hesperidina). Qian i Sun (2009) su uočili da  $\beta$ -glukozidaza u količini od 0,2% nije uticala na koncentraciju ukupnog holesterola, kao i na HDL, VLDL i LDL frakcije holesterola, i triglicerida u serumu brojlera nakon 6 nedelja tova. Međutim  $\beta$ -glukozidaza značajno je povećala HDL i smanjila LDL frakciju holesterola u odnosu na kontrolnu grupu brojlera. Ovakav efekat objašnjava se nalazom preko dva puta veće aktivnosti malat dehidrogenaze, bitnog enzima u metabolizmu lipida i amino kiselina, kod grupa koje su dobijale 0,2%  $\beta$ -glukozidaze.

Za razliku od ovih rezultata Iqbal i sar. (2014) su pokazali da nakon 21. dana tova 2,5 mg/kg genisteina u hrani značajno je snizio koncentraciju holesterola u plazmi brojlera, dok nakon produžene suplementacije u svim oglednim grupama, koje su dobijale od 2,5 do 10 mg/kg genisteina, koncentracija holesterola je bila značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu brojlera.



Dodatak klijale i fermentisane soje u hrani brojlera u količini od 0,3 do 1% takođe je značajno smanjio koncentraciju ukupnog holesterola (Lee i sar., 2010).

Kod nosilja sa lipidnim sindromom jetre od 82. do 90. nedelje starosti genistein u hrani u dozi od 40 i 400 mg/kg značajno je smanjio koncentraciju ukupnog holesterola i triglicerida u krvnom serumu, kao i sadržaj triglicerida u jetri. Pokazano je da unos genisteina *per os* na nivou transkripcije reguliše PPA (Peroxisome Proliferator-Activated) receptor  $\gamma$  i smanjuje sadržaj triglicerida u jetri (Lv i sar., 2018b). Genistein u čistoj supstanci (100 ml/l vode) i genistein u kombinaciji sa vitaminom E (150 ml/l i 10 ml/l, pojedinačno) smanjio je koncentraciju ukupnog holesterola nakon 30 dana eksperimenta, dok nakon 60 dana, genistein u kombinaciji sa vitaminom E značajno je povišio koncentraciju triglicerida u serumu japanskih prepelica (Kasim i sar., 2014). Pad koncentracije holesterola nakon prolongiranog davanja genisteina autori objašnjavaju usmeravanjem holesterola za sintezu estrogenih hormona kod nosilja (Stevenson, 2012; Ryökkynen, 2006). Izoflavoni utiču i na metabolizam holesterola u jajima. Tako je dokazano da u žumancetu jaja nosilja hranjenih hranom bogatom izoflavonima trećeg dana eksperimenta se javlja značajan pad u koncentraciji holesterola, međutim od šestog dana se vraća na početni nivo koji se održava do kraja eksperimenta (Saitoh i sar., 2001). Izoflavoni u hrani koka nosilja za priplodna jaja tokom 10 nedelja doveli su do pada koncentracije ukupnog holesterola u serumu, ali bez uticaja na koncentraciju triglicerida (Khalaji i sar., 2013). Kod japanskih prepelica sojini izoflavoni u količini od 200 i 800 mg/kg značajno su smanjili koncentraciju holesterola u mišićima i jetri (Yilmaz i sar., 2008).

Pokazano je da sojin protein utiče na koncentraciju lipoproteina u plazmi tako što smanjuje LDL holesterol za  $\approx 13\%$  i trigliceride za  $\approx 10\%$ , a povećava HDL holesterol za  $2\%$  (Anthony, 2000). Za razliku od sojinog proteina za koji je dobro poznato da ostvaruje povoljne efekte na kardiovaskularni sistem (Polkowski i Mazurek, 2000), uloga genisteina u ovim procesima se i dalje istražuje. Međutim biološki efekti utvrđeni u studijama u kojima je korišćen sojin protein mogu se pripisati genisteinu s obzirom da je on najzastupljenije jedinjenje u soji (Polkowski i Mazurek, 2000). Takahashi i sar. (2009) su utvrdili da genistein ima hipolipidemični efekat, odnosno da u dozi od 2 g/kg *per os* smanjuje koncentraciju triglicerida i holesterola u serumu pacova menjajući ekspresiju gena odgovornih za lipogenezu, što je zatim potvrđeno i izmenjenom aktivnošću enzima koji učestvuju u lipogenezi. U skladu s rezultatima koncentracije triglicerida ove disertacije, Pakalapati i sar. (2009) su utvrdili da ekstrakt crvene deteline bogat izoflavonima u dozi od 450 mg/kg telesne mase dnevno tokom 4 dana kod ovariektomisanih ženki pacova dovodi do porasta koncentracije triglicerida u krvnoj plazmi. Isti nalaz je utvrđen i kod žena koje su dobijale tamoxifen (Ntukidem i sar., 2008).

Pad koncentracije holesterola u serumu, jetri i mišićima životinja hranjenih flavonoidima može se objasniti inhibitornim efektom ovih jedinjenja na alosterni enzim HMG-CoA reduktazu (3-hidroksi-3metil-glutaril-koenzim A) koji je ključni u biosintezi holesterola u ćelijama jetre (Rasouli i Jahanian, 2019; Kamboh i Zhu, 2013b; Lien i sar., 2008). Pokazano je da bioflavonoidi mogu da smanje sintezu holesterola inhibirajući aktivnost acil koenzim A-holestarol-O-aciltransferaze u HepG2 ćelijama, čime se smanjuje sinteza apo-B lipoproteina, kao što su VLDL, i na taj način se smanjuje i koncentracija LDL holesterola u serumu (Borradaile i sar., 1999). Cavallini i sar. (2009) navode da smanjena koncentracija holesterola je posledica smanjene apsorpcije holesterola i žučnih kiselina iz lumena intestinalnog trakta. S druge strane, odsustvo ovakvog efekta u ovoj doktorskoj disertaciji podržava ranije nalaze gde izoflavoni, kao selektivni estrogen receptor modulatori različito utiču na plazma lipidni profil, što se objašnjava time da izoflavoni mogu da moduliraju apsorpciju i metabolizam holesterola regulišući enzime kao što su HMG-CoA sintaza, farnezil-difosfat farneziltransferaza 1, lanosterol sintaza i citohrom P450 ili preko lipidnih oksidativnih mehanizama (Pakalapati i sar., 2009). Da li će se ostvariti hipoholesterolemični efekat zavisi i od vrste, doze i kombinacije izoflavona, ali i od inicijalne koncentracije holesterola u krvi (Anderson i sar., 1995). Takođe postoje i varijacije između vrsta u hipolipidemičnom efektu imajući u vidu da izoflavoni fiziološkim stimulusom utiču na ćeliju (što je uslovljeno vrstom životinje) i stvaraju izoflavon-osetljive supstance koje intereaguju sa izoflavonima i menjaju krajnji ishod procesa aktivacije (Middleton i sar., 2000).

## 6.6. Masa unutrašnjih organa

U eksperimentu ove doktorske direktacije uočeno je da najviša količina genisteina (800 mg/kg) u hrani je značajno povećala apsolutnu i relativnu masu slezine i srca brojlera za oba eksperimentalna perioda, dok je sa porlongiranom suplementacijom masa jajnika ove grupe brojlera bila niža u odnosu na kontrolnu i grupe koje su dobijale 200, 400 i 600 mg/kg genisteina. Genistein u količini od 200 do 800 mg/kg nije uticao na masu jetre nakon konvencionalnog i produženog tova (Tabela 5.8. i 5.9.).

Za razliku od ovih rezultata, u studiji Rasouli i Jahanian (2019) suplementacija genisteina u hrani tokom 42 dana tova smanjila je relativnu masu jetre brojlera, s tim da je značajna razlika uočena samo dodavanjem 160 mg/kg genisteina. Smanjenu relativnu masu jetre uočili su i Lv i sar. (2018b) dodavanjem 40 i 400 mg/kg genisteina u hrani nosiljama tokom kasne faze nosivosti. Ali i sar. (2004) su utvrdili da izoflavoni u hrani smanjuju masu jetre, bubrega i slezine, dok ne dovode do promene u masi srca i nadbubrežnih žlezda, naglašavajući da efekat izoflavona, pored toga što zavisi od specifičnosti tkiva, zavisi i od vrste i pola životinje. Kod nosilja hranjenih

visokoenergetskom hranom sojini izoflavoni su takođe smanjili relativnu masu jetre (Khalaji i sar., 2013). Izoflavoni smanjuju lipogenezu i metabolizam lipida u jetri, što može da bude jedan od uzroka smanjene mase jetre kod brojlera koji su dobijali genistein u hrani (Rasouli i Jahanian, 2019). U saglasnosti s rezultatima ove doktorske disertacije, odsustvo efekta genisteina na masu jetre utvrdili su Takahashi i sar. (2009). U njihovoj studiji genistein u dozi od 1 i 2 g/kg telesne mase nije uticao na relativnu masu jetre pacova. Isti nalaz su imali i Qian i sar. (2012) kod brojlera koji su u hrani dobijali 0,6 U/g  $\beta$ -glukozidaze. Izoflavoni u količini od 25 do 100 mg/kg nisu uticali na masu jetre, slezine i burze Fabrici brojlera nakon 21 dana eksperimenta (Shiralinezhad i Shakouri, 2017). Razlike u relativnoj masi jetre i slezine nisu uočene ni kod brojlera hranjenih klizalom i fermentisanom sojom u količini od 0,3 do 1% (Lee i sar., 2010). Suprotno ovim studijama, u eksperimentu koji je obuhvatao nosilje stare pet godina, nosilje stare dve godine i brojlere muškog pola, razlike u masi jetre su uočene samo kod brojlera, gde su grupe koje su dobijale niske doze genisteina imale značajno veću apsolutnu i relativnu masu jetre (Stevenson, 2012). Veličina i masa jetre može biti promenjena zbog sveukupne promene veličine, promena u akumulaciji masti i drugih komponenata ili zbog promena u sadržaju vode. Pokazano je da kod većine životinjskih vrsta estrogeni povećavaju sadržaj lipida u jetri, međutim genistein, ponašajući se i kao agonista i kao antagonista estrogenih receptora, u zavisnosti od doze, target tkiva, vrste, starosti i pola životinje ostvaruje pleotropne efekte (Stevenson, 2012).

Timus i burza Fabrici su centralni organi imunskog sistema kod živine odgovorni za diferencijaciju limfocita i imunski odgovor. Periferni imunski organi, u koje spadaju limfni čvorovi i slezina, učestvuju u antigenom specifičnom imunskom odgovoru (Lv i sar., 2018a). Promene u masi i veličini ovih organa mogu uticati na proliferaciju limfocita i posledično imunski odgovor (Whittow, 2000). Povećanu masu timusa i burze Fabrici kod brojlera utvrdili su Rasouli i Jahanian (2015) dodavanjem genisteina, a Gao i sar. (2000) dodavanjem daidzeina u hrani. Dodatno, uočena je povećana transformacija T limfocita kod brojlera koji su u hrani dobijali daidzein (Gao i sar., 2000). Dodavanje genisteina i hesperidina u bazalnu hranu značajno je povećalo relativnu masu burze i slezine kod brojlera nakon 21 dana, dok produžena suplementacija (42 dana) je dovela do povećanja u relativnoj masi timusa i slezine (Kamboh i sar., 2016). Greiner i sar. (2001) su pokazali da sa porastom količine genisteina u hrani masa timusa ostaje nepromenjena, dok masa slezine linearno raste kod svinja inficiranih virusom PRRS (porcine reproductive and respiratory syndrome), što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije. Porast u masi slezine je indikator proliferacije B ćelija, što je i potvrđeno većom koncentracijom  $\alpha_1$ -acilglikoproteina kod svinja koje su dobijale genistein u hrani (Greiner i sar., 2001). Suprotno prethodno navedenom, Lv i sar. (2018a) nisu uočili uticaj genisteina u hrani roditelja i brojlera na relativnu masu timusa, burze i slezine nakon

21. dana tova, dok 40 i 400 mg/kg genisteina u hrani nosilja značajno je smanjio masu slezine (Lv i sar., 2018b).

Bioflavonoidi imaju potencijal da u živim sistemima ostvare imunomodulatorski efekat (Kamboh i sar., 2016). Alipour i sar. (2012) smatraju da suplementacija genisteina u hrani, naročito u količini od 20 i 40 mg/kg, može pozitivno da utiče na imunski odgovor brojlera. S druge strane, genistein zbog niske toksičnosti i mehanizma delovanja preko enzima tirozin kinaze, ima veliki potencijal kao imunosupresivna supstanca (Polkowski i Mazurek, 2000). Pokazano je da genistein u hrani smanjuje masu timusa u količini od 1000 mg/kg i većoj, dok u količini od 500 mg/kg i nižoj ne ostvaruje efekat na masu timusa (Ganai i Farooqi, 2015). Tačan mehanizam imunomodulatorskog dejstva nije dovoljno razjašnjen, međutim, generalno se smatra da antioksidativna svojstva izoflavona smanjuju štetni uticaj slobodnih radikala na imunski sistem, što dovodi do boljeg funkcionisanja imunskog sistema (Kamboh i sar., 2015).

Goliomytis i sar. (2014) su utvrdili da rastuće koncentracije flavonoida kvercetina (0,5 i 1 g/kg) u hrani brojlera tokom 42 dana tova utiču na porast relativne mase srca, sa značajnom razlikom između kontrolne i grupe koja je dobijala veću količinu flavonoida u hrani (1 g/kg), dok apsolutna masa je takođe pokazala tendenciju ka rastu, ali bez uočene značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da rastuće koncentracije genisteina takođe dovode do porasta apsolutne i relativne mase srca (Tabela 5.8. i 5.9.). Međutim postoje studije u kojima nije uočen efekat genisteina na masu srca brojlera (Rasouli i Jahanian, 2019; Lv i sar., 2018a). Genetska selekcija brojlera ka većem telesnom prirastu dovela je do pada relativne mase srca brojlera, što je uticalo na nemogućnost srca da adekvatno snabdeva tkiva kiseonikom i posledično razvoja metaboličkih poremećaja (Havenstein i sar., 1994). S povećanom masom srca ostvaruje se povoljni efekat na kardiovaskularni sistem brojlera i prevenira mogući nastanak metaboličkih poremećaja kao što su sindrom iznenadne smrti i ascit (Havenstein i sar., 2003). Inkorporisanje genisteina u hrani za brojlere može da bude dobra alternativa, koja ne zahteva veliki utrošak vremena i novca poput genetske selekcije, u prevazilaženju ovakvog problema. Međutim potrebna su dalja istraživanja da bi se utvrdio tačan mehanizam i obim u kojem genistein ima potencijal da poveća masu srca i samim tim smanji pojavu metaboličkih poremećaja kod brojlera.

U eksperimentu Stevenson (2007) značajno veću apsolutnu i relativnu masu jajovoda imali su brojleri koji su dobijali dietilstilbestrol *per os* u odnosu na kontrolnu i grupe koje su dobijale genistein tokom 14 dana. Dodatno, genistein je pokazao dozno zavisni efekat na masu jajovoda, s tim da nije uočena značajnost razlika u odnosu na kontrolnu grupu. Na modelu jajovoda brojlera utvrđeno je da genistein indukuje ekspresiju estrogenih i progesteronskih receptora, povećava

celularnu proliferaciju, i utičući na progesteron indukuje sintezu ovabumina. Ovakav efekat nije uočen u ovoj doktorskoj disertaciji s obzirom da najveća količina genisteina u poslednjoj fazi tova, nakon 37 dana, značajno je smanjila masu jajnika brojlera. Khalaji i sar. (2013) su pokazali da sojini izoflavoni kod nosilja hranjenih visokoenergetskom hranom nisu uticali na apsolutnu masu jajnika i jajovoda. Promene na reproduktivnom traktu u ovoj studiji uočene su u vidu povećanog broja belih folikula i smanjenog broja postovulatornih folikula. Izlaganje ovariektomisanih pacova visokim dozama ekstrakta crvene deteline značajno je smanjilo relativnu masu uterusa (Pakalapati i sar., 2009). Rezultati studije Stevenson (2007) pokazuju da genistein u dozi od 10 i 40 mg ima slab estrogenski efekat kod brojlera tokom prve dve nedelje starosti. Stevenson (2007) ovo objašnjava mogućnošću da manja količina genisteina se apsorbovala u telo zbog razlaganja i konverzije od strane mikrobiote digestivnog trakta, kao i delimičnom antagonističkom estrogenom aktivnošću genisteina (kompetitivno vezivanje za receptore i plazma-vezujuće proteine). Stevenson (2007) smatra da postoji mogućnost da su estrogenski efekti bolje izraženi u slučaju dužeg davanja genisteina u fazi starosti kada reproduktivni sistem brojlera može bolje da odreaguje na estrogenski stimulus.

### 6.7. Sadržaj ukupnih proteina i aktivnost enzima antioksidativne zaštite u jetri

Živi organizmi su razvili različite mehanizme antioksidativne zaštite kako bi se odbranili od štetnih efekata reaktivnih kiseoničnih vrsta, koji se kod živine naročito proizvode u stanjima stresa i mogu, između ostalog, da dovedu do imunosupresije i sindroma pulmonalne hipertenzije (Lv i sar., 2018a, Kamboh i sar., 2015). Pokazano je da su sojini izoflavoni prirodni antioksidansi koji efektivno uklanjaju slobodne radikale i utiču na *in vivo* antioksidativni sistem povećanjem aktivnosti enzima SOD, GSH-Px, CAT, glutation reduktaza (GR) i dr. (Chen, 2001). Izoflavoni imaju sposobnost da heliraju metalne jone, kao što su Fe i Cu, čime smanjuju formiranje produkata lipidne oksidacije (MDA). Takođe, OH grupe u fenolnom prstenu na C4 i C7 poziciji ponašaju se kao donori vodonikovog jona peroksidnim radikalima koji su proizvod oksidacije i na taj način inhibiraju stvaranje vodonik peroksida, smanjuju stvaranje 8-hidroksi-2-deoksiguanozina u ćelijama i oštećenje DNK molekula (Fellenberg i Speisky, 2006; Giles i Wei, 1997). Antioksidativni efekat izoflavoni mogu da ostvaruju i regulisanjem NO sintaze i ksantin oksidaza aktivnosti, smanjenom imobilizacijom leukocita, kao i smanjenjem fluidnosti ćelijske membrane (Kamboh i sar., 2019; Jiang i sar., 2007a).

U ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da genistein u hrani brojlera nije imao uticaj na sadržaj ukupnih proteina jetre, izuzev količine od 200 mg/kg kod koje je značajno smanjen sadržaj proteina jetre nakon prolongirane suplementacije (Tabela 5.10.). Stevenson (2012) je uočio niži sadržaj ukupnih proteina plazme kod brojlera koji su dobijali 10 i 40 mg genisteina tokom 15 dana u

odnosu na negativnu kontrolnu grupu, što je u saglasnosti sa ovim rezultatima. U ovoj doktorskoj disertaciji efekat genisteina u hrani na enzime antioksidativne zaštite jetre utvrđen je nakon produženog tova, i najbolji rezultati su postignuti u O-I grupi brojlera, gde 200 mg/kg genisteina je značajno povećao aktivnost SOD, CAT i GSH-Px u jetri (Tabela 5.10.).

U skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije, u mnogim prethodnim istraživanjima je potvrđeno da genistein povećava antioksidativni kapacitet organizma životinja. Genistein u hrani u količini od 50 i 250 mg/kg tokom 30 dana značajno je povećao aktivnost enzima antioksidativne zaštite (CAT, SOD, GSH-Px, GR, glutation-S-transferaza) u različitim organima SENCAR miševa, sa najviše izraženim efektom u koži i tankom crevu (Cai i Wei, 1996). Genistein u hrani, povećavajući aktivnost SOD i GSH-Px, smanjio je štetne efekte i oksidativni stres izazvan ovariektomijom kod pacova (Choi i Song, 2009). U studiji Qian i Sun (2009)  $\beta$ -glukozidaza, enzim koji konvertuje glikozide u aglikonske forme izoflavona, u hrani u količini od 0,2% značajno je povećala aktivnost enzima SOD, GSH-Px i GR u jetri i serumu brojlera, a istovremeno značajno je smanjila koncentraciju MDA, koji je krajnji produkt lipidne peroksidacije, u serumu brojlera. Utvrđeno je da izoflavon glicitein u hrani tokom završne faze tova (od 42. do 63. dana) pozitivno utiče na antioksidativni status brojlera muškog pola (Jiang i sar., 2007b). U ovoj studiji 40 i 80 mg/kg gliciteina povećao je ukupni antioksidativni kapacitet plazme i aktivnost SOD u mišiću grudi, u plazmi efekat na SOD, GSH-Px i CAT nije uočen, dok je 40 mg/kg značajno povećalo aktivnost CAT u mišiću grudi brojlera. Za razliku od njih, Jiang i sar. (2007c) su pokazali da je 20 mg/kg sojinih izoflavona značajno povećalo aktivnost samo CAT, dok efekat na SOD, GSH-Px i ukupni antioksidativni kapacitet nije uočen u plazmi brojlera hranjenih užeglim ribljim uljem. U eksperimentu Onderaci i sar. (2004) genistein, u dozama koje su korišćene i u ovoj doktorskoj disertaciji, uočili su značajan pad koncentracije MDA u serumu i jetri japanskih prepelica, kako onih koje su držane u termoneutralnim uslovima, tako i onih koje su bile izložene toplotnom stresu. Iz njihovih rezultata se može zaključiti da genistein ima plato antioksidativnog efekta u dozi od 400 mg/kg, s obzirom da 400 i 800 mg/kg genisteina je ostvario gotovo identični pad koncentracije MDA u serumu i jetri prepelica. Slično je utvrđeno i u ovoj doktorskoj disertaciji gde su količine genisteina od 400, 600 i 800 mg/kg ostvarile lošiji efekat na parametre antioksidativnog kapaciteta organizma u odnosu na količinu od 200 mg/kg genisteina.

Lv i sar. (2018b) su utvrdili da genistein, povećanjem antioksidativnog kapaciteta kod nosilja sa sindromom masne jetre, smanjuje inflamatorni proces. U njihovoj studiji genistein u količini od 40 i 400 mg/kg uticao je na povećanje aktivnosti SOD za 10,58% i 37,35%, pojedinačno, značajno smanjio koncentraciju MDA u jetri nosilja, dok na aktivnost CAT i GSH-Px nije imao efekat. MDA može da intereaguje sa NF- $\kappa$ B, pa samim tim i poveća oslobađanje TNF u jetri, a dodatno je

pokazano da genistein smanjuje ekspresiju TNF-a i NF- $\kappa$ B, pa su Lv i sar. (2018b) preko ovih nalaza utvrdili da genistein indirektno i direktno može ostvariti antiinflamatorni efekat u jetri. U drugoj studiji Lv i sar. (2018a) genistein u hrani brojlera značajno je povećao aktivnost SOD, GSH-Px i ukupni antioksidativni kapacitet jetre, smanjio koncentraciju MDA u jetri, a nije imao uticaj na aktivnost enzima CAT. Dodatno, podaci transkriptoma su pokazali da tretman genisteinom je povećao ekspresiju iRNK za SOD3 i MT4 (metalotioneini 4- klasa proteina stresa) u jetri brojlera. Rezultati njihove studije impliciraju da povećanje antioksidativnog kapaciteta brojlera dodavanjem genisteina u hrani povoljno utiče na proizvodne performanse i imunsku funkciju organizma.

U *ex vivo* studiji Jiang i sar. (2007a) u kulturi skeletnih mišićnih ćelija aktivnost CAT je bila značajno povišena sa najvišim koncentracijama sojinih izoflavona (75 i 100  $\mu$ M), dok je povećanje aktivnosti SOD i GSH-Px utvrđeno sa nižom koncentracijom sojinih izoflavona (25  $\mu$ M). Kasnije je izvedena i *in vivo* studija u kojoj je potvrđeno da sojini izoflavoni povećavaju aktivnost i ekspresiju gena enzima antioksidativne zaštite i u muskulaturi brojlera (Jiang i sar., 2014). Suplementacija 40 i 80 mg/kg sojinog izoflavona tokom produžene faze tova (43.-63. dan) značajno je povećala količinu iRNK enzima GSH-Px, dok 20, 40 i 80 mg/kg sojinog izoflavona značajno je povećala iRNK enzima CAT u mišiću grudi brojlera (Jiang i sar., 2014). U istoj studiji aktivnost SOD je bila povišena u mišićima grudi u grupama koje su dobijale 20 i 40 mg/kg sojinog izoflavona, i rasla je 48 i 72 h nakon klanja.

Suplementacija kombinacije genisteina i hesperidina značajno je povećala ukupni antioksidativni kapacitet plazme 21. dana eksperimenta, dok je samo najviša količina genisteina i hesperidina (20 mg/kg) značajno povećala aktivnost SOD u plazmi brojlera (Kamboh i sar., 2016). Suplementacija kombinacije čiste supstance genisteina i hesperidina u količini od 5 do 20 mg/kg značajno je poboljšala ukupni antioksidativni kapacitet plazme brojlera nakon 42 dana tova, dok je 5 mg/kg genisteina imalo suprotni efekat na ovaj parametar koji predstavlja kumulativnu meru redoks statusa organizma (Kamboh i Zhu, 2013b). Na pad koncentracije MDA u plazmi takođe je značajan efekat uočen samo u kombinaciji genisteina i hesperidina, dok značajno povećanje aktivnosti SOD postignuto je samo u najvišoj količini ova dva flavonoida. Parametre antioksidativne zaštite Kamboh i sar. (2018) su pratili i u mišiću grudi i u jetri brojlera. U čistoj supstanci genistein je samo povećao aktivnost SOD i smanjio koncentraciju MDA u mišićima grudi brojlera, dok je na ostale posmatrane parametre u jetri i mišiću pozitivni efekat ostvario samo u kombinaciji sa hesperidinom. S obzirom da rezultati studija Kamboh i sar. (2018), Kamboh i sar. (2016) i Kamboh i Zhu (2013c) impliciraju da genistein i hesperidin značajan efekat na parametre antioksidativne zaštite ostvaruju većinom u kombinaciji, može se zaključiti da bioflavonoidi pokazuju tendenciju ka

sinergističkom delovanju. Međutim, Alvarez i sar. (2008) su utvrdili da flavonoidi u kombinaciji, pored sinergističkog, mogu da ostvaruju i aditivne i antagonističke efekte.

S druge strane, u studiji Liao i sar. (2018) flavonoidi u hrani u količini od 60 do 240 mg/kg nisu uticali na aktivnost SOD i GSH-Px, kao ni na koncentraciju MDA u serumu brojlera nakon 21. i 42. dana eksperimenta. Sojini izoflavoni nisu imali efekat na aktivnost SOD i GSH-Px, kao i na koncentraciju MDA u plazmi zdravih prasadi i prasadi kojima je injekciono dat lipopolisaharid (Zhu i sar., 2015). Varijacije u rezultatima prethodno navedenih studija mogu se pripisati razlikama u eksperimentalnom dizajnu: dužini tretmana, dozi i vrsti izoflavona, vrsti, starosti i polu životinja (Zhu i sar., 2015).

### **6.8. Histomorfometrijska ispitivanja**

Kod živine, tokom inkubacije jaja, intestinalna morfologija nije u potpunosti razvijena, pa podleže drastičnim promenama nakon izleganja. Porast površine crevnih resica javlja se kod piladi starih tri dana. Od nezrelih proliferativnih ćelija u bazi kripte diferenciraju se enterociti i migriraju duž površine resice do vrha same resice i na kraju deskvamišu u lumen creva (Hu i Guo, 2007). Sa porastom visine i širine resica raste i apsorptivna površina creva, bolja je izloženost enzima i transportnih sistema, pa je posledično veća iskoristivost nutrijenata i omogućen je bolji rast i razvoj piladi. S druge strane, kraće crevne resice i dublje kripte smanjuju apsorpciju i povećavaju sekreciju u digestivnom traktu, pa samim tim nepovoljno utiču na rast i proizvodne performanse brojlera. Veća dubina kripte pokazatelj je brzog obnavljanja ćelija i velikih potreba za novim tkivom. Naime, dublje kripte pokazuju da se više energije troši na održavanje homeostaze intestinalnog epitela, a da je manje energije dostupno za rast (Shiralinezhad i Shakouri, 2017; Kamboh i sar., 2015; Awad i sar., 2011).

Malo je studija koje su se bavile uticajem izoflavona na duodenalnu morfometriju. Kamboh i Zhu (2014) su suplementacijom genisteina i hesperidina nakon obe faze tova (starter i grover) u duodenumu uočili više resice i bolji odnos visina resice/dubina kripte, dok su značajno pliće kripte bile samo nakon 21. dana tova, a širina resica je bila promenjena nakon 42. dana tova. Za razliku od ovih autora, Qian i sar. (2012) nisu utvrdili efekat 0,6 U/g  $\beta$ -glukozidaze na visinu i širinu resica duodenuma brojlera starih šest nedelja. Dodavanje od 0,5 do 4% preparata fermentisanih biljaka bogatog izoflavonima u hrani tokom 42 dana nije uticalo na masu i dužinu duodenuma, jejunuma i ileuma brojlera. Takođe, sa porastom koncentracije preparata fermentisanih biljaka u hrani u duodenumu i jejunumu je uočen porast visine resica, površine resica, oblasti epitelnih ćelija, hipertrofije i mitoze ćelija (Lokaewmanee i sar., 2012). U ovoj doktorskoj disertaciji genistein je ostvario pozitivan efekat na visinu resice, dubinu kripte i odnos visina resice/dubina kripte kod



brojlera nakon 42. dana tova (Tabela 5.11.). Imajući u vidu da je duodenum glavno mesto varenja i apsorpcije hranljivih materija (Qian i sar., 2012), bolji proizvodni rezultati brojlera ove doktorske disertacije nakon komercijalne faze tova mogu se delimično pripisati hipertrofiji duodenalnih resica.

U studiji Shiralinezhad i Shakouri (2017) preparat izoflavona u hrani brojlera tokom 21 dana eksperimenta značajno je povećao visinu resica jejunuma i površinu crevnih resica, dok pliće kripte i bolji odnos visina resice/dubina kripte je postignut samo sa većom količinom preparata (50 i 100 mg/kg). Ovaj pozitivni efekat na morfometriju digestivnog trakta za posledicu je imao bolju svarljivost hrane i proizvodne performanse (prirast i konverzija hrane) brojlera. Značajno više crevne resice i odnos visina resice/dubina kripte, bez promene u dubini kripte uočen je kod brojlera koji su u hrani dobijali čistu supstancu genisteina u količinama od 10 do 80 mg/kg tokom 28 dana tova. Međutim više koncentracije genisteina u hrani (160 i 320 mg/kg) nisu imale efekat na ove morfometrijske parametre jejunuma (Rasouli i Jahanian, 2019). Kamboh i Zhu (2014) su pozitivni efekat genisteina u kombinaciji sa hesperidinom na visinu i širinu resica i odnos visina resica/dubina kripte u jejunumu uočili nakon 21. dana tova, dok nakon 42. dana samo značajno viša visina resica uočena je u grupi koja je dobijala najvišu koncentraciju genisteina i hesperidina (20 mg/kg). Za razliku od prethodnih studija, u ovoj doktorskoj disertaciji genistein u količini od 200 do 800 mg/kg nije uticao na morfometrijske parametre jejunuma nakon 21 dana tretmana, već samo nakon prolongiranog davanja u hrani brojlera (37 dana) (Tabela 5.11.).

U studiji Kamboh i Zhu (2014) nakon prve faze tova (21. dan) genistein u čistoj supstanci je povećao visinu resica, dok u kombinaciji sa hesperidinom je smanjo dubinu kripte i povećao odnos visina resica/dubina kripte u ileumu. Nakon produžene suplementacije genisteina i hesperidina (42. dan) nisu uočene promene na morfometrijske parametre ileuma. Umerene doze genisteina (20-80 mg/kg) u studiji Rasouli i Jahanian (2019) povećale su svarljivost u ileumu koja je objašnjena povećanim kapacitetom varenja i apsorpcije i manjim brojem bakterija u ileumu (Rasouli i Jahanian, 2019). U suprotnosti s prethodno navedenim, rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da genistein u hrani je imao negativni efekat na sve posmatrane histomorfometrijske parametre ileuma nakon komercijalnog i produženog tova brojlera (Tabela 5.11.).

Kako ostvaruje antiinflamatorne i imunomodulatorske efekte, poslednjih godina se ispituje uticaj genisteina na ublažavanje simptoma i održavanje integriteta epitela digestivnog trakta kod stanja izazvanih zapaljenskom reakcijom. Genistein u hrani brojlera (40 mg/kg) sa intestinalnim zapaljenjem izazvanim endotoksinom LPS smanjio je pojavu krvarenja i oštećenja crevnih resica ileuma, smanjio je apoptotički indeks ilealne mukoze, poboljšao mukozalnu imunsku funkciju i antioksidativni kapacitet ileuma (Lv i sar., 2020). Dodatno, rezultati analize transkriptoma uzoraka

ileuma ove studije pokazali su da je 7131 gen bio različito eksprimovan (3281 stimulisan i 3851 inhibiran) kod grupe koja je dobijala genistein u odnosu na grupu sa LPS. Na integritet intestinalnog epitela genistein utiče tako što inhibira fosforilaciju tight junction – proteina (TJP1) i povećava ekspresiju transmembranskih proteina E-kadherina i okcludina (Lv i sar., 2020; Zhu i sar., 2015).

Nije poznat tačan mehanizam kojim izoflavoni menjaju morfologiju intestinalnog trakta. Pretpostavlja se da zahvaljujući antioksidativnom efektu, izoflavoni smanjuju razvoj apoptičkih procesa nastalih oksidativnim stresom u ćelijama epitela creva (Zhu i sar., 2015; Kamboh i Zhu, 2014). Chen i sar. (2005) smatraju da genistein veći efekat ostvaruje na ćelije u proliferaciji nego na diferencijovane intestinalne ćelije, s obzirom da nije uočen efekat genisteina na aktivnost enzima (laktaza,  $\alpha$ -glukozidaza) i transport nutrijenata. Takođe, menjajući sastav mikrobiote digestivnog trakta izoflavoni mogu da učestvuju u regulaciji morfologije crevnih resica (Kamboh i sar., 2015; Bourne i Rice-Evans, 1999). Sa manjim brojem bakterija u digestivnom traktu, manja je destrukcija intestinalnih ćelija, pa je manja i potreba za njihovom zamenom novim ćelijama, a poznato je da nove ćelije formiraju kraće resice i manji odnos visina resice/dubina kripte (Emami i sar., 2012). Na osnovu dobijenih rezultata ove doktorske disertacije, može se zaključiti da bolje proizvodne performanse brojlera koji su dobijali genistein u hrani nisu u direktnoj vezi sa promenama u morfologiji digestivnog trakta, već su posledica delovanja drugih mehanizama kao što je povećanje antioksidativnog kapaciteta, bolja svarljivost hranljivih sastojaka i izmena sastava mikrobiote digestivnog trakta (Rasouli i Jahanian, 2019; Shiralinezhad i Shakouri, 2017; Rasouli i Jahanian, 2015; Qian i sar., 2012; Jiang i sar., 2007b; Onderci i sar., 2004).

### **6.9. Broj bakterija mlečne kiseline (*Lactobacillus* spp.) u cekumu brojlera**

Poslednjih godina veliki deo naučne javnosti se bavi pronalaženjem supstanci i formulisanjem proizvoda koji imaju prebiotički potencijal. Prebiotici su nesvarljiva jedinjenja koja povoljno utiču na organizam ljudi i životinja selektivno stimulišući rast i/ili aktivnost jedne ili većeg broja poželjnih bakterija u kolonu (Gibson i sar., 1995). Bioaktivna jedinjenja poreklom iz biljaka mogu da menjaju sastav mikrobiote digestivnog trakta, smanjuju proizvodnju metabolita i kompeticiju za kritične nutrijente od strane patogena, što za rezultat ima pozitivni efekat na prirast i iskoristivost hrane, pa se ova jedinjenja mogu smatrati prirodnim stimulatorima rasta (Klose i sar., 2010). Flavonoidi se ubrajaju u jedinjenja koja imaju potencijal kao prebiotici, s obzirom da podležu smo delimičnoj apsorpciji i metabolizmu u gornjim delovima digestivnog trakta (želudac, duodenum i jejunum), pa većina dospe do cekuma i kolona (Spencer i sar., 2001). Dodatno, deo konjugovanih flavonoida se preko žuči u obliku glukuronida može akumulirati u lumenu ileuma, cekuma i kolona (Laparra i Sanz, 2010).

U prethodnim studijama pokazano je da polifenolna jedinjenja, uključujući i flavonoide, menjaju sastav mikrobiote i fekalnih aromatičnih metabolita bakterija u digestivnom traktu (Liu i sar., 2014; Tzounis i sar., 2008; Lee i sar., 2006). U studiji Liu i sar. (2014) pokazano je da je broj ukupnih aeroba i koliforma opadao u cekumu nosilja, a broj *Bifidobacteria* rastao sa porastom količine kvercetina u hrani. U više studija je pokazano da izoflavoni, primarno daidzein i formononetin, mogu indirektno da utiču na aktivnost i metabolizam mikrobiote rumena povećavajući nivo testosterona u krvi i rumenu životinja (Zhengkang i sar., 2006). Zatim su usledile i *in vitro* studije u kojima je pokazano da daidzein i direktno utiče na sastav i aktivnost mikroorganizama rumena sa uočenim bifaznim efektom. Bifazni odgovor podrazumeva da daidzein nije ostvario efekat u visokim dozama, odnosno estrogenu efekat daidzeina je uočen sa niskim dozama, dok je u visokim dozama bio prisutan antiestrogeni efekat (Zhengkang i sar., 2006; Zhu i sar., 2002).

S promenom sastava mikrobiote, u zavisnosti od starosti i vrste živine, menja se i metabolizam flavonoida, njegova sposobnost da favorizuje rast određenih bakterija, kao i njegova antibakterijska i bakteriostatska aktivnost prema patogenim bakterijama (Plaper i sar., 2003). Favorizovanjem rasta *Bifidobacteria* stimuliše se proizvodnja organskih kiselina, kao što su acetatna i mlečna kiselina, koje onemogućavaju kolonizaciju patogenih bakterija na epitelu creva (Tzounis i sar., 2008). Određeni sojevi *Bifidobacteria* učestvuju u biotransformaciji glikozida flavonoida čime povećavaju njihovu bioraspodljivost. Izoflavoni podležu deglikozilaciji, demetilaciji, redukciji i fuziji prstena prilikom bakterijske biotransformacije koja menja njihovu biološku aktivnost (Clavel i sar., 2005). Ovakvi metaboliti izoflavona (aglikoni) bolje se apsorbuju u crevima, a enterohepatičnom cirkulacijom produžava se njihovo prisustvo u plazmi, tako da se duže zadržavaju u organizmu pre ekskrecije urinom u odnosu na njihovu glikozidnu formu (Laparra i Sanz, 2010). Ispitivanjem antibakterijske aktivnosti biljnih ekstrakata bogatih flavonoidima (kvercetin, apigenin, luteolin, naringenin, rutin, katehin, eriodiktiol) utvrđeno je da su Gram pozitivne bakterije osetljivije na delovanje biljnih ekstrakata u odnosu na Gram negativne, naročito bakterije iz familije *Enterobacteriaceae*. U datoj studiji *L. monocytogenes* bila je najosetljiviji mikroorganizam, dok rast *S. enteridis* nije bio inhibiran (Proestos i sar., 2006). U studiji Rasouli i Jahanian (2019) genistein u količini iznad 20 mg/kg u hrani brojlera tokom 28 dana značajno je smanjio broj *Salmonella* spp. u ileumu, dok su na rast *E. coli* inhibitorni efekat ostvarile više doze genisteina u hrani (160 i 320 mg/kg). Mehanizmi antibakteriskog delovanja flavonoida uključuju: inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina (inhibiranje aktivnosti bakterijske žiraze i cepanje molekula DNK), poremećaj u funkcionisanju ćeljske membrane bakterija i inhibiciju energetskog metabolizma bakterija (Proestos i sar., 2006; Cushnie i Lamb, 2005). Flavonoidi takođe mogu da menjaju sastav mucina na površini creva čime modifikuju bakterijsku adheziju i kolonizaciju (Ito i sar., 2008).

Bakterije *Lactobacillus* spp. najviše su zastupljene u digestivnom traktu živine, gde čine više od 99% ukupnih bakterija prisutnih u duodenumu i jejunumu, dok u cekumu je njihov broj i diverzitet najveći (Yeoman i sar., 2012). Broj bakterija mlečne kiseline cekuma prema rezultatima ove doktorske disertacije značajno je rastao sa porastom količine i dužine davanja genisteina u hrani brojlera, tako da je bio viši kod oglednih grupa za oko 0,73 log CFU/g u odnosu na kontrolnu grupu brojlera (Grafik 5.4.). U studiji Clavel i sar. (2005) pokazano je da sojini izoflavoni imaju prebiotički potencijal *in vivo*, s obzirom da i kvantitativno i kvalitativno menjaju sastav mikrobiote creva. Naime, utvrđeno je da je 100 mg dnevno aglikona izoflavona tokom mesec dana značajno povećalo broj bakterija iz grupe *Lactobacillus-Enterococcus*, *Faecalibacterium prausnitzii* i *Bifidobacterium* kod žena u postmenopauzi. Direktni uticaj izoflavona na mikroorganizme creva prasadi izučavali su Yao i sar. (2004) ukazujući na potencijalni prebiotički efekat izoflavona u hrani za životinje. Oni su u *in vitro* studiji utvrdili da je daidzein u intestinalnom sadržaju prasadi iz različitih delova digestivnog trakta značajno povećao broj *Lactobacillus* spp.

#### 6.10. Masa i hemijski sastav tibije brojlera

Kvalitet kostiju najčešće se koristi kao indikator adekvatne zastupljenosti minerala u ishrani živine, a glavni minerali neorganskog dela kostiju su Ca i P. Stepem mineralizacije utiče na mehanička svojstva kostiju, pa je smanjena mineralizacija udružena sa povećanim rizikom od nastanka fraktura. Slabe kosti se lome prilikom procesa klanja i prerade i smanjuju prinos mesa. Takođe, slabost nogu često dovodi do smanjene konzumacije hrane, pa samim tim i manjeg prirasta kod brojlera, kao i manjeg broja i lošijeg kvaliteta jaja kod nosilja (Onyango i sar., 2003). Dodatno, slabost kostiju nosilja koje se drže u kavezu je veliki problem u intenzivnom živinarstvu (Sahin i sar., 2007).

U literaturi postoji dosta podataka o *in vivo* i *in vitro* anaboličkim efektima sojinih izoflavona na metabolizam kostiju i osteoporozi kod ljudi i životinja (Barnes, 2003; Blair i sar., 1996). Sojini izoflavoni se dovode u direktnu vezu sa Ca, odnosno pokazano je da sa većim unosom izoflavona raste mineralni sadržaj kostiju i manje su izraženi markeri resorpcije kostiju (Messina i sar. 2004).

U studiji Sahin i sar. (2007) sojini izoflavoni u količini od 400 i 800 mg/kg značajno su povećali nosivost i kvalitet jaja (debljina i masa ljuske, Haugh jedinice) japanskih prepelica u kasnoj fazi nosivosti koje su bile izložene toplotnom stresu. U istoj studiji suplementacija izoflavona značajno je povećala mineralnu gustinu kostiju, koncentraciju osteokalcina, vitamina D, Ca i P, i povećala je i aktivnost alkalne fosfataze u serumu, kako kod prepelica držanih u termoneutralnim uslovima, tako i kod onih koje su bile izložene stresu. Dodatno, rezultati prethodne studije Sahin i sar. (2006)

su pokazali da dodavanje genisteina u hrani smanjuje sadržaj Ca, P, Mg, Mn, Zn, Fe i Cu u ekskretu, a povećava koncentraciju Ca, P i Mg u serumu japanskih prepelica. Naime, genistein štiteći od štetnih efekata toplotnog stresa, omogućava normalno funkcionisanje pankreasa i sekreciju digestivnih enzima čime se povećava retencija minerala u organizmu (Sahin i sar., 2006). Kod nosilja u kasnoj fazi nosivosti visoka količina preparata izoflavona u hrani (1800 mg/kg) pozitivno je uticala na masu i zapreminu tibije, koncentraciju pepela i sadržaj Ca, dok nije uočen efekat na sadržaj P tibije (Gjorgovska i sar., 2016).

U ovoj doktorskoj disertaciji niže količine genisteina u hrani (200 i 400 mg/kg) imale su pozitivni efekat na masu tibije, sadržaj pepela i kalcijuma nakon prvog eksperimentalnog perioda (42. dan), dok sa produženom suplementacijom (58. dan) uočen je pad u sadržaju pepela i Ca tibije brojlera (Tabela 5.12.). Značajno viša masa tibije grupe koja je u hrani dobijala 400 mg/kg genisteina može se objasniti većom telesnom masom brojlera ove grupe na kraju komercijalnog tova. Veći sadržaj pepela i Ca podržava ranija ispitivanja u kojima genistein smanjuje resorpciju kostiju vezujući se za jedarne receptore, sa većim afinitetom prema ER $\beta$ , koji su dosta zastupljeni u koštanom tkivu (Morabito i sar., 2002), a dodatno su u saglasnosti i sa prethodnim studijama u kojima su objašnjeni nehormonalni mehanizmi kojima genistein ostvaruje pozitivni efekat na količinu i sastav koštanog tkiva (Akdemir i Sahin, 2009; Fitzpatrick, 2008; Arjmandi i sar., 2002; Polkowski i Mazurek, 2000; Anderson i sar., 1999; Gao i Yamaguchi, 1998).

Pokazano je da sojini izoflavoni povećavaju proliferaciju i diferencijaciju osteoblastnih ćelija i sintezu kolagena, smanjuju intracelularnu koncentraciju Ca u osteoklastima i inhibiraju osteoklastnu resorpciju kostiju, što implicira da se time obezbeđuje veća količina Ca za formiranje kostiju i ljuske jaja (Akdemir i Sahin, 2009; Fitzpatrick, 2008; Gao i Yamaguchi, 1998). Osteoklastnu funkciju genistein može da suprimira i preko enzima tirozin kinaze (Polkowski i Mazurek, 2000). Arjmandi i sar. (2002) su utvrdili da sojini izoflavoni povećavaju apsorpciju Ca iz intestinalnog trakta, dok Anderson i sar. (1999) navode da genistein povećava aktivnost alkalne fosfataze u osteoblastima koja je indikator kalcifikacije kostiju.

Kod mladih brojlera, formiranje medularne kosti ukazuje na neadekvatnu izoženost estrogenu, odnosno rana reproduktivna zrelost može da utiče na prevremeno deponovanje Ca u kostima, prevashodno u femuru (Stevenson, 2012). Tako da promene u mineralnom sastavu kostiju mogu da ukažu na formiranje medulane kosti. U eksperimentu autora Stevenson (2007) genistein u dnevnoj dozi od 2, 20 i 40 mg aplikovan *per os* brojlerima tokom 14 dana nije uticao na apsolutnu i relativnu masu femura i masu pepela femura, dok značajno višu masu femura nakon sušenja imala je samo grupa koja je dobijala 20 mg genisteina. U drugom eksperimentu istog autora takođe nije uočen

uticaj estrogena i genisteina na količinu koštane srži femura brojlera u ranoj fazi razvoja (Stevenson, 2007). Odsustvo efekta genisteina može se pripisati niskoj dozi genisteina i nedovoljno dugom tretmanu da bi se mogli ispoljiti estrogenni efekti kod mladih brojlera. Pretpostavlja se da bi genistein bolji efekat ostvario kod starijih brojlera sa dužim periodom davanja. Genistein kada se aplikuje *per os* ima slab estrogenni efekat kod piladi najverovatnije zato što se brzo metaboliše u inertno jedinjenje (p-etilfenol) ili se brzo ekskretuje iz organizma (Stevenson, 2007). S druge strane, nakon injekciono aplikovanog genisteina uočena je dozno-zavisna tendencija ka rastu mase femura brojlera, ali bez značajne razlike između tretmana, dok je estrogen značajno smanjio količinu koštane srži i sadržaj pepala u femuru brojlera nakon 14 dana eksperimenta (Stevenson, 2007).

Dozno-zavisni efekat genisteina pokazan je i u studiji Stevenson (2012), gde je srednja doza imala lošiji efekat u odnosu na visoku i nisku dozu genisteina kod nosilja u kasnoj fazi nosivosti. Masa femura, masa femura nakon sušenja i masa pepela femura nosilja koje su dobijale visoku dozu genisteina (20 mg/kg) bile su značajno veće od kontrolne i grupe sa srednjom dozom (15 mg/kg), dok se nisu razlikovale od mase femura nosilja koje su dobijale nisku dozu genisteina (10 mg/kg) tokom osam nedelja. Razlika u relativnoj masi (% telesne mase) uočena je kod mase femura nakon sušenja i mase pepela femura između grupa koje su dobijale najvišu dozu genisteina u odnosu na kontrolnu i grupu koja je dobijala srednju dozu genisteina. Ista razlika je utvrđena i za relativnu masu femura nakon sušenja (% mase svežeg femura), masu pepela femura izraženu kao procenat mase svežeg femura i masu pepela femura izraženu kao procenat mase femura nakon sušenja, što implicira da dobijena razlika nije posledica različitog sadržaja vlage, već promena u sastavu kostiju (Stevenson, 2012). Najviša doza genisteina značajno je povećala i silu lomljenja femura u odnosu na femur grupe koja je dobijala srednju dozu genisteina, međutim suprotan efekat na silu lomljenja genistein je imao na kost pršljena (Stevenson, 2012). Medularna kost, koja se stvara na račun kortikalne kosti pod dejstvom estrogenih jedinjenja, smanjuje mehaničku snagu kostiju i povećava rizik od nastanka fraktura (Whitehead, 2004).

Iz prethodno navedenih rezultata može se zaključiti da efekat genisteina zavisi od doze, načina aplikacije, starosti živine i tipa kostiju (Stevenson, 2012; 2007). U zavisnosti od doze izoflavoni ostvaruju pleotropne efekte na mineralizaciju kostiju, tako da doze koje su previše niske ili doze koje su previše visoke samo delimično inhibiraju gubitak kostiju (Branca, 2003). Rezultati ove doktorske disertacije, u kojoj više doze genisteina, uključujući i niže doze tokom prolongiranog tova, nisu imale efekat na smanjenje gubitka koštanog tkiva u poređenju sa kontrolnom grupom, u saglasnosti su sa studijama u kojima je bifazni dozno-zavisni efekat genisteina uočen. Bifazni dozno-zavisni efekat genisteina, u kojem niže doze genisteina ostvaruju pozitivni, a više doze ne ostvaruju efekat na retenciju kostiju je pokazan u više studija (Branca, 2003; Anderson i sar., 1998).

Ovakav bifazni dozno-zavisni efekat najverovatnije je posledica istovremenog aktiviranja estrogenih receptora i PPA receptora, koji u istim ćelijama i tkivima mogu da pokrenu različite procese (Branca, 2003).

### 6.11. Klanični parametri brojlera nakon 42. i 58. dana tova

U ranijim istraživanjima je pokazano da dodavanjem različitih flavonoida, uključujući i izoflavone genistein, daidzein ili njegov metabolit ekvol, i glicitein, ostvaruje se efekat na rast životinja, prinos i kvalitet mesa. U eksperimentima Payne i sar. (2001a) veća količina izoflavona u hrani brojlera nije uticala na randman, ali je povećala udeo mase grudi (% telesne mase), dok kod nižih količina izoflavona nije uočen efekat na parametre trupa brojlera. Genistein u količini od 20 i 40 mg/kg značajno je povećao relativnu masu trupa brojlera bez kože (% telesne mase) nakon 42 dana tova, dok na udeo mase bataka s karabatakom u živoj masi brojlera nije uočen efekat suplementacije od 10 do 320 mg/kg genisteina (Rasouli i Jahanian, 2019). Genistein u količini od 5 mg/kg, kao i kombinacija genisteina i hesperidina (5 mg; 1:4) značajno su povećali masu toplog trupa, dok na prinos mesa (randman) nije uočen efekat dodavanja ova dva flavonoida u hrani brojlera tokom 42 dana tova (Kamboh i Zhu, 2013a). Ekstrakt lucerke u hrani brojlera u količini od 5 do 15 mg/kg tokom 42 dana tova nije uticao na randman i udeo mase bataka sa karabatakom izražen prema telesnoj masi na kraju tova brojlera, dok su više doze (10 i 15 mg/kg) značajno povećale udeo mase grudi i smanjile udeo mase abdominalne masti (Ouyang i sar., 2016). Randman brojlera koji su u hrani dobijali 10 i 20 mg/kg formononetina bio je veći nakon 42. dana eksperimenta, dok se udeo mase grudi i bataka sa karabatakom nije razlikovao od kontrolne grupe brojlera nakon dva eksperimentalna perioda (21. i 42. dan) (Iqbal i sar., 2013). Visoke doze genisteina u hrani japanskih prepelica držanih u termoneutralnim uslovima nisu uticale na masu trupa i na randman nakon 42 dana eksperimenta, međutim 400 i 800 mg/kg genisteina pozitivno je uticalo na ova dva klanična parametra kod prepelica koje su bile izložene toplotnom stresu (Onderci i sar., 2004). Ovi rezultati potvrđuju da genistein zahvaljujući svojoj antioksidativnoj aktivnosti pozitivno utiče na proizvodne performanse i karakteristike trupa kod živine izložene ambijentalnom stresu. Kod brojlera muškog i ženskog pola starih 49 dana, koji su dobijeni iz jaja u koje je injekciono sedmog dana embrionalnog razvoja dodat ekvol u niskoj (20 µg) i visokoj dozi (100 µg), nisu uočene razlike za parametre trupa kao što su masa bataka, masa masnog tkiva, relativna masa abdominalne masti, masa mišićnog tkiva bataka, masa i površina mišićnog tkiva grudi. Značajno veća masa abdominalne masti uočena je kod grupa brojlera muškog pola koje su dobile nisku i visoku dozu, a kod brojlera ženskog pola samo nisku dozu ekvola *in ovo*, dok masa *musculus gastrocnemius* je bila veća kod grupe brojlera muškog pola koja je dobila nisku dozu ekvola (Wei i sar., 2011). Suplementacija od 0,3-1% kljale i fermentisane soje u hrani brojlera nije uticala na relativnu masu

mesa grudi i mesa bataka izraženu kao procenat žive mase na kraju tova, dok za razliku od prethodno navedene studije, relativna masa abdominalne masti bila je značajno niža kod brojlera koji su dobijali 1% klijale fermentisane soje u odnosu na negativnu i pozitivnu kontrolnu grupu (Lee i sar., 2010).

U saglasnosti sa prethodnim studijama, u ovoj doktorskoj disertaciji je takođe uočen efekat dodavanja visokih doza genisteina na prinos mesa brojlera tokom završne faze tova (21.-58. dan). Masa trupa nakon klanja bila je značajno viša u svim oglednim grupama nakon prvog eksperimentalnog perioda (42. dan), dok nakon produženog tova masa trupa grupe koja je dobijala 600 mg/kg je bila najmanja. Ovi rezultati su podržani i boljom telesnom masom brojlera nakon suplementacije genisteinom tokom 21 dana, a najnižom telesnom masom brojlera O-III grupe na kraju produženog tova. S druge strane, prinos mesa (randman) bio je značajno bolji u svim oglednim grupama nakon produženog tova (58. dan eksperimenta) (Tabela 5.13.). Mase delova trupa (grudi, batak s karabatakom, leđa, krila, vrat) nisu bile promenjene dodavanjem genisteina u hrani brojlera za oba eksperimentalna perioda, sa izuzetkom mase grudi koja je bila viša u genisteinom suplementiranim grupama nakon 42. dana eksperimenta (Tabela 5.14.), što je u saglasnosti sa boljom telesnom masom i masom trupa ovih brojlera za prvi eksperimentalni period. Izračunavanjem udela mase grudi u masi trupa ova razlika se održala samo u grupi sa najvišom količinom genisteina (800 mg/kg) (Grafik 5.9.). Posledično i masa mesa grudi i grudne kosti bila je viša u oglednim grupama nakon 42. dana tova (Tabela 5.15). Bolji prinos mesa grudi, pored toga što se dovodi u vezu sa većom telesnom masom, može se objasniti i povećanom mesnatošću trupa, što je u saglasnosti s rezultatima Cook (1998), gde je dodavanjem izoflavona u hrani značajno povećana masa mišića trupa svinja, bez uticaja na masu masnog tkiva trupa. Pored veće mase grudne kosti, uočena je i veća masa kostiju bataka sa karabatakom u oglednim grupama 42. dana eksperimenta i udela mase kostiju u masi trupa O-IV grupe brojlera 58. dana eksperimenta (Tabela 5.16.). Osim bolje telesne mase brojlera, ovi rezultati su u skladu i sa većom apsolutnom masom tibije nakon prvog eksperimentalnog perioda kod grupa brojlera koje su dobijale genistein u hrani, a i sa najvećom masom tibije u grupi koja je dobijala 800 mg/kg genisteina nakon drugog eksperimentalnog perioda (Tabela 5.12.). Ovi nalazi dodatno idu u prilog tome da genistein ostvaruje efekat na koštano tkivo brojlera povećavajući masu i sadržaj kalcijuma koji je detaljno opisan u potpoglavlju 6.10. Masa kože i udeo mase kože bataka s karabatakom brojlera koje su dobijale najveće količine genisteina u hrani (600 i 800 mg/kg) bile su značajno manje u poređenju sa kontrolnom grupom, što se može objasniti estrogenim efektom genisteina i posledično smanjenim deponovanjem masti u tkivima brojlera (Rasouli i Jahanian, 2019), ali i hipolipidemijskim efektom genisteina opisanom u potpoglavlju 6.5.



Za razliku od prethodno navedenih studija, postoji i dosta istraživanja u kojima efekat izoflavona nije uočen na parametre prinosa mesa. Kod brojlera hranjenih užeglim ribljim uljem u kasnoj fazi tova (43.-63. dan), dodavanje 20 mg/kg sojinog izoflavona nije uticalo na relativnu masu (% telesne mase na kraju tova) mesa grudi, bataka i abdominalne masti (Jiang i sar., 2007c). Nije uočena razlika u masi trupa nakon klanja, kao ni u prinosu mesa, kod 42 dana starih brojlera koji su u hrani dobijali naringin ili hesperidin u količinama od 0,75 i 1,5 g/kg hrane u odnosu na kontrolnu i grupu suplementiranu vitaminom E (Goliomytis i sar., 2015). U studiji Simitzis i sar. (2011) hesperidin u količini od 1,5 i 3 g/kg hrane tokom 40 dana takođe nije ostvario efekat na apsolutnu masu trupa brojlera nakon hlađenja. Tokom 170 dana tova hrana na bazi sojine sačme bogata izoflavonima kod svinja nije uticala na masu trupa, debljinu leđne slanine, udeo mase mesa, kostiju, masnog tkiva i kože u masi trupa (Kuhn i sar., 2004). Prinos mesa i udeo mase grudi i mase bataka s karabatakom u telesnoj masi brojlera nije bio značajno promenjen dodavanjem 0,6 U/g  $\beta$ -glukozidaze u hrani brojlera tokom šest nedelja tova (Qian i sar., 2012). U studiji Peña i sar. (2008) dodavanje komercijalnog preparata koji sadrži askorbinsku kiselinu i flavonoide rutin i kvercetin u količini od 250 do 1000 mg/kg tokom 33 dana, nije uticalo na udeo mase trupa, leđa, grudi, bataka, karabataka, krila, abdominalne masti i mesa grudi brojlera ženskog pola. Nuhu (2010) dodavanjem proizvoda lista biljke *Moringa oleifera* u hrani zečeva u količini od 5 do 20% tokom 12 nedelja eksperimenta nije uočio razlike u masi toplog trupa i randmanu između oglednih i kontrolne grupe.

Zahvaljujući strukturnoj sličnosti sa endogenim estrogenom, izoflavoni se kao agonisti ili antagonisti vezuju za ER, a pored hormonalnih mehanizma dejstva, na prinos mesa efekat ostvaruju i povećavajući antioksidativni kapacitet životinja (Payne i sar., 2001a). Estrogenom aktivnošću smanjuju deponovanje masti u organizmu i povećavaju mesnatost trupova životinja (Rasouli i Jahanian, 2019; Cook, 1998), pa se iz tih razloga mogu koristiti kao aditivi u hrani za životinje. Takođe, smatra se da izoflavoni svoje efekte ostvaruju i preko različitih mehanizama koji moduliraju pankreatičnu sekreciju insulina (Bhathena i Velasquez, 2002). Podaci koji se odnose na prinos mesa dosta variraju u prethodno navedenim studijama, što se može pripisati korišćenju različitih flavonoida u eksperimentima, varijacijama u telesnoj masi, genetici ili uslovima gajenja životinja (Goliomytis i sar., 2015).

## 6.12. Vrednost pH i temperatura mesa grudi brojlera nakon 42. i 58. dana tova

Kvalitet živinskog mesa, naročito tokom procesa prerade, trenutno je od velike važnosti s obzirom da su u prodaji manje zastupljeni celi trupovi, već se više konzumiraju delovi trupa i proizvodi od živinskog mesa. Kvalitet mesa u tehnološkom procesu obrade podrazumeva dobar kapacitet vezivanja vode (sposobnost vezivanja vode tokom skladištenja), intenzitet i homogenost boje, konzistenciju, ukus, održivost i prinos mesa nakon obrade. Kvalitet mesa je u bliskoj vezi sa padom pH vrednosti u mišiću *post mortem*, pa varijacije u stepenu pada pH vrednosti utiču i na varijacije u kvalitetu mesa. Brzi pad pH vrednosti (<5,7), koji se kod živine detektuje 45 min nakon klanja, dovodi do pojave PSE mesa (pale, soft, exudative - bledo, meko, vodnjikavo) koje je bledo sa smanjenim kapacitetom zadržavanja vode. Niska pH vrednost izmerena 24 h nakon klanja živine rezultuje "kiselim mesom" koje ima slične nedostatke kao PSE meso, dok visoka pH vrednost mesa 24 h nakon klanja (>6,2) utiče na formiranje DFD (dark, firm, dry-tamno, čvrsto, suvo) mesa koje je tamne boje sa kraćom održivošću (Le Bihan-Duval i sar., 2008; Akşit i sar., 2006). U slučajevima kada je pH mesa suviše nizak, počinje denaturacija proteina miofibrila i sarkoplazme, što utiče na sposobnost vezivanja vode i povećanje L vrednosti boje površine mesa, odnosno meso postaje bledo na površini i neprihvatljivo od strane potrošača (Huff-Lonergan i Lonergan, 2005). U trenutku klanja živine, sadržaj glikogena u mišićima je viši od 53 nmol/kg, što je dovoljna količina kojom se obezbeđuje pad pH vrednosti obično u opseg od 5,7 do 5,9 posle rigor mortisa (4 h *post mortem*) nakon čega ostaje nepromenjen, i na taj način se dobija željeni kvalitet mesa (Barbut i sar., 2005). Blagi porast pH vrednosti se može očekivati posle dugog skladištenja zbog formiranja baznih jedinjenja (Souza, 2006). U mišiću *post mortem* glikogen, glukoza i glukozo-6-fosfat u procesu anaerobne glikolize prelaze u laktat, a akumulacija laktata i oslobađanje protona hidrolizom adenozin trifosfata dovodi do pada pH u mišiću (Jiang i sar., 2007c). Tokom stresa (npr. transport) ili dugog perioda gladovanja, sadržaj glikogena u mišićima u trenutku klanja može biti neadekvatan, tako da pH ostaje visok, što negativno utiče na kvalitet mesa (Kamboh i sar., 2019).

Vrednost pH, kao jedan od najvažnijih parametara kvaliteta mesa živine, dovodi se u vezu sa različitim faktorima stresa pre klanja, kao što su period gladovanja pre klanja, hvatanje, utovar, transport i omamljivanje živine (Kamboh i sar., 2019). Različita istraživanja su pokazala da suplementacija flavonoidima može da ublaži štetne posledice stresora sredine na kvalitet mesa (najviše u fazama koje prethode klanju životinja), regulišući sintezu kateholamina i glukokortikoida pre, i pH mišića nakon klanja (Gessner i sar., 2017).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je pH vrednost mesa grudi brojlera starih 42 dana bila viša u svim grupama koje su bile suplementirane genisteinom tokom zadnje faze tova, s tim da

je značajna razlika uočena samo u pH vrednosti 45 minuta nakon klanja između grupa koje su dobijale 400, 600 i 800 mg/kg genisteina i kontrolne grupe brojlera (Grafik 5.15.). U skladu sa ovim rezultatima u različitim studijama je pokazano da flavonoidi pozitivno utiču na pH vrednost, odnosno povećavaju vrednost pH mesa i sprečavaju nagli pad koji negativno utiče primarno na sposobnost vezivanja vode i boju mesa. Vrednost pH 45 min nakon klanja rasla je u mesu grudi brojlera dodavanjem u hrani genisteina i hesperidina pojedinačno, i u kombinaciji, tokom 42 dana, ali sa značajnom razlikom zabeleženom samo u navećoj količini ova dva flavonoida (20 mg/kg, 1:4). U drugoj studiji 3 g/kg hesperidina značajno je povećalo pH mesa grudi brojlera starih 40 dana 24 h nakon klanja (Simitzis i sar., 2011). Dodavanje 20 i 40 mg/kg izoflavona gliciteina u kasnoj fazi, tokom produženog tova, značajno je povećalo pH vrednost mesa grudi 45 min nakon klanja (Jiang i sar., 2007b). U studiji Peña i sar. (2008) pH vrednost u mesu grudi brojlera nakon 1 h, 4 h i 24 h od klanja nije se značajno razlikovala između kontrolne i grupa koje su dobijale visoke količine preparata askorbinske kiseline i flavonoida (250-1000 mg/kg), međutim uočeno je da je opadanje pH vrednosti bilo blaže u oglednim grupama brojlera.

Za razliku od prethodno navedenih studija i nalaza u ovoj doktorskoj disertaciji nakon prvog eksperimentalnog perioda, nakon produžene suplementacije genisteina nije uočena razlika u pH vrednosti mesa grudi brojlera 45 min, 24 h i 48 h nakon klanja (Grafik 5.16.). U skladu sa ovim nalazom, vrednost pH bila je nepromenjena u mesu grudi brojlera koji su tokom pet nedelja u hrani dobijali klijalu i fermentisanu soju u količini od 0,3 do 1% (Lee i sar., 2010). Suplementacija hesperidina ili naringina u hrani brojlera takođe nije uticala na pH vrednost pektoralnog mišića 24 h nakon klanja (Goliomytis i sar., 2015). Slično su pokazali i Goliomytis i sar. (2014) dodavanjem 0,5 i 1 g/kg kvercetina i Cao i sar. (2008) dodavanjem fermentisanog lišća *Ginkgo biloba*, s tim da je pH vrednost nakon 24 h bio značajno viši kod grupa koje su dobijale visoke količine lišća *Ginkgo biloba*. Sojini izoflavoni u količini od 20 mg/kg nije značajno uticao na pH vrednost mesa grudi brojlera hranjenih užeglim ribljim uljem tokom produženog tova (43.-63. dan) (Jiang i sar., 2007c). Međutim u sledećoj studiji Jiang i sar. (2014), 40 mg/kg sojinog izoflavona tokom istog produženog tova značajno je povećalo pH mesa brojlera nakon 24 i 48 sati skladištenja. Ishrana bogata izoflavonima u studiji Kuhn i sar. (2004) nije uticala na pH vrednost *m. longissimus dorsi* svinja starih 5,5 meseci 45 min nakon klanja. Razlike u pH vrednosti mesa grudi brojlera nisu uočene između kontrolne grupe i grupa koje su tokom šest nedelja dobijale 5-15 mg/kg ekstrakta lucerke u hrani (Ouyang i sar., 2016). Prosečna pH vrednost mesa svinja hranjenih hranom na bazi soje, hranom sa dodatkom 20% graška i hranom sa dodatkom 18% boba takođe je bila nepromenjena, u granicama koje su uobičajne i koje ukazuju na adekvatnu acidifikaciju mesa (Gatta i sar., 2013). *In*

ovo aplikacija ekvola 7. dana embrionalnog razvoja u niskoj i visokoj dozi nije uticala na pH vrednost mesa grudi brojlera starih 49 dana (Kamboh i sar., 2016).

Viši pH u mesu dovodi se u vezu sa manjom proizvodnjom mlečne kiseline u mišiću *post mortem*, odnosno mogućnošću mišićne ćelije da ukloni produkte metabolizma, kao što je mlečna kiselina, koji dovode do pada pH vrednosti (Jiang i sar., 2007b; Raj i sar., 1992). Pokazano je da izoflavoni u hrani brojlera povećavaju antioksidativni status brojlera i štite skeletne mišićne ćelije od sporednih jedinjenja koja se stvaraju u metaboličkim procesima, kao što je mlečna kiselina (Jiang i sar., 2007b).

Značajno viša temperatura mišića grudi brojlera suplementiranih genisteinom u najvećoj količini (800 mg/kg) može se objasniti većom apsolutnom masom grudi, većim udelom mase grudi u masi trupa, većom apsolutnom masom mesa grudi i većim udelom mase mesa grudi u masi trupa ove grupe brojlera zbog čega je potrebno duže vreme hlađenja da se postigne niža temperatura u mesu grudi.

### **6.13. Sposobnost vezivanja vode (SVV)**

Poznato je da su sposobnost vezivanja vode, kapacitet zadržavanja vode i gubitak mase kuvanja od velike važnosti zbog toga što dosta utiču na finansijski aspekt industrije mesa. Meso koje ima nižu vrednost SVV ima bolji izgled i veću mekoću i sočnost. Sa manjim gubitkom mesnog soka nakon kuvanja, manji je gubitak esencijalnih minerala i vitamina, pa se samim tim povećava nutritivna vrednost mesa (Yu i sar., 2005). Kapacitet zadržavanja vode i SVV su u direktnoj vezi sa sadržajem intramuskularne masti i vode u mesu. Niža vrednost kapaciteta zadržavanja vode, a viša SVV vrednost, ukazuju na gubitak mesnog soka bogatog hemom i jedinjenjima koje utiču na ukus mesa. Tako da gubitak mesnog soka, pored smanjene nutritivne vrednosti, utiče na fizičke karakteristike (tvrdo i suvo meso), ukus i boju mesa (Luciano i sar., 2009). Kapacitet zadržavanja vode u bliskoj vezi je sa integritetom membrane mišićne ćelije, tako da stabilna sarkolema, koja zavisi od dobrog antioksidativnog statusa, povećava kapacitet zadržavanja vode u mesu. Izoflavoni pozitivni efekat na ove parametre kvaliteta ostvaruju upravo povećanjem antioksidativnog kapaciteta (Kamboh i sar., 2016).

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na pozitivni efekat genisteina u hrani brojlera tokom prve faze finišera na SVV vrednost mesa grudi u svim oglednim grupama, s tim da je najbolji efekat postignut sa najvišom količinom, 800 mg/kg genisteina u hrani (smanjenje za 59,77%) (Tabela 5.17.). Ovaj rezultat se može dovesti u vezu i sa višom pH vrednošću mesa grudi brojlera oglednih grupa nakon prvog eksperimentalnog perioda (Grafik 5.15.). S produženim tovom pozitivni efekat

genisteina na vrednost SVV uočen je u količinama od 200, 400 i 600 mg/kg, dok grupa koja je dobijala 800 mg/kg nije se značajno razlikovala od kontrolne grupe (Tabela 5.17.).

U saglasnosti s ovim rezultatima, u studiji Jiang i sar. (2007b) kapacitet zadržavanja vode mesa grudi bio je blago poboljššan (za 17,24%) dodavanjem 40 mg/kg izoflavona tokom produžene faze tova, dok u drugoj studiji Jiang i sar. (2007c) 20 mg/kg izoflavona značajno je povećalo kapacitet zadržavanja vode mesa grudi brojlera. U studiji Jiang i sar. (2014) dodavanje od 10 do 80 mg/kg sojinog izoflavona tokom produženog tova značajno je poboljšalo kapacitet zadržavanja vode mesa grudi brojlera starih 63 dana. Bolju vrednost SVV i manji gubitak vode kuvanjem uočili su i Cao i sar. (2012) dodavanjem viših količina proizvoda dobijenog fermentacijom lišća *Ginkgo biloba*. Dodavanjem 0,6 U/g  $\beta$ -glukozidaze u hrani brojlera vrednost SVV bila je smanjena za 22% (Qian i sar., 2012), dok dodavanjem 15 mg/kg ekstrakta lucerke uočen je pad SVV vrednosti od 8,76% (Ouyang i sar., 2016). Kao što je napomenuto u prethodnom potpoglavlju, niska pH vrednost mesa udružena je sa smanjenim kapacitetom zadržavanja vode, većim SVV vrednostima i većim gubitkom mesnog soka nakon kuvanja, pa Jiang i sar. (2014) naglašavaju vezu između više pH vrednosti mesa, odnosno smanjene proizvodnje laktata u mišiću *post mortem*, i boljeg kapaciteta zadržavanja vode u mesu.

U studiji Kamboh i Zhu (2013a) dodavanje genisteina i hesperidina, u čistoj supstanci i u kombinaciji, u hrani brojlera tokom 42 dana značajno je povećalo kapacitet zadržavanja vode u mesu grudi, čime je pokazano da suplementacija ova dva flavonioda mogu potencijalno da smanje negativne efekte stresogenih faktora na kvalitet mesa grudi brojlera. Lee i sar. (2010) su dodavanjem od 0,3 do 1% klijale i fermentisane soje u hrani brojlera značajno smanjili gubitak mase kuvanja, a taj efekat su takođe pripisali antioksidativnim svojstvima izoflavona koji održavaju integritet membrane mišićnih ćelija. Pored antioksidativnog efekta, pozitivni uticaj na SVV vrednost mesa flavonoidi mogu da ostvare i preko imunomodulatorskog efekta uključenog u komponente humoralnog imunskog odgovora (Liao i sar., 2018; Middleton, 1996). Visoka doza ekvola (100  $\mu$ g) *in ovo* sedmog dana embrionalnog razvoja značajno je smanjila vrednost SVV i gubitak mase nakon kuvanja u uzorcima mesa grudi brojlera ženskog pola starih 49 dana. Autori navode da je pol ključni faktor u regulatornom efektu maternalne suplementacije izoflavona na kvalitet mesa (Kamboh i sar., 2016).

Postoje i studije u kojima flavonoidi u hrani nisu ostvarili efekat na ove parametre kvaliteta mesa. Tako različite koncentracije hesperidina, naringina i kvercetina nisu uticale na gubitak mase kuvanja mesa grudi brojlera (Goliomytis i sar., 2015; Goliomytis i sar., 2014; Simitzis i sar., 2011). Liao i sar. (2018) dodavanjem flavonoida iz biljke *Scutellaria baicalensis* Georgi u količini od 120

do 240 mg/kg nisu uočili efekat na SVV vrednost mesa grudi brojlera. Ishrana svinja hranom sa različitom količinom izoflavona nije značajno uticala na SVV vrednost *m. longissimus dorsi* svinja starih 170 dana (Kuhn i sar., 2004). Dodatno, najveća količina preparata askorbinske kiseline i flavonoida u hrani brojlera promovisala je čak i najveći gubitak mase kuvanja (Peña i sar., 2008).

Parametri gubitak mase kuvanjem i SVV zavise od različitih faktora: starost, pol, ishrana, način klanja, skladištenje i temperatura (Lawrie, 1991). Novi podaci dobijeni izučavanjem antioksidanasa poreklom iz biljaka mogu da budu od velike koristi u pronalaženju potencijalnih alternativa neorganskim antioksidansima u hrani za životinje kojima se prevazilaze problemi kvaliteta mesa uzrokovani faktorima stresa pre klanja životinja.

#### **6.14. Hemijski sastav mesa brojlera nakon 42. i 58. dana tova**

Nutritivna vrednost mesa može se odrediti na osnovu parametara kao što su sadržaj i sastav proteina, sadržaj aminokiselina, sadržaj masti, a dodatno i određivanjem sadržaja ugljenih hidrata, minerala (K, P, Na) i vitamina (Suchý i sar., 2002). Kvalitet mesa živine primarno se procenjuje na osnovu hemijskog sastava i odnosa meso/mast u trupu. Hemijski sastav mesa živine, a najviše sadržaj proteina i masti, dosta varira u zavisnosti od vrste, provenijencije, starosti, pola i tipa mišića, odnosno funkcije određenog tkiva. Tako npr. postoje razlike u sastavu belog i crvenog mišićnog tkiva, dok brojleri ženskog pola imaju manji udeo vrednijih delova trupa i veću masu grudi, a manju masu karabataka u odnosu na brojlere muškog pola (Suchý i sar., 2002). Meso brojlera, zajedno sa ćurećim mesom, karakteriše se kao meso sa visokim sadržajem proteina (23%), niskim sadržajem masti (3-8%), niskom energetsom vrednošću (519–741 kJ/100 g), a visokim sadržajem linolne,  $\alpha$ -linolenska i arahidonske kiseline (Suchý i sar., 2002).

Smatra se da su proteini najvažnije komponente mesa s nutritivnog i tehnološkog aspekta i da sadržaj proteina u mesu se nalazi u opsegu od 18 do 22%, čime čine najveći deo suve materije mesa. Prema Simeonovová (1999) prosečan sadržaj proteina u mesu grudi brojlera je 22%, dok u mesu karabataka, koje sadrži više masti, prosečan sadržaj proteina je 17,2%. S druge strane, mast je izuzetno važna sa senzorskog aspekta zato što je izvor brojnih aromatičnih jedinjenja koja utiču na ukus mesa. Utvrđena je značajna negativna korelaciona zavisnost između sadržaja masti i sadržaja proteina u mesu, odnosno s većim sadržajem masti, manji je sadržaj proteina, i takvo meso prema nutritivnim preporukama manje je poželjno u ishrani ljudi (Suchý i sar., 2002).

U ovoj doktorskoj disertaciji suplementacija genisteinom nije značajno uticala na hemijski sastav mesa grudi brojlera nakon prve faze eksperimenta, sa izuzetkom značajno nižeg sadržaja proteina i višeg sadržaja vode i pepela u grupi koja je dobijala 600 mg/kg (Tabela 5.18.). Nakon produženog

tova, uočen je izraženiji efekat, gde je u svim oglednim grupama sadržaj proteina bio viši, a u obrnutoj proporciji s ovim parametrom, sadržaj masti je bio niži u odnosu na kontrolnu grupu brojlera. Slične razlike nakon produženog tova uočene su i u hemijskom sastavu mesa karabataka, s tim da je pad u sadržaju masti bio više izražen s porastom količine genisteina u hrani (za 56,53% u grupi sa 800 mg/kg genisteina u odnosu na kontrolnu grupu) (Tabela 5.19.).

Izoflavoni vezujući se za ER i ostvarujući efekte slične estrogenu mogu da utiču na hemijski sastav mesa, i ovaj parametar kvaliteta mesa u ranijim eksperimentima je izučavan više s aspekta prisustva soje u hrani za životinje. Međutim o uticaju pojedinačnih čistih supstanci izoflavona na hemijski sastav mesa nema dovoljno podataka (D'Souza i sar., 2005; Dixon i Ferreira, 2002). Tako je npr. pokazano da je sadržaj masti u mesu kobije (*Rachycentron canadum*) značajno rastao sa porastom učešća sojine sačme u obroku, dok varijacije u sadržaju pepela i proteina nisu pokazale određeni trend (Chou i sar., 2004). Supstitucijom sojine sačme graškom i bobom u hrani hemijski sastav mišića *m. longissimus lumborum* svinja bio je izmenjen, pa je sadržaj proteina i suve materije bio značajno viši u odnosu na kontrolnu grupu svinja (Gatta i sar., 2013). Izoflavoni u hrani pacova u količini od 431, 862 i 1724 mg/kg tokom graviditeta samo kod potomaka ženskog pola značajno su povećali sadržaj proteina trupa i mišića zadnje noge (*m. biceps femoris*), ukazujući na generalno anabolički efekat, pri čemu izoflavoni ne ostvaruju efekat direktno na razvoj mišićne mase, već indirektno preko pol-zavisnog mehanizma (menjaju nivo androgena) (Cook, 1998).

Jedna od retkih studija koja nam pruža informacije o uticaju pojedinačnih supstanci genisteina i hesperidina na hemijski sastav mesa brojlera izvedena je od strane Kamboh i sar. (2016). U skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije nakon suplementacije genisteinom tokom 37 dana, dodavanjem genisteina i hesperidina u čistoj supstanci, i u kombinaciji, povećan je sadržaj proteina u mesu grudi brojlera starih 42 dana, sa značajnom razlikom u odnosu na kontrolnu grupu samo u grupi sa najvećom količinom ova dva flavonoida (20 mg/kg, 1:4). U poređenju sa kontrolnom grupom sve ogledne grupe, izuzev one koja je dobijala 5 mg/kg genisteina, imale su značajno niži sadržaj masti, sa najvećim padom u grupi sa najvišom količinom genisteina i hesperidina u hrani (pad za 18,2%), dok suplementacija genisteina i hesperidina nije imala uticaj na sadržaj vode i pepela u mesu grudi brojlera, što takođe podržavaju rezultati ove doktorske disertacije.

Za razliku od navedenih povoljnih efekata flavonoida na hemijski sastav mesa, pokazano je da genistein u količini od 500 do 3000 mg/kg tokom 6 i 12 meseci u hrani nije uticao na sadržaj proteina, pepela, masti i vode u filetima pastrmke (D'Souza i sar., 2005). Dodatno, različita količina izoflavona u hrani svinja od 28. do 170. dana starosti takođe nije uticala na hemijski sastav i sadržaj IGF-1R mRNA u *m. longissimus dorsi* (Kuhn i sar., 2004). Formononetin u hrani brojlera tokom 6

nedelja nije uticao na sadržaj proteina i vode u mesu grudi, dok je u nižoj dozi (10 mg/kg) pokazao tendenciju ka padu sadržaja masti u odnosu na kontrolnu grupu i grupu koja je dobijala 20 mg/kg formononetina (Iqbal i sar., 2013).

Pokazano je da flavonoidi u hrani za brojlere mogu efikasno menjati i masnokiselinski sastav mesa tako što povećavaju sadržaj nezasićenih masnih kiselina ili ih štite od oksidacije. Cao i sar. (2012) su u mesu grudi smanjili ukupnu količinu SFA (C16:0 i C18:0), a povećali količinu PUFA (C18:2, C18:3 i C20:4) dodavanjem flavonoida dobijenih fermentacijom lišća *Ginkgo biloba* u hrani brojlera. U studiji Kamboh i Zhu (2013c) suplementacija čiste supstance genisteina i hesperidina smanjila je sadržaj holesterola i triglicerida i povoljno uticala na masnokiselinski sastav mesa grudi brojlera (smanjen sadržaj SFA i povećan sadržaj PUFA, smanjen odnos n-6/n-3). Konzumiranjem mesa ovakvog masnokiselinskog sastava smanjuje se rizik od nastanka koronarnih bolesti (Cao i sar., 2012).

### 6.15. Sadržaj genisteina u mesu grudi brojlera

Kvalitet mesa životinja u velikoj meri zavisi od ishrane. Različiti dodaci hrani za životinje utiču na hemijski sastav, masnokiselinski sastav, boju, teksturu, ukus i održivost mesa (Kambogh i sar., 2019). Pored toga, aktivna jedinjenja poreklom iz hrane, između ostalog i izoflavoni, imaju potencijal da se deponuju u jestivim tkivima (meso i jaja) životinja čime se dobijaju namirnice sa dodatom vrednošću i na taj način povećava unos izoflavona koji mogu da ostvaruju povoljne efekte na zdravlje potrošača (Marković i sar., 2015; D'Souza i sar., 2005; Lin i sar., 2004). U više prethodnih studija pokazano je da jaja mogu da budu dobar izvor izoflavona u ishrani ljudi (Akdemir i Sahin, 2009; Lin i sar., 2004; Saitoh i sar., 2001). U studiji Vargas Galdos (2009) analiziranjem komercijalnih jaja utvrđeno je da je sadržaj izoflavona bio u opsegu od 33 do 120 µg/100 g žumanceta jaja, dok dodavanjem suplemenata izoflavona u hrani nosilja tokom deset dana količina izoflavona je dostigla vrednost do 998 µg/ 100 g žumanceta.

Na bioraspoloživost izoflavona, od koje zavisi njihova koncentracija u tkivima životinja, utiče više faktora: sastav smeše za ishranu, pol, hemijska forma jedinjenja i starost jedinke (Chen i Bakhiet, 2006). D'Souza i sar. (2005) dodatno navode da koncentracija genisteina u tkivu zavisi od vrste životinje, tkiva, dužine davanja genisteina i načina aplikovanja genisteina.

U zavisnosti od doze i izvora izoflavona u hrani, poluvreme eliminacije ovih jedinjenja iz plazme preko bilijarne ili urinarne ekskrecije iznosi od 8 do 11 sati. Međutim još uvek nema dovoljno podataka o prisustvu i vrsti metabolita izoflavona u tkivu, odnosno nije dovoljno razjašnjeno u kojoj meri određeni organi mogu da koncentruju i deponuju metabolite izoflavona (Urpi-Sarda i sar., 2008). U studiji Urpi-Sarda i sar. (2008) u tkivima ovaca utvrđeno je prisustvo izoflavona u formi



glukuronida (daidzein i ekvol), dok su Chang i sar. (2000) utvrdili veliki udeo genisteina u formi aglikona u tkivima pacova.

U eksperimentu Gatta i sar. (2013) praćena je koncentracija izoflavona u plazmi, svežem i kuvanom mesu svinja hranjenih hranom sa različitom količinom izoflavona: hrana na bazi sojine sačme (14,65 mg/kg genisteina), hrana u kojoj je deo sojine sačme zamenjen graškom (7,65 mg/kg genisteina) i hrana u kojoj je deo sojine sačme zamenjen bobom (1,59 mg/kg genisteina). Nivo genisteina u plazmi svinja bio je najniži u grupi koja je u hrani dobijala grašak, što nije u relaciji sa koncentracijom genisteina u ovako formulisanoj hrani. Takođe, nivo genisteina u mesu bio je viši kod svinja koje su dobijale hranu koja je imala niži sadržaj genisteina i genistina (bob), odnosno u ovoj studiji nije uočen dozno-zavisni efekat koncentracije genisteina u hrani i plazmi i mesu svinja. Za razliku od genisteina, koncentracija daidzeina u plazmi i mesu bila je u korelaciji sa nivoom daidzeina i daidzina u hrani svinja. Nakon kuvanja, koncentracija daidzeina u mesu svinja opala je za 70-85%, a genisteina za 58-87% od inicijalne koncentracije. Direktnu proporcionalnost između sadržaja daidzeina i genisteina u hrani i koncentracije ova dva izoflavona u plazmi svinja starih 170 dana utvrdili su Kuhn i sar. (2004).

Kod pacova starih godinu dana koji su hranjeni visokim dozama genisteina 62, 154 i 308 mg/kg tokom pet nedelja uočen je linearni dozno-zavisni porast koncentracije genisteina u *m. gastrocnemius* (0,08, 0,11 i 0,35 nmol/g, pojedinačno), dok takav trend nije uočen kod pacova starih dve godine koji su dobijali samo dve koncentracije (154 i 308 mg/kg) genisteina u hrani (0,32 i 0,33 nmol/g, pojedinačno) (Chen i Bakhiet, 2006). U istoj studiji pokazano je da je koncentracija genisteina u jetri bila 75% viša u odnosu na *m. gastrocnemius* kod odraslih, bez uočenih razlika u koncentraciji genisteina za ova dva tkiva kod starijih pacova, odnosno da se sa starošću smanjuje razlika u deponovanju genisteina u različitim tkivima. Slične koncentracije genisteina u jetri i mišiću kod starijih pacova ukazuju na izmenjen metabolizam ili iskoristivost genisteina, kao što je npr. povećano deponovanje genisteina u mišiću ili povećana ekskrecija i razlaganje genisteina u jetri. Može se zaključiti da sa starošću se smanjuje sistemska raspoloživost genisteina i efekti koje ostvaruje u organizmu pacova (Chen i Bakhiet, 2006).

D'Souza i sar. (2005) su pratili mogućnost deponovanja genisteina u mesu pastrmki nakon suplementacije od 500, 1000 i 3000 mg/kg genisteina u hrani tokom 6 i 12 meseci. Pokazano je da je koncentracija genisteina u filetima pastrmke značajno zavisila od količine genisteina u hrani, sa potvrđenom pozitivnom korelacionom zavisnošću za oba perioda uzgoja. Tako da je najveća koncentracija genisteina (~5.4 pmol/mg) utvrđena u grupi koja je dobijala 3000 mg/kg genisteina, dok u grupi pastrmki koja nije dobijala genistein u hrani, nije detektovan genistein u filetima.

Dodatno je pokazano da količina genisteina deponovanog u filetima pastrmki se nije razlikovala između dva posmatrana perioda, odnosno da produžena suplementacija (12 meseci) nije uticala na nivo genisteina u mesu.

Sadržaj izoflavona u mišićnom tkivu praćen je kod različitih životinja, ali mali broj istraživanja se bavio mogućnošću deponovanja genisteina u mesu živine. U ovoj doktorskoj disertaciji jedan od ciljeva je bio da se utvrdi u kojoj meri visoke doze genisteina, nakon kraćeg i produženog vremena davanja, preko hrane mogu da utiču na deponovanje metabolita genisteina u mesu grudi brojlera starijih od 21. dana (tokom završne faze tova). Pokazano je da unos hrane koja je sadržala <20, 97, 213, 432 i 651 mg genisteina/kg tokom 21 dana i 37 dana nije dovela do deponovanja genisteina do nivoa detekcije (<5,6 nmol/kg) u mesu grudi brojlera (Grafik 5.18.).

U eksperimentu Vargas Galdos (2009) nosilje su dobijale hranu koja nije sadržala soju, hranu sa 25% sojine sačme i hranu sa 25% sojine sačme i 5 g/100 g hrane preparata izoflavona tokom 28 dana. To je bila prva studija u kojoj se pratila koncentracija izoflavona u tkivima živine nakon suplementacije izoflavona u hrani. U tkivima nosilja koje su dobijale hranu bez sojine sačme nije utvrđeno prisustvo individualnih izoflavona: daidzein, glicitein, genistein i ekvol (bili su ispod nivoa detekcije). U kontrolnoj grupi nosilja koje su dobijale 25% sojine sačme koncentracija ukupnih izoflavona u jetri iznosila je 819 µg/100 g (genistein-115 µg/100 g). Genistein je u hrani kontrolne grupe činio 26% ukupnih izoflavona, dok je u tkivu jetre činio samo 14% ukupnih detektovanih izoflavona, što pokazuje da genistein podleže ekstenzivnoj bakterijskoj degradaciji u digestivnom traktu (Maubach i sar., 2006). Koncentracija ukupnih izoflavona u jetri, bubregu i srcu nosilja hranjenih hranom koja je sadržala 572,85 mg ukupnih izoflavona/100 g bila je 7162 µg/100 g, 3355 µg/100 g i 272 µg/100 g, pojedinačno. U mesu nosilja koncentracija daidzeina bila je 97 µg/100 g, dok genistein, ekvol i glicitein su bili ispod nivoa kvantifikacije, što je u saglasnosti sa rezultatima ove doktorske disertacije.

Urpi-Sarda i sar. (2008) su u mišiću ovaca, koje su dnevno, tokom mesec dana, hranom unosile 157,6 mg/kg telesne mase izoflavona, utvrdili da je koncentracija ukupnih izoflavona bila niža od 10 nmol/g, a sveukupna distribucija metabolita izoflavona u tkivima je pokazala da ni u jednom organu, izuzev bubrega, nema akumulacije ovih metabolita. Ovakvo meso ovaca obezbeđivalo bi oko 10 µg daidzeina i 80 µg ekvola na 100 g mesa, pa se ne može smatrati potencijalnim izvorom izoflavona u ishrani ljudi u poređenju sa hranom na bazi soje. Slično su pokazali i D'Souza i sar. (2005), koji su suplementacijom genisteina u količini od 500 do 3000 mg/kg utvrdili da je količina genisteina u filetima pastrmke bila jedan stoti deo količine genisteina koja se nalazi u komercijalnoj hrani na bazi soje kao što su tofu i tempeh.

Deponovanje estrogenu sličnih supstanci u tkivo određeno je kompleksnim fiziološkim i biohemijskim procesima koji delimično zavise od svojstva samog jedinjenja kao što su lipofilnost, veličina molekula, afinitet prema plazmi i od intracelularnih proteina. Za estradiol je poznato da najvažnije determinante koje definišu njegovo deponovanje uključuju zastupljenost ER u tkivu i afinitet vezivanja, vaskularnu permeabilnost, tkivo/krv koeficijent i ekstrahepatični metabolizam, dok je ulogu ovih faktora u slučaju metabolita izoflavona potrebno dodatno istražiti (Urpi-Sarda i sar., 2008; Plowchalk i Teeguarden, 2002).

#### **6.16. TBARS vrednost u mesu karabataka brojlera nakon dva eksperimentalna perioda**

Jedan od bitnih indikatora kvaliteta i prihvatljivosti mesa i proizvoda od mesa je i oksidativna stabilnost, odnosno odlaganje procesa oksidacije nezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima i trigliceridima, koji utiče na nastanak užeglog ukusa i mirisa. Meso, pakovano aerobno i u modifikovanoj atmosferi, idealan je medijum u kome su ispunjeni svi uslovi (prisustvo nezasićenih masnih kiselina, kiseonika i hemijskih vrsta koje ubrzavaju reakciju, npr. gvožđe) za razvoj peroksidacije. U svinjskom i živinskom mesu, koje sadrži više nezasićenih masnih kiselina u trigliceridima, kao i u mlevenom mesu, koje tokom prerade je više izloženo kiseoniku i reaktivnim kiseoničnim vrstama, brže se razvija lipidna oksidacija (Faustman i sar., 2010). Komercijalno zamrznuto meso tokom dužeg vremenskog perioda, u optimalnim fizičkim i mikrobiološkim uslovima, može da bude nebezbedno za konzumaciju zbog formiranja malondialdehida (MDA), koji je sekundarni proizvod lipidne peroksidacije poznat da može da dovede do toksičnih i mutagenih efekata. Praćenjem koncentracije MDA može se utvrditi nivo lipidne oksidacije u mesu izazvane reaktivnim kiseoničnim vrstama (Reitznerová i sar., 2017). U slučajevima kada nivo slobodnih radikala prelazi celularni antioksidativni kapacitet javlja se citotoksični efekat na masne kiseline i pokretanje lipidne peroksidacije u membranama ćelija. Tako da inhibiranjem lipidne peroksidacije i stvaranja MDA kod brojlera, primarno se štite polinezasićene masne kiseline koje su najosetljivije prema oksidaciji u mesu (Kamboh i Zhu, 2013c). U različitim *in vitro* i *in vivo* studijama pokazano je da flavonoidi mogu značajno da smanje stvaranje MDA u mesu životinja (Kamboh i sar., 2019; Reitznerová i sar., 2017). Kao što je objašnjeno u prethodnom potpoglavlju (6.7), povećanjem antioksidativnog statusa brojlera, povećava se oksidativna stabilnost mesa, što je bitno kako za potrošače, tako i za proces prerade mesa.

U prethodnim studijama je pokazano da flavonoidi koji se unose hranom mogu da produže održivost mesa tako što smanjuju lipidnu peroksidaciju i rast mikroorganizama kvara (Kamboh i sar., 2019; Kamboh i sar., 2017; Goliomytis i sar., 2015). Jiang i sar. (2014) su dodavanjem izoflavona u hrani brojlera u dozi od 10 do 80 mg/kg uočili linearni i kvadratni pad količine MDA u

mesu brojlera 72 h nakon klanja. Izoflavoni u hrani brojlera tokom produženog tova u količini od 20 do 80 mg/kg značajno su smanjili sadržaj MDA u mesu grudi brojlera muškog pola (Jiang i sar., 2007b). Ispitivanjem stepena oksidacije u mesu brojlera hranjenih užeglim riblji uljem, Jiang i sar. (2007c) su utvrdili da je sadržaj MDA u mesu grudi brojlera bio smanjen za 45,54% dodavanjem 20 mg/kg izoflavona u hrani. Genistein u hrani u količini od 20 do 320 mg/kg značajno je smanjio sadržaj MDA u mesu karabataka brojlera starih 42 dana (Rasouli i Jahanian, 2019). Dodavanje genisteina u hrani pastrmki tokom 6 i 12 meseci u količini od 500 do 3000 mg/kg značajno je smanjilo TBARS vrednost u filetima za oba perioda sa potvrđenom obrnutom proporcionalnošću koncentracije genisteina u hrani i koncentracije MDA u mesu (D'Souza i sar., 2005). Hesperidin u hrani brojlera u količini od 1,5 i 3 g/kg značajno je odložio lipidnu oksidaciju u mesu grudi brojlera tokom 9 dana skladištenja na temperaturi frižidera (do 4 °C) (Simitzis i sar., 2011). Da antioksidativni efekat flavonoidi ne ostvaruju samo *in vivo*, već i *post mortem*, produžavajući održivost mesa pokazali su i Goliomytis i sar. (2014). U njihovoj studiji dodavanjem kverectina u hrani brojlera značajno je povećana oksidativna stabilnost mesa grudi (manja MDA vrednost) od 3. do 9. dana skladištenja, a ovaj efekat su pripisali akumulaciji metabolita kvercetina, glukuronida i sulfonata, u mesu grudi brojlera.

Suplementacija naringina i hesperidina poboljšala je oksidativnu stabilnost mesa grudi i karabataka i smanjila sadržaj MDA nakon šest dana skladištenja. Linearna dozna zavisnost između količine ova dva flavonoida i koncentracije MDA uočena je tokom šest i devet dana skladištenja na temperaturi do 4 °C, i 120 dana na temperaturi do -20 °C (Goliomytis i sar., 2015). U studiji Kamboh i Zhu (2013a) suplementacija genisteinom i hesperidinom na dozno-zavisni način značajno je smanjila stvaranje MDA u mesu grudi brojlera nakon klanja i nakon 15 dana skladištenja. Pored uočenog porasta sadržaja MDA nakon 15 dana skladištenja, u svim oglednim grupama koje su dobijale genistein i hesperidin, pojedinačno ili u kombinaciji, sadržaj MDA bio je značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu.

Dozno-zavisni efekat dodavanja genisteina u hrani brojlera u količinama od 200 do 800 mg/kg na TBARS vrednost mesa karabataka tokom 9 meseci skladištenja na temperaturi - 20 °C uočen je i u ovoj doktorskoj disertaciji, naročito nakon produžene suplementacije. Najviša količina genisteina u hrani tokom 37 dana TBARS vrednost u mesu karabataka smanjila je za 44%, 52,27%, 39, 55% i 36,46%, nakon klanja, trećeg, šestog i devetog meseca skladištenja, pojedinačno (Tabela 5.20.). Svakako da svi prethodno navedeni parametri kvaliteta (pH i SVV) i promene koje su uočene u ovoj doktorskoj disertaciji u mesu brojlera oglednih grupa govore u prilog uticaju genisteina na oksidativnu stabilnost mesa.

S druge strane, dodavanje klijale i fermentisane soje u količini od 0,3 do 1% nije uticalo na sadržaj MDA u mesu grudi brojlera nakon šest nedelja tova (Lee i sar., 2010). U studiji Gatta i sar. (2013) u rezultatima dobijenim probama kojima se određuju markeri oksidativnog stresa u uzorcima krvi nisu uočene razlike između grupa svinja hranjenih hranom sa različitim sadržajem izoflavona. Flavonoidi iz biljke *Scutellaria baicalensis* Georgi u količini od 60 do 240 mg/kg nisu uticali na sadržaj MDA u mesu grudi brojlera starih 42 dana (Liao i sar., 2017). U studiji Wei i sar. (2010) *in ovo* aplikacija ekvola nije uticala na sadržaj MDA u mesu grudi brojlera ženskog pola starih 49 dana, međutim aktivnost SOD i GSH-Px je bila povećana u mišiću grudi. Preparat flavonoida i askorbinske kiseline u količini od 250 do 1000 mg/kg nije značajno uticao na nivo MDA u zamrznutom mišiću karabataka brojlera starih 32 dana nakon 7 meseci skladištenja na temperaturi -18 °C (Peña i sar., 2009).

Kada se govori o uticaju izoflavona na oksidativnu stabilnost mesa, u obzir se mora uzeti njegov uticaj na sveukupni antioksidatni kapacitet organizma. Kao što je navedeno u potpoglavlju 6.7. primarni antioksidativni mehanizam dejstva se zasniva na povećanju aktivnosti enzima antioksidativne zaštite. Postoje studije u kojima se nije uočio efekat na koncentraciju MDA u mesu, ali u kojima je uočen pozitivan efekat na aktivnost navedenih enzima u serumu, jetri i mišićima živine (Liao i sar., 2017; Wei i sar., 2010). Goliomytis i sar. (2015) navode da najverovatniji mehanizam kojim polifenoli smanjuju nastanak MDA je heliranje Fe i Cu i menjanje njihove koncentracije u mišićima. Dodatno, u različitim studijama je pokazano da flavonoidi, uključujući i genistein, ostvaruju manji antioksidativni efekat u poređenju sa  $\alpha$ -tokoferolom (Goliomytis i sar., 2015; Simitzis i sar., 2011; D'Souza i sar., 2005). Razlozi zbog kojih flavonoidi ostvaruju različitu efikasnost u inhibiranju lipidne oksidacije i smanjenju sadržaja MDA u mesu mogu biti: različiti uslovi gajenja, optimalne doze, frekvencija hranjenja, dužina trajanja tretmana i različiti uslovi skladištenja mesa (Lee i sar., 2010).

#### **6.17. Senzorska ispitivanja mesa grudi i bataka sa karabatakom**

Prethodne studije koje su se bavile procenom uticaja različitih ekstrakata biljaka na senzorski kvalitet mesa su pokazale da dodavanje ovih antioksidanasa u hrani ne ostvaruje ili ostvaruje mali efekat na senzorske karakteristike mesa, i da na ove parametre kvaliteta utiču više indirektno, preko različitih postmortalnih faktora (Kamboh i Zhu, 2013a). Malo je podataka u literaturi o uticaju čistih supstanci na senzorske karakteristike mesa piladi. U većini studija koje su se bavile konkretno flavonoidima u hrani, procena kvaliteta mesa, pored određivanja pH, SVV, WHC i hemijskog sastava, vršena je i instrumentalnim merenjem boje mesa.

Izgled i boja površine mesa brojlera bitno utiče na kupovne odluke potrošača, tako da bledo meso je najčešće neprihvatljivo potrošačima. U slučaju oksidativnog/antioksidativnog disbalansa metmioglobin može da se oksiduje i transformiše u druge fiziološke forme, pa antioksidansi u hrani su se pokazali naročito efikasnim u održavanju adekvatne boje mesa brojlera. Mišić grudi brojlera formira oksimioglobin nakon izlaganja vazduhu i ima veću potrošnju kiseonika od crvenih mišića, tako da favorizuje formiranje metmioglobina na površini mesa (Kamboh i Zhu, 2013a). Stepenn diskoloracije mesa direktno zavisi od procesa oksidacije i enzimskih redukcionih sistema koji kontrolišu nivo metmioglobina u mesu (Faustman i Cassens, 1989). Viša L\* (lightness) vrednost implicira povećano formiranje metmioglobina u mesu grudi (Kamboh i Zhu, 2013a). Prethodne studije su pokazale da je kapacitet zadržavanja vode u negativnoj korelaciji s L\* i b\* (yellowness) vrednošću boje mesa grudi brojlera, dok je u pozitivnoj korelaciji sa a\* (redness) vrednošću boje i pH (Young i sar., 2003).

Jiang i sar (2007c) su utvrdili značajno višu a\* vrednost boje mesa grudi brojlera dodavanjem 20 mg/kg, ukazujući da stepenn oksidacije mioglobina u mesu može biti smanjen suplementacijom izoflavona u hrani brojlera. Jiang i sar. (2014) su dodatno pokazali da tokom skladištenja je rasla a\* vrednost, a opadala L\* vrednost boje mesa grudi brojlera sa rastom količine izoflavona u hrani, a najbolji efekat je postignut sa 40 mg/kg izoflavona. U studiji Qian i sar. (2012) i Goliomytis i sar. (2014) uočen je sličan efekat  $\beta$ -glukozidaze i kvercetina u hrani na meso grudi brojlera.

Suprotno prethodno navedenim studijama L\* vrednost boje mesa grudi brojlera bila je značajno povećana dodavanjem 40 i 80 mg/kg sojinih izoflavona u hrani tokom produžene faze tova (Jiang i sar., 2007b). Zatim, *in ovo* aplikacija ekvola značajno je smanjila udeo crvene (a\* vrednost) i žute boje (b\* vrednost) kod brojlera ženskog pola starih 49 dana (Wei i sar., 2010). Slično su pokazali i Payne i sar. (2001b) da sa porastom količine izoflavona u hrani linearno pada a\* i b\* vrednost boje mesa.

U saglasnosti sa rezultatima senzorske analize ove doktorske disertacije, gde nije uočen efekat suplementacije gensteina na boju mesa grudi i bataka sa karabatakom, razlika u boji mesa grudi brojlera nije uočena ni dodavanjem fermentisane i klijale soje, hesperidina, naringina, preparata flavonoida iz biljke *Scutellaria baicalensis* Georgi, kombinacije flavonoida i askorbinske kiseline i proizvoda fermentisanog lišća *Ginkgo biloba* (Liao i sar., 2017; Goliomytis i sar., 2015; Cao i sar., 2012; Simitzis i sar., 2011; Lee i sar., 2010; Peña i sar., 2008). U studiji Gatta i sar. (2013) meso svinja koje su u hrani dobijale različite količine izoflavona je opisano kao svetlo i blede (visoka L\*, a niske a\* i b\* vrednosti), međutim bez razlika među ispitivanim grupama (Gatta i sar., 2013).

U jednoj od retkih studija u kojoj je pored instrumentalne, rađena i senzorska ocena mesa, nije uočena razlika u  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  vrednostima boje fileta pastrmke nakon suplementacije genisteina u količini od 500 do 3000 mg/kg, kako nakon 6, tako i nakon 12 meseci eksperimenta (D'Souza i sar., 2005). Takođe, testom trougla panelisti nisu utvrdili značajne senzorske razlike između fileta pastrmki koje su dobijale 0 i 3000 mg/kg genisteina.

Kvantitativnom deskriptivnom analizom u ovoj doktorskoj disertaciji nije uočen značajan uticaj suplementacije genisteina na senzorske karakteristike mesa grudi brojlera starih 42. dana. Nakon prvog eksperimentalnog perioda je jasnije uočen pozitivan efekat visokih doza genisteina (600 i 800 mg/kg) na ukus, mekoću, sočnost i ukupnu prihvatljivost mesa bataka sa karabatakom (Tabela 5.21. i 5.22.). Nakon produžene suplementacije genisteina uzorci mesa grudi brojlera oglednih grupa bile su bolje ocenjene za miris, mekoću i sočnost, a uzorci bataka s karabatakom za mekoću i sočnost u poređenju s kontrolnom grupom brojlera. Najbolje ocene ukupne prihvatljivosti za uzorke mesa grudi i bataka s karabatakom dobile su grupe koje su bile suplementirane sa 400 i 800 mg/kg genisteina (Tabela 5.23. i 5.24.).

U skladu s ovim rezultatima, Iqbal i sar. (2013) su senzorskom analizom utvrdili da je meso grudi kontrolne grupe brojlera bilo značajno tvrđe u poređenju sa mesom grudi brojlera suplementiranih sa 10 i 20 mg/kg formononetina, dok nisu utvrđene razlike između grupa za teksturu, miris, boju, ukus, sočnost i osećaj u ustima. Ukupna prihvatljivost mesa grudi bila je značajno bolje ocenjena za grupu koja je u hrani dobijala 10 mg/kg u odnosu na kontrolnu i grupu sa 20 mg/kg formononetina.

Tekstura je najverovatnije glavni i kritični faktor kvaliteta koji najviše utiče na prihvatljivost živinskog mesa od strane potrošača (Fletcher, 2002). Tekstura kivanog mesa uglavnom zavisi od miofibrilarnog sastava i kolagena, dok na sočnost i ukus najviše utiču sadržaj vode i intramuskularne masti zadržane u mesu nakon kuvanja (Li i sar., 2009). Izoflavoni pozitivno utiču na SVV i kapacitet zadržavanja vode, čime se pored povećanja nutritivne vrednosti, pozitivno utiče i na boju, mekoću, sočnost i ukus mesa (Qian i sar., 2012; Wei i sar., 2010). Bolje ocene za mekoću i sočnost mesa sa smanjenim sadržajem masti, uočene u ovoj doktorskoj disertaciji, pokazuju da genistein ima potencijal da poboljša senzorski kvalitet živinskog mesa sa smanjenim sadržajem masti koje se smatra nutritivno povoljnijim i poželjnim u ishrani ljudi (Iqbal i sar., 2013). Može se zaključiti da utičući pozitivno na kvalitet mesa brojlera (postepeni pad pH vrednosti, povećana sposobnost vezivanja i zadržavanja vode, povećan sadržaj proteina, a smanjen sadržaj masti, inhibicija lipidne peroksidacije), suplementacijom izoflavona u hrani posledično se može poboljšati i senzorski kvalitet mesa, primarno sočnost i mekoća.

Matsuura i sar. (1989) smatraju da genistein i daidzein mogu biti glavna jedinjenja koja određuju objektivni ukus sojinog mleka. Robinson i sar. (2005) su utvrdili da neobučeni ocenjivači ne mogu da oseću ukus genisteina u koncentraciji nižoj od  $4,006 \times 10^{-3}$  M u skrobnim rastvorima. Smatra se da genistein zbog svog gorkog ukusa može da utiče na stvaranje nepoželjnog ukusa u hrani na bazi soje (Okubo i sar., 1992). Međutim nije uočena pojava takvog ukusa u mesu nakon suplementacije genisteinom u ovoj doktorskoj disertaciji i studijama D'Souza i sar. (2005) i Kamboh i Zhu (2013a), pa se može smatrati da genistein u hrani neće negativno uticati na ukus i prihvatljivost mesa brojlera. Dodatno, sadržaj genisteina je 6,06 mg, a daidzeina 4,45 mg u 100 g sojinog mleka (USDA, 2008), dok je u prethodnim studijama, uključujući i ovu doktorsku disertaciju, sadržaj genisteina bio dosta niži ili ispod nivoa detekcije (Vargas Galdos, 2009; D'Souza i sar., 2005).

### **6.18. Izračunavanje ekonomičnosti proizvodnje brojlera u završnoj fazi tova**

Ispitivanje ekonomičnosti proizvodnje i isplativosti dodavanja preparata genisteina u hrani brojlera tokom završne i produžene faze tova pokazalo je da je sa porastom količine genisteina u hrani rasla cena koštanja, a finansijski rezultat i koeficijent ekonomičnosti opadao, sa izuzetkom O-III grupe brojlera koja je imala najlošije finansijske pokazatelje nakon produženog tova (Tabela 5.26.). Neisplativost ovakve proizvodnje se primarno može objasniti visokom cenom preparata čistog ekstrakta genisteina i visokim dozama koje su korišćene u ovom eksperimentu. Razlika u ceni hrane između grupa je bila velika, a značajne razlike u konzumaciji hrane između oglednih i kontrolne grupe nisu uočene, pa su posledično ukupni troškovi bili uvećani do 54,51% (O-IV grupa). Sagledavanjem proizvodnih rezultata brojlera, upotreba genisteina u hrani u količini od 200 do 800 mg/kg nakon produženog tova bila je manje isplativa od komercijalnog tova. S obzirom da se radi o specifičnom proizvodu, za potrebe ovog eksperimenta je kupljena mala količina ovog preparata, ukoliko bi se nabavljale veće količine i ukoliko bi cena bila dogovorena, verovatno bi cena bila i povoljnija. Izoflavoni su kao komercijalni aditivi u hrani za životinje počeli da se koriste u Kini (Zhengkang i sar., 2006).

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio je da se utvrdi mogućnost deponovanja genisteina u tkivu brojlera, pa s obzirom da je genistein bio ispod nivoa detekcije u mesu grudi brojlera, ni s ovog aspekta nema ekonomske opravdanosti suplementacije visokih doza genisteina u hrani brojlera.

Suplementacija genisteinom u ovoj doktorskoj disertaciji nije dovela do obogaćenja mesa brojlera jedinjenjem koje ostvaruje pozitivni efekat na zdravlje ljudi i imala je varijabilan efekat na proizvodne rezultate brojlera. Međutim s druge strane ostvarila je uticaj na različite parametre zdravlja brojlera (kardiovaskularni sistem, morfometriju tankog creva, mikrobiotu cekuma,



antioksidativni kapacitet, kvalitet kostiju) i prinosa i kvaliteta mesa (pH vrednost, SVV, hemijski sastav mesa, održivost i senzorske karakteristike) u različitim fazama eksperimenta koje bi trebalo uzeti u obzir pri sagledavanju ekonomičnosti proizvodnje. Na osnovu dobijenih rezultata za sve navedene parametre može se zaključiti da genistein ne bi trebalo da prelazi količinu od 400 mg/kg hrane. Međutim potrebna su dodatna istraživanja kojima bi se detaljnije potvrdila opravdanost i racionalizovala upotreba ovih doza genisteina u završnoj i produženoj fazi tova brojlera.

## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Hemijski sastav potpunih smeša za ishranu brojlera kontrolne i oglednih grupa (grupa sa dodatim genisteinom) u svim fazama konvencionalnog tova (do 42. dana-prvi period), kao i za produženi tov (do 58. dana-drugi period) nije se razlikovao, odnosno bio je izoproteinski i izoenergetski izbalansiran. Sadržaj genisteina u potpunim smešama za ishranu brojlera povećao se srazmerno povećanju dodate količine genisteina. Korišćenim testovima nije utvrđeno da dodavanje genisteina povećava antioksidativnu aktivnost hrane za brojlere.
2. Dodavanje preparata genisteina u količini od 400 i 600 mg/kg hrane rezultiralo je većom ( $P<0,05$ ) telesnom masom u odnosu na kontrolnu grupu brojlera tokom prvog perioda, s tim da navedeni trend nije uočen nakon produženog tova. Tokom prvog perioda uočen je veći ( $P<0,05$ ) ukupni i dnevni prirast kod grupa brojlera koje su putem hrane dobijale veće količine preparata genisteina (400, 600 i 800 mg/kg).
3. Grupe brojlera koje su u hrani dobijale veće količine genisteina (600 i 800 mg/kg) ostvarile su i bolju ( $P<0,05$ ) konverziju tokom prvog perioda tova u odnosu na brojlere kontrolne grupe, dok je nakon produženog tova najbolju konverziju ostvarila grupa brojlera koja je suplementirana najvećom količinom genisteina (800 mg/kg). Dodavanje preparata genisteina u hrani za brojlere nije uticalo na konzumaciju hrane.
4. Na kraju prvog perioda, kao i produženog tova, nisu utvrđene razlike u koncentraciji ukupnog serumskog holesterola oglednih i kontrolne grupe brojlera. Posle prvog perioda tova koncentracija triglicerida u krvi oglednih grupa brojlera bila je niža ( $P<0,05$ ) od koncentracije triglicerida u kontrolnoj grupi brojlera, a posle produženog tova bila je viša ( $P<0,05$ ) kod oglednih grupa koje su u hrani dobijale najveće količine (600 mg/kg, odnosno 800 mg/kg) genisteina.
5. Na kraju prvog perioda, kao i posle produženog tova, nije utvrđena razlika između prosečnih masa jetre oglednih i kontrolne grupe brojlera. Samo posle prvog perioda tova prosečna masa srca, odnosno slezine, bila je veća ( $P<0,05$ ) kod oglednih grupa brojlera. Utvrđeno je da je masa jajnika posle produženog tova bila veća ( $P<0,05$ ) kod oglednih grupa u odnosu na kontrolnu grupu brojlera.
6. Posle prvog perioda tova nije uočena razlika u sadržaju ukupnih proteina i aktivnosti enzima antioksidativne zaštite jetre, sa izuzetkom enzima GSH-Px čija aktivnost je bila manja ( $P<0,05$ ) u grupi brojlera koja je u hrani dobijala 600 mg/kg genisteina. Nakon produženog

- tova sadržaj ukupnih proteina bio je manji ( $P < 0,05$ ), a aktivnost enzima SOD, CAT i GSH-Px veća kod ogledne grupe brojlera koja je u hrani dobijala 200 mg/kg genisteina u odnosu na kontrolnu i ostale ogledne grupe brojlera.
7. U duodenumu nakon prvog perioda uočen je pozitivan efekat suplementacije genisteina u hrani oglednih grupa brojlera na visinu resice, dubinu kriпти i odnos visina resice/dubina kriпти ( $P < 0,05$ ), a nakon produženog tova ovaj efekat je uočen na dubinu kriпти i odnos visina resice/dubina kriпти ( $P < 0,05$ ). Više i šire recice, pliće kriptide i povoljniji odnos visina resice/dubina kriпти ( $P < 0,05$ ) u jejunumu utvrđen je kod brojlera koji su dobijali genistein u hrani tokom produžene faze tova. U ileumu, suplementacija genisteinom nakon oba perioda, smanjila je visinu resica i odnos visina resice/dubina kriпти ( $P < 0,05$ ), a najniže vrednosti ( $P < 0,05$ ) ovih parametra uočene su u grupi brojlera koja je dobijala 600 mg/kg genisteina.
  8. Dodavanje preparata genisteina u hrani za brojlere nije uticalo na ukupan broj BMK u cekumu nakon prvog perioda, s tim da je najmanji broj bakterija utvrđen u grupi brojlera koja je putem hrane dobijala 200 mg/kg genisteina. Nakon produženog tova, dodavanje većih količina genisteina (400, 600 i 800 mg/kg hrane) rezultiralo je većim ( $P < 0,05$ ) brojem BMK u odnosu na brojlere kontrolne grupe.
  9. Posle prvog perioda tova kod oglednih grupa brojlera utvrđena je veća ( $P < 0,05$ ) masa tibije i veći ( $P < 0,05$ ) sadržaj pepela i kalcijuma u kostima. Kod oglednih grupa brojlera, posle produženog tova, sadržaj pepela i kalcijuma u kostima bio je manji ( $P < 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu brojlera.
  10. Utvrđeno je da su ogledne grupe brojlera posle prvog perioda, kao i posle produženog tova, imale bolje ( $P < 0,05$ ) parametre prinosa mesa (masa trupa, masa grudi, masa bataka sa karabatakom i njihova zastupljenost u masi trupa).
  11. Posle prvog perioda tova pH vrednost mesa grudi brojlera oglednih grupa merena 45 minuta nakon klanja bila je viša ( $P < 0,05$ ) od pH vrednosti mesa grudi brojlera kontrolne grupe. Razlike nisu utvrđene 24 i 48 sati posle klanja ( $P > 0,05$ ). Nisu utvrđene razlike između pH vrednosti (merene 45 minuta, 24 i 48 sati posle klanja) mesa grudi oglednih i kontrolne grupe brojlera posle produženog tova. Posle prvog perioda, kao i posle produženog tova, utvrđena je veća ( $P < 0,05$ ) sposobnost vezivanja vode mesa grudi oglednih grupa brojlera.
  12. Posle prvog perioda nisu uočene razlike u hemijskom sastavu mesa grudi i karabataka između kontrolne i oglednih grupa brojlera, izuzev manjeg ( $P < 0,05$ ) sadržaja proteina i većeg ( $P < 0,05$ ) sadržaja vode u mesu grudi brojlera suplementiranih sa 600 mg/kg

genisteina. Nakon produženog tova utvrđeno je da je sadržaj proteina u mesu grudi brojlera oglednih grupa bio veći, a sadržaj vode i masti manji ( $P < 0,05$ ) u odnosu na meso grudi kontrolne grupe brojlera, dok je za isti period u mesu karabataka uočen niži ( $P < 0,05$ ) sadržaj masti u oglednim u odnosu na kontrolnu grupu brojlera.

13. Sadržaj metabolita genisteina u mesu grudi oglednih i kontrolne grupe brojlera bio je posle prvog perioda tova, kao i posle produženog tova, ispod granice kvantifikacije (5,6 nmol/kg mesa).
14. Nakon prvog perioda utvrđeno je da je sadržaj malondialdehida u mesu karabataka grupa suplementiranih sa 400 i 800 mg/kg genisteina bio manji ( $P < 0,05$ ) posle tri, šest, odnosno devet meseci skladištenja zamrzavanjem nego u mesu karabataka kontrolne grupe brojlera, dok nakon produženog tova, za iste intervale skladištenja, sadržaj malondialdehida bio je niži ( $P < 0,05$ ) u mesu karabataka svih oglednih grupa u odnosu na kontrolnu grupu brojlera.
15. Senzorskom analizom je utvrđeno da je meso grudi i bataka sa karabatakom grupa brojlera koje su u hrani dobijale genistein bilo bolje ocenjeno ( $P < 0,05$ ) za mekoću i sočnost. Najviše ocene ( $P < 0,05$ ) za prihvatljivost dobile su grupe suplementirane sa 600 i 800 mg/kg genisteina nakon prvog perioda tova, i grupe suplementirane sa 400 i 800 mg/kg genisteina nakon produženog tova.
16. Dodavanje genisteina u hrani brojlera povećalo je troškove hrane, ukupne troškove i vrednost proizvodnje. Finansijski rezultat je bio pozitivan za prvi period, a negativan za produženi tov brojlera svih oglednih grupa. Posle prvog perioda najmanji koeficijent ekonomičnosti utvrđen je kod grupe brojlera koja je u hrani dobijala 800 mg/kg genisteina, a nakon produženog tova kod grupe brojlera koja je dobijala 600 mg/kg genisteina u hrani.

**8. SPISAK LITERATURE:**

1. Acamovic, T., & Brooker, J. D. (2005). Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the nutrition society*, 64(3), 403-412.
2. Ajdžanović, V., Spasojević, I., Filipović, B., Šošić-Jurjević, B., Sekulić, M., & Milošević, V. (2010). Effects of genistein and daidzein on erythrocyte membrane fluidity: an electron paramagnetic resonance study. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 88(4), 497-500.
3. Akdemir, F., & Sahin, K. (2009). Genistein supplementation to the quail: effects on egg production and egg yolk genistein, daidzein, and lipid peroxidation levels. *Poultry science*, 88(10), 2125-2131.
4. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S. I., Itoh, N., M., Shibuya, & Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of biological chemistry*, 262(12), 5592-5595.
5. Akşit, M., Yalcin, S., Özkan, S., Metin, K., & Özdemir, D. (2006). Effects of temperature during rearing and crating on stress parameters and meat quality of broilers. *Poultry science*, 85(11), 1867-1874.
6. Ali, A. A., Velasquez, M. T., Hansen, C. T., Mohamed, A. I., & Bhatena, S. J. (2004). Effects of soybean isoflavones, probiotics, and their interactions on lipid metabolism and endocrine system in an animal model of obesity and diabetes. *The journal of nutritional biochemistry*, 15(10), 583-590.
7. Alipour, F., Moghadam, H. N., & Kermanshahi, H. (2012). Immune responses to genestein in male broiler chicks. *Journal of applied animal research*, 40(1), 26-30.
8. Alvarez, M. A., Debattista, N. B., & Pappano, N. B. (2008). Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. *Folia microbiologica*, 53(23). <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0003-4>
9. Amad, A. A., Männer, K., Wendler, K. R., Neumann, K., & Zentek, J. (2011). Effects of a phytogetic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. *Poultry science*, 90(12), 2811-2816.
10. Anderson, J. J. B., Ambrose, W. W., & Garner, S. C. (1998). Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 217(3), 345-350.
11. Anderson, J. J., Anthony, M., Messina, M., & Garne, S. C. (1999). Effects of phyto-oestrogens on tissues. *Nutrition research reviews*, 12(1), 75-116.

12. Anderson, J. W., Johnstone, B. M., & Cook-Newell, M. E. (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *The New England journal of medicine*, 333, 276.
13. Andrade, J. C., Mandarino, J. M. G., Kurozawa, L. E., & Ida, E. I. (2016). The effect of thermal treatment of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of trypsin inhibitors. *Food chemistry*, 194, 1095-1101.
14. Andres, A., Donovan, S. M., & Kuhlenschmidt, M. S. (2009). Soy isoflavones and virus infections. *The journal of nutritional biochemistry*, 20(8), 563-569.
15. Anon. (1988). Pravilnik o kvalitetu mesa pernate živine ("Službeni list SFRJ", br. 1/81 i 51/88).
16. Anon. (2012). Cobb broiler management guide. Cobb-Vantress, Siloam Springs, AR, USA. <https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/product-guides/bdc20a5443/70dec630-0abf-11e9-9c88-c51e407c53ab.pdf>
17. Anon. (2017). Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje ("Službeni glasnik RS", br. 4/2010, 113/2012, 27/2014, 25/2015 i 54/2017).
18. Anthony, M. S. (2000). Soy and cardiovascular disease: cholesterol lowering and beyond. *The journal of nutrition*, 130(3), 662-663.
19. Anthony, M. S., Clarkson, T. B., & Williams, J. K. (1998). Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *The American journal of clinical nutrition*, 68(6), 1390-1393.
20. Aptekmann, K. P., Artoni, S. B., Stefanini, M. A., & Orsi, M. A. (2001). Morphometric analysis of the intestine of domestic quails (*Coturnix coturnix japonica*) treated with different levels of dietary calcium. *Anatomia, histologia, embryologia*, 30(5), 277-280.
21. Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaka, H., Akimoto, M., Kanai, S., & Miki, T. (1998). *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *Journal of food science*, 63(3), 544-547.
22. Arjmandi, B. H., Khalil, D. A., & Hollis, B. W. (2002). Soy protein: its effects on intestinal calcium transport, serum vitamin D, and insulin-like growth factor-I in ovariectomized rats. *Calcified tissue international*, 70(6), 483-487.
23. Arteaga, E., Villaseca, P., Rojas, A., Marshall, G., & Bianchi, M. (2004). Phytoestrogens possess a weak antioxidant activity on low density lipoprotein in contrast to the flavonoid quercetin *in vitro* in postmenopausal women. *Climacteric*, 7(4), 397-403.
24. Atkinson, C., Frankenfeld, C. L., & Lampe, J. W. (2005). Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Experimental biology and medicine*, 230(3), 155-170.

25. Awad, W. A., Ghareeb, K., & Böhm, J. (2011). Evaluation of the chicory inulin efficacy on ameliorating the intestinal morphology and modulating the intestinal electrophysiological properties in broiler chickens. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 95(1), 65-72.
26. Awad, Y. L., El-Bagouri, A. M., & Mohamed, O. E. (1983). Detection of rancidity in practical poultry diets and related production problems. In *Proceeding of the 16th Arab Veterinary Medical Conference, Cairo (Egypt), 19-24 Mar 1983*. The Egyptian Veterinary Medical Association.
27. Barbut, S., Zhang, L., & Marcone, M. (2005). Effects of pale, normal, and dark chicken breast meat on microstructure, extractable proteins, and cooking of marinated fillets. *Poultry science*, 84(5), 797-802.
28. Barnes, S. (2003). Phyto-oestrogens and osteoporosis: what is a safe dose?. *British journal of nutrition*, 89(S1), 101-108.
29. Barnes, S. (2004). Soy isoflavones-phytoestrogens and what else?. *The journal of nutrition*, 134(5), 1225-1228.
30. Barnes, S., Kim, H., Darley-Usmar, V., Patel, R., Xu, J., Boersma, B., & Luo, M. (2000). Beyond ER $\alpha$  and ER $\beta$ : estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *The journal of nutrition*, 130(3), 656-657.
31. Barnes, S., Peterson, G., Grubbs, C., & Setchell, K. (1994). Potential role of dietary isoflavones in the prevention of cancer. In *Diet and Cancer*. Springer, Boston, MA, 135-147.
32. Barroeta, A. C. (2007). Nutritive value of poultry meat: relationship between vitamin E and PUFA. *World's poultry science journal*, 63(2), 277-284.
33. Batista, L. S., Garcia, E. A., Faitarone, A. B. G., Sherer, M. R., Mori, C., Pelicia, K., & Pizzolante, C. C. (2007). Flavonoids and mannanoligosaccharides in broiler diets. *Brazilian journal of poultry science*, 9(1), 33-37.
34. Bech-Larsen, T., & Grunert, K. G. (2003). The perceived healthiness of functional foods: A conjoint study of Danish, Finnish and American consumers' perception of functional foods. *Appetite*, 40(1), 9-14.
35. Beers, R. F., & Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The journal of biological chemistry*, 195(1), 133-140.
36. Benkouider, C. (2004). Functional foods: A global overview. *International food ingredients*, 5, 66-68.

37. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
38. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*, 299, 15-27.
39. Bhatena, S. J., & Velasquez, M. T. (2002). Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *The American journal of clinical nutrition*, 76(6), 1191-1201.
40. Bingham, S. (2006). The fibre-folate debate in colo-rectal cancer. *Proceedings of the nutrition society*, 65(1), 19-23.
41. Blair, H. C., Jordan, S. E., Peterson, T. G., & Barnes, S. (1996). Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *Journal of cellular biochemistry*, 61(4), 629-637.
42. Borradaile, N. M., Carroll, K. K., & Kurowska, E. M. (1999). Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids*, 34(6), 591-598.
43. Bošković, M., Baltić, M. Ž., Ivanović, J., Đurić, J., Dokmanović, M., Marković, R., Šarčević, D., & Baltić, T. (2015). Uticaj svinjskog mesa i masti na zdravlje ljudi. *Tehnologija mesa*, 56(1), 8-15.
44. Boskovic, M., Glisic, M., Djordjevic, J., & Baltic, M. Z. (2019). Nanotechnology and plant extracts as a future control strategy for meat and milk products. In *Plant nanobionics*. Springer, Cham, 201-253.
45. Bourne, L. C., & Rice-Evans, C. A. (1999). Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: Pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. *Methods in enzymology*, 299, 91-106.
46. Branca, F. (2003). Dietary phyto-oestrogens and bone health. *Proceedings of the nutrition society*, 62(4), 877-887.
47. Branković Lazić, I. M. (2015). *Uticaj primene konjugovane linolne kiseline na proizvodne rezultate i kvalitet mesa brojlera*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
48. Brodowska, K. M. (2017). Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European journal of biological research*, 7(2), 108-123.
49. Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S., & Kroh, L. W. (2006). Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid communications in mass spectrometry: An*



- international journal devoted to the rapid dissemination of up-to-the-minute research in mass spectrometry*, 20(21), 3229-3235.
50. Burdock, G. A., Carabin, I. G., & Griffiths, J. C. (2006). The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. *Toxicology*, 221(1), 17-27.
  51. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
  52. Cai, Q., & Wei, H. (1996). Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutrition and cancer*, 25(1), 1-7.
  53. Caro, D., Davis, S. J., Bastianoni, S., & Caldeira, K. (2017). Greenhouse gas emissions due to meat production in the last fifty years. In *Quantification of climate variability, adaptation and mitigation for agricultural sustainability*, Springer, Cham., 27-37.
  54. Cassidy. (2003). Potential risks and benefits of phytoestrogen-rich diets. *International journal for vitamin and nutrition research*, 73(2), 120-126.
  55. Cavallini, D. C., Bedani, R., Bomdespacho, L. Q., Vendramini, R. C., & Rossi, E. A. (2009). Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: a randomized double-blind study. *Lipids in health and disease*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1476-511X-8-1>
  56. Cederroth, C. R., Zimmermann, C., & Nef, S. (2012). Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and cellular endocrinology*, 355(2), 192-200.
  57. Chang, H. C., Churchwell, M. I., Delclos, K. B., Newbold, R. R., & Doerge, D. R. (2000). Mass spectrometric determination of genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *The journal of nutrition*, 130(8), 1963-1970.
  58. Chang, Y. C., Nair, M. G., & Nitiss, J. L. (1995). Metabolites of daidzein and genistein and their biological activities. *Journal of natural products*, 58(12), 1901-1905.
  59. Chen, A. C., Berhow, M. A., Tappenden, K. A., & Donovan, S. M. (2005). Genistein inhibits intestinal cell proliferation in piglets. *Pediatric research*, 57(2), 192-200.
  60. Chen, C. Y. (2001). *Soybean isoflavones modulated antioxidant defense systems and decreased lipid peroxidation in rats and humans*. PhD. Diss. Univ. Virginia Polytechnic Inst. State Univ, Blacksburg.
  61. Chen, C. Y., & Bakhiet, R. M. (2006). Age decreased steady-state concentrations of genistein in plasma, liver, and skeletal muscle in Sprague–Dawley rats. *Mechanisms of ageing and development*, 127(4), 344-348.
  62. Chen, C., Zheng, H., & Qi, S. (2019). Genistein and silicon synergistically protects against ovariectomy-induced bone loss through upregulating OPG/RANKL ratio. *Biological trace element research*, 188(2), 441-450.

63. Chen, S. E., McMurtry, J. P., & Walzem, R. L. (2006). Overfeeding-induced ovarian dysfunction in broiler breeder hens is associated with lipotoxicity. *Poultry science*, 85(1), 70-81.
64. Chien, J. T., Hsieh, H. C., Kao, T. H., & Chen, B. H. (2005). Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. *Food chemistry*, 91(3), 425-434.
65. Chin, K. B., Keeton, J. T., Miller, R. K., Longnecker, M. T., & Lamkey, J. W. (2000). Evaluation of konjac blends and soy protein isolate as fat replacements in low-fat bologna. *Journal of food science*, 65(5), 756-763.
66. Choi, C., Cho, H., Park, J., Cho, C., & Song, Y. (2003). Suppressive effects of genistein on oxidative stress and NFκB activation in RAW 264.7 macrophages. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(9), 1916-1922.
67. Choi, J. S., & Song, J. (2009). Effect of genistein on insulin resistance, renal lipid metabolism, and antioxidative activities in ovariectomized rats. *Nutrition*, 25(6), 676-685.
68. Chou, R. L., Her, B. Y., Su, M. S., Hwang, G., Wu, Y. H., & Chen, H. Y. (2004). Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 229(1-4), 325-333.
69. Clavel, T., Fallani, M., Lepage, P., Levenez, F., Mathey, J., Rochet, V., Sérézat, M., Sutren, M., Henderson, G., Bennetau-Pelissero, C., Tondu, F., Blaut, M., Doré, J., & Coxam, V. (2005). Isoflavones and functional foods alter the dominant intestinal microbiota in postmenopausal women. *The journal of nutrition*, 135(12), 2786-2792.
70. Cook, D. R. (1998). *The effect of dietary soybean isoflavones on the rate and efficiency of growth and carcass muscle content in pigs and rats*. Retrospective Teses and Dissertations, Iowa State University, USA. Paper 11915.
71. Coward, L., Smith, M., Kirk, M., & Barnes, S. (1998). Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *The American journal of clinical nutrition*, 68(6), 1486-1491.
72. Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343-356.
73. Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 38(2), 99-107.
74. Dang, Z. C. (2009). Dose-dependent effects of soy phyto-oestrogen genistein on adipocytes: mechanisms of action. *Obesity reviews*, 10(3), 342-349.
75. Davies, H. L., & Hill, J. L. (1989). The effect of diet on the metabolism in sheep of the tritiated isoflavones formononetin and biochanin A. *Australian journal of agricultural research*, 40(1), 157-163.

76. Déchaud, H., Ravard, C., Claustrat, F., de la Perrière, A. B., & Pugeat, M. (1999). Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG) 1. *Steroids*, 64(5), 328-334.
77. Decker, E. A., & Park, Y. (2010). Healthier meat products as functional foods. *Meat science*, 86(1), 49-55.
78. Dewell, A., Hollenbeck, C. B., & Bruce, B. (2002). The effects of soy-derived phytoestrogens on serum lipids and lipoproteins in moderately hypercholesterolemic postmenopausal women. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, 87(1), 118-121.
79. Dhayakaran, R. P. A., Neethirajan, S., Xue, J., & Shi, J. (2015). Characterization of antimicrobial efficacy of soy isoflavones against pathogenic biofilms. *LWT-Food science and technology*, 63(2), 859-865.
80. Ding, W., Chen, X., Li, W., Fu, Z., & Shi, J. (2017). Genistein protects genioglossus myoblast against hypoxia-induced injury through PI3K-Akt and ERK MAPK pathways. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
81. Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., & Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: Concensus document. *British journal of nutrition*, 81(1), 1-27.
82. Dixon, R.A. & Ferreira, D. (2002). Molecules of Interest: Genistein. *Phytochemistry*, 60, 205-211.
83. Douglas, M. W., & Parsons, C. M. (2000). Effect of presolvent extraction processing method on the nutritional value of soybean meal for chicks. *Poultry science*, 79(11), 1623-1626.
84. Drljačić, A. P. (2013). *Uticaj primene različitih količina organskog selena na proizvodne rezultate i kvalitet mesa brojlera*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
85. D'Souza, N., Skonberg, D. I., Camire, M. E., Guthrie, K. E., Malison, J., & Lima, L. (2005). Influence of dietary genistein levels on tissue genistein deposition and on the physical, chemical, and sensory quality of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(9), 3631-3636.
86. Durmic, Z., & Blache, D. (2012). Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Animal feed science and technology*, 176(1-4), 150-162.
87. Durrani, F. R., Sultan, A., Ahmed, S., Chand, N., Khattak, F. M., & Durrani, Z. (2007). Efficacy of aniseed extract as immune stimulant and growth promoter in broiler chicks. *Pakistan journal of biological sciences*, 10(20), 3718-3721.

88. Edwards, R. (1996). Characterisation of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*Pisum sativum*). *Physiologia plantarum*, 98(3), 594-604.
89. Eisenbrand, G. (2007). Isoflavones as phytoestrogens in food supplements and dietary foods for special medical purposes. Opinion of the Senate Commission on Food Safety (SKLM) of the German Research Foundation (DFG)-(shortened version). *Molecular nutrition & food research*, 51(10), 1305-1312.
90. Emami, N. K., Samie, A., Rahmani, H. R., & Ruiz-Feria, C. A. (2012). The effect of peppermint essential oil and fructooligosaccharides, as alternatives to virginiamycin, on growth performance, digestibility, gut morphology and immune response of male broilers. *Animal feed science and technology*, 175(1-2), 57-64.
91. Engberg, R. M., Lauridsen, C., Jensen, S. K., & Jakobsen, K. (1996). Inclusion of oxidized vegetable oil in broiler diets. Its influence on nutrient balance and on the antioxidative status of broilers. *Poultry science*, 75(8), 1003-1011.
92. FAO. (2019). Meat market review, March 2019. Rome. <http://www.fao.org/3/ca3880en/ca3880en.pdf>
93. FAO. (2020). Gateway to poultry production and products. <http://www.fao.org/poultry-production-products/production/en/>
94. Farrell, D. (2013). Poultry development review. The role of poultry in human nutrition. Food and Agriculture Organization (FAO). <http://www.fao.org/3/i3531e/i3531e.pdf#page=8>
95. Faustman, C., & Cassens, R. G. (1989). Strategies for improving fresh meat colour. In: Proceedings of the 35th International Congr. Meat Science and Technology. Copenhagen, Denmark. 446-453
96. Faustman, C., Sun, Q., Mancini, R., & Suman, S. P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat science*, 86(1), 86-94.
97. Fellenberg, M. A., & Speisky, H. (2006). Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. *World's poultry science journal*, 62(1), 53-70.
98. Fern, E. (2007, May). Marketing of functional foods: A point of view of the industry. In *International developments in science & health claims, ILSI international symposium on functional foods in Europe*.
99. Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-General subjects*, 1721(1-3), 174-184.
100. Fitzpatrick, L. A. (2008). Reprint of Soy isoflavones: hope or hype?. *Maturitas*, 61(1-2), 132-140.

101. Fletcher, D. L. (2002). Poultry meat quality. *World's poultry science journal*, 58(2), 131-145.
102. Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., & Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(3), 1035-1040.
103. Friedman, M. (1997). Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(5), 1523-1540.
104. Fukutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T., & Wakabayashi, K. (1996). Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food and chemical toxicology*, 34(5), 457-461.
105. Ganai, A. A., & Farooqi, H. (2015). Bioactivity of genistein: A review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 76, 30-38.
106. Ganai, A. A., Khan, A. A., Malik, Z. A., & Farooqi, H. (2015). Genistein modulates the expression of NF- $\kappa$ B and MAPK (p-38 and ERK1/2), thereby attenuating d-Galactosamine induced fulminant hepatic failure in Wistar rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 283(2), 139-146.
107. Ganchrow, J. R., & Ganchrow, D. (1987). Taste bud development in chickens (*Gallus gallus domesticus*). *The anatomical record*, 218(1), 88-93.
108. Gao, F., Zhou, G. H., & Han, Z. K. (2000). Effects of daidzein on male chicken performance and systemic immune functions. *Journal of chinese poultry science*, 22, 8-9.
109. Gao, Y. H., & Yamaguchi, M. (1998). Zinc enhancement of genistein's anabolic effect on bone components in elderly female rats. *General pharmacology: The vascular system*, 31(2), 199-202.
110. Gatta, D., Russo, C., Giuliotti, L., Mannari, C., Picciarelli, P., Lombardi, L., Giovannini, L., Ceccarelli, N., & Mariotti, L. (2013). Influence of partial replacement of soya bean meal by faba beans or peas in heavy pigs diet on meat quality, residual anti-nutritional factors and phytoestrogen content. *Archives of animal nutrition*, 67(3), 235-247.
111. Gessner, D. K., Ringseis, R., & Eder, K. (2017). Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 101(4), 605-628.
112. Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X. I. N., & Cummings, J. H. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 108(4), 975-982.

113. Giles, D., & Wei, H. (1997). Effect of structurally related flavones/isoflavones on hydrogen peroxide production and oxidative DNA damage in phorbol ester-stimulated HL-60 cells. *Nutrition and cancer*, 29(1), 77-82.
114. Giray, B., Gürbay, A., & Hincal, F. (2001). Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicology letters*, 118(3), 139-146.
115. Gjorgovska, N., & Kiril, F. (2013). Transfer of daidzein and genistein from feed into the egg yolk of hens. *Journal of animal and feed sciences*, 22(2), 144-148.
116. Gjorgovska, N., Filev, K., Levkov, V., Nastova, R., & Jusufi, E. (2016). Effects of dietary supplementation with isoflavones on exterior development and tibia bone quality of laying hens. *Slovak journal of animal science*, 49(3), 112-115.
117. Goliomytis, M., Kartsonas, N., Charismiadou, M. A., Symeon, G. K., Simitzis, P. E., & Deligeorgis, S. G. (2015). The influence of naringin or hesperidin dietary supplementation on broiler meat quality and oxidative stability. *PloS one*, 10(10), e0141652.
118. Goliomytis, M., Tsourekis, D., Simitzis, P. E., Charismiadou, M. A., Hager-Theodorides, A. L., & Deligeorgis, S. G. (2014). The effects of quercetin dietary supplementation on broiler growth performance, meat quality, and oxidative stability. *Poultry science*, 93(8), 1957-1962.
119. Gornall, A.G., Bardawill, C.S., & David, M.M. (1949). *The journal of biological chemistry*, 177, 751.
120. Graham, T. L., Kim, J. E., & Graham, M. Y. (1990). Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. *Molecular plant-microbe interactions*, 3, 157-166.
121. Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. D. A. F., & Shah, N. P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(5), 455-470.
122. Grashorn, M. A. (2007). Functionality of poultry meat. *Journal of applied poultry research*, 16(1), 99-106.
123. Greendale, G. A., FitzGerald, G., Huang, M. H., Sternfeld, B., Gold, E., Seeman, T., Sherman, S., & Sowers, M. (2002). Dietary soy isoflavones and bone mineral density: results from the study of women's health across the nation. *American journal of epidemiology*, 155(8), 746-754.
124. Greiner, L. L., Stahly, T. S., & Stabel, T. J. (2001). The effect of dietary soy genistein on pig growth and viral replication during a viral challenge. *Journal of animal science*, 79(5), 1272-1279.

125. Griggs, J. P., & Jacob, J. P. (2005). Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *Journal of applied poultry research*, 14(4), 750-756.
126. Gu, L., House, S. E., Prior, R. L., Fang, N., Ronis, M. J., Clarkson, T. B., Wilson, M. E., & Badger, T. M. (2006). Metabolic phenotype of isoflavones differ among female rats, pigs, monkeys, and women. *The journal of nutrition*, 136(5), 1215-1221.
127. Hanganu, D., Olah, N. K., Benedec, D., Mocan, A., Crisan, G., Vlase, L., Popika, I., & Oniga, I. (2016). Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of *Genista tinctoria* L. and *Genistella sagittalis* (L.) Gams (*Fabaceae*). *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 29, 301-307.
128. Harris, H. A., Bapat, A. R., Gonder, D. S., & Frail, D. E. (2002). The ligand binding profiles of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  are species dependent. *Steroids*, 67(5), 379-384.
129. Hashemi, S. R., & Davoodi, H. (2010). Phyto-genics as new class of feed additive in poultry industry. *Journal of animal and veterinary advances*, 9(17), 2295-2304.
130. Havenstein, G. B., Ferket, P. R., & Qureshi, M. A. (2003). Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry science*, 82(10), 1509-1518.
131. Havenstein, G. B., Ferket, P. R., Scheideler, S. E., & Rives, D. V. (1994). Carcass composition and yield of 1991 vs 1957 broilers when fed "typical" 1957 and 1991 broiler diets. *Poultry science*, 73(12), 1795-1804.
132. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
133. Hilliam, M. (1998). The market for functional foods. *International dairy journal*, 8(5-6), 349-353.
134. Hong, H., Landauer, M. R., Foriska, M. A., & Ledney, G. D. (2006). Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein. *Journal of basic microbiology*, 46(4), 329-335.
135. Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat science*, 49(4), 447-457.
136. <https://www.statista.com/statistics/252803/global-functional-food-sales>
137. Hu, Z., & Guo, Y. (2007). Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens. *Animal feed science and technology*, 132(3-4), 240-249.
138. Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat science*, 71(1), 194-204.

139. Iqbal, M. F., Khan, R. N. A., Malik, M. H., Ahmad, T., Mian, A. A., Ishaq, K., & Rehman, A. (2013). Formononetin influences growth and immune responses in broilers. *Pakistan journal of zoology*, 45(4), 1015-1020.
140. Iqbal, M. F., Yu-Heng, L., Malik, M. H., & Wei-Yun, Z. (2014). Evaluation of genistein mediated growth, metabolic and anti-inflammatory responses in broilers. *Pakistan journal of zoology*, 46(2), 317-327.
141. Iqbal, M., Cawthon, D., Beers, K., Wideman Jr, R. F., & Bottje, W. G. (2002). Antioxidant enzyme activities and mitochondrial fatty acids in pulmonary hypertension syndrome (PHS) in broilers. *Poultry science*, 81(2), 252-260.
142. Irina, I., & Mohamed, G. (2012). Biological activities and effects of food processing on flavonoids as phenolic antioxidants. *Advances in applied biotechnology*, 101-124.
143. Ito, Y., Ichikawa, T., Iwai, T., Saegusa, Y., Ikezawa, T., Goso, Y., & Ishihara, K. (2008). Effects of tea catechins on the gastrointestinal mucosa in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(24), 12122-12126.
144. Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kubota, Y., & Kikuchi, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *The journal of nutrition*, 130(7), 1695-1699.
145. Jajić, I., Jurić, V., & Glamović, D. (2006). Laboratorijski testovi u službi kontrole kvaliteta termičke obrade soje. *Savremena poljoprivreda*, 55(5), 57-64.
146. Jha, H. C., von Recklinghausen, G., & Zilliken, F. (1985). Inhibition of *in vitro* microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. *Biochemical pharmacology*, 34(9), 1367-1369.
147. Ji, G., Yang, Q., Hao, J., Guo, L., Chen, X., Hu, J., Leng, L., & Jiang, Z. (2011). Anti-inflammatory effect of genistein on non-alcoholic steatohepatitis rats induced by high fat diet and its potential mechanisms. *International immunopharmacology*, 11(6), 762-768.
148. Jiang, S. Q., Jiang, Z. Y., Lin, Y. C., Xi, P. B., & Ma, X. Y. (2007c). Effects of soy isoflavone on performance, meat quality and antioxidative property of male broilers fed oxidized fish oil. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 20(8), 1252-1257.
149. Jiang, S. Q., Jiang, Z. Y., Zhou, G. L., Lin, Y. C., & Zheng, C. T. (2014). Effects of dietary isoflavone supplementation on meat quality and oxidative stability during storage in lingnan yellow broilers. *Journal of integrative agriculture*, 13(2), 387-393.
150. Jiang, S., Jiang, Z., Wu, T., Ma, X., Zheng, C., & Zou, S. (2007a). Protective effects of a synthetic soybean isoflavone against oxidative damage in chick skeletal muscle cells. *Food chemistry*, 105(3), 1086-1090.



151. Jiang, Z. Y., Jiang, S. Q., Lin, Y. C., Xi, P. B., Yu, D. Q., & Wu, T. X. (2007b). Effects of soybean isoflavone on growth performance, meat quality, and antioxidation in male broilers. *Poultry science*, 86(7), 1356-1362.
152. Kajiya, H., Okabe, K., Okamoto, F., Tsuzuki, T., & Soeda, H. (2000). Protein tyrosine kinase inhibitors increase cytosolic calcium and inhibit actin organization as resorbing activity in rat osteoclasts. *Journal of cellular physiology*, 183(1), 83-90.
153. Kalaskar, M. G., & Surana, S. J. (2014). Free radical scavenging, immunomodulatory activity and chemical composition of *Luffa acutangula* var: *Amara* (Cucurbitaceae) Pericarp. *Journal of the chilean chemical society*, 59(1), 2299-2302.
154. Kamboh, A. A., & Zhu, W. Y. (2013a). Individual and combined effects of genistein and hesperidin supplementation on meat quality in meat-type broiler chickens. *Journal of the science of food and agriculture*, 93(13), 3362-3367.
155. Kamboh, A. A., & Zhu, W. Y. (2013c). Effect of increasing levels of bioflavonoids in broiler feed on plasma anti-oxidative potential, lipid metabolites, and fatty acid composition of meat. *Poultry science*, 92(2), 454-461.
156. Kamboh, A. A., & Zhu, W. Y. (2014). Individual and combined effects of genistein and hesperidin on immunity and intestinal morphometry in lipopolysaccharide-challenged broiler chickens. *Poultry science*, 93(9), 2175-2183.
157. Kamboh, A. A., Arain, M. A., Mughal, M. J., Zaman, A., Arain, Z. M., & Soomro, A. H. (2015). Flavonoids: health promoting phytochemicals for animal production-a review. *Journal of animal health and production*, 3(1), 6-13.
158. Kamboh, A. A., Hang, S. Q., Bakhetgul, M., & Zhu, W. Y. (2013b). Effects of genistein and hesperidin on biomarkers of heat stress in broilers under persistent summer stress. *Poultry science*, 92(9), 2411-2418.
159. Kamboh, A. A., Hang, S. Q., Khan, M. A., & Zhu, W. Y. (2016). *In vivo* immunomodulatory effects of plant flavonoids in lipopolysaccharide-challenged broilers. *Animal*, 10(10), 1619-1625.
160. Kamboh, A. A., Leghari, R. A., Khan, M. A., Kaka, U., Naseer, M., Sazili, A. Q., & Malhi, K. K. (2019). Flavonoids supplementation-An ideal approach to improve quality of poultry products. *World's poultry science journal*, 75(1), 115-126.
161. Kamboh, A. A., Memon, A. M., Mughal, M. J., Memon, J., & Bakhetgul, M. (2018). Dietary effects of soy and citrus flavonoid on antioxidation and microbial quality of meat in broilers. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 102(1), 235-240.
162. Kapoor, N., Narain, U., & Misra, K. (2007). Bio-active conjugates of curcumin having ester, peptide, thiol and disulfide links. *Journal of scientific and industria research*, 66, 647-650.

163. Kapuscinska, A., & Nowak, I. (2015). The use of phytoestrogens in anti-ageing cosmetics. *Chemik science*, 69(3), 154-159.
164. Kariyil, B. J. (2010). Phytoestrogens in Animal Origin Foods. *Veterinary world*, 3(1), 43-45.
165. Kasim, W. Y., Alshaheen, A. S., & AL-Asadi, M. H. (2014). The effect of genistein on some productive and biochemical blood traits of quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Basrah journal of veterinary research.*, 13(1), 60-69.
166. Khalaji, S., Zaghari, M., Ganjkanloo, M., & Ghaziani, F. (2013). Arginine, soy isoflavone and hydroxypropylmethylcellulose have protective effects against obesity in broiler breeder hens fed on high-energy diets. *British poultry science*, 54(6), 766-779.
167. Khan, M. I., Arshad, M. S., Anjum, F. M., Sameen, A., & Gill, W. T. (2011). Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. *Food research international*, 44(10), 3125-3133.
168. Kim, M. H., Kang, K. S., & Lee, Y. S. (2010). The inhibitory effect of genistein on hepatic steatosis is linked to visceral adipocyte metabolism in mice with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *British journal of nutrition*, 104(9), 1333-1342.
169. King, T., Cole, M., Farber, J. M., Eisenbrand, G., Zabaras, D., Fox, E. M., & Hill, J. P. (2017). Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety. *Trends in food science & technology*, 68, 160-175.
170. King, T., Osmond-McLeod, M. J., & Duffy, L. L. (2018). Nanotechnology in the food sector and potential applications for the poultry industry. *Trends in food science & technology*, 72, 62-73.
171. Klose, V., Neureiter, M., Mohnl, M., Danner, H., & Donat, C. (2010). Microbial antagonists in animal health promotion and plant protection. In *Microbes at Work*, Springer, Berlin, Heidelberg, 193-211.
172. Kruk, I., Aboul-Enein, H. Y., Michalska, T., Lichszeld, K., & Kładna, A. (2005). Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*, 20(2), 81-89.
173. Kudou, S., Fleury, Y., Welti, D., Magnolato, D., Uchida, T., Kitamura, K., & Okubo, K. (1991). Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agricultural and biological chemistry*, 55(9), 2227-2233.
174. Kuhn, G., Hennig, U., Kalbe, C., Rehfeldt, C., Ren, M. Q., Moors, S., & Degen, G. H. (2004). Growth performance, carcass characteristics and bioavailability of isoflavones in pigs fed soy bean based diets. *Archives of animal nutrition*, 58(4), 265-276.
175. Kuhnle, G. G., Dell'Aquila, C., Aspinall, S. M., Runswick, S. A., Mulligan, A. A., & Bingham, S. A. (2008). Phytoestrogen content of foods of animal origin: dairy products,

- eggs, meat, fish, and seafood. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(21), 10099-10104.
176. Kurzer, M. S., & Xu, X. (1997). Dietary phytoestrogens. *Annual review of nutrition*, 17(1), 353-381.
177. Kusunoki, T., Higashi, H., Hosoi, S., Hata, D., Sugie, K., Mayumi, M., & Mikawa, H. (1992). Tyrosine phosphorylation and its possible role in superoxide production by human neutrophils stimulated with FMLP and IgG. *Biochemical and biophysical research communications*, 183(2), 789-796.
178. Laparra, J. M., & Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological research*, 61(3), 219-225.
179. Lawrie, R. A. (1991). Meat Science. 6th. edition, Woodhead Publishing, Cambridge, UK, 1-85573.
180. Le Bihan-Duval, E., Debut, M., Berri, C. M., Sellier, N., Santé-Lhoutellier, V., Jégo, Y., & Beaumont, C. (2008). Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC genetics*, 9(1), 53.
181. Lee, D. W., Shin, J. H., Park, J. M., Song, J. C., Suh, H. J., Chang, U. J., An, B. K., Kang, C. W., & Kim, J. M. (2010). Growth performance and meat quality of broiler chicks fed germinated and fermented soybeans. *Food science of animal resources*, 30(6), 938-945.
182. Lee, H. C., Jenner, A. M., Low, C. S., & Lee, Y. K. (2006). Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in microbiology*, 157(9), 876-884.
183. Lee, J. H., Lee, B. W., Kim, B., Kim, H. T., Ko, J. M., Baek, I. Y., Seo, W. T., Kang, Y. M., & Cho, K. M. (2013). Changes in phenolic compounds (isoflavones and phenolic acids) and antioxidant properties in high-protein soybean (*Glycine max* L., cv. Saedanbaek) for different roasting conditions. *Journal of the korean society for applied biological chemistry*, 56(5), 605-612.
184. Lee, S., & Lee, J. (2009). Effects of oven-drying, roasting, and explosive puffing process on isoflavone distributions in soybeans. *Food chemistry*, 112(2), 316-320.
185. Li, C., Wu, J., Zhang, N., Zhang, S., Liu, J., Li, J., Li, H., Feng, X., Han, Y., Zhu, Z., Xu, X., & Zhou, G. (2009). Effects of boning method and postmortem aging on meat quality characteristics of pork loin. *Animal science journal*, 80(5), 591-596.
186. Liao, X. D., Wen, Q., Zhang, L. Y., Lu, L., Zhang, L. Y., & Luo, X. G. (2018). Effect of dietary supplementation with flavonoid from *Scutellaria baicalensis* Georgi on growth performance, meat quality and antioxidative ability of broilers. *Journal of integrative agriculture*, 17(5), 1165-1170.

187. Lien, T. F., Yeh, H. S., & Su, W. T. (2008). Effect of adding extracted hesperetin, naringenin and pectin on egg cholesterol, serum traits and antioxidant activity in laying hens. *Archives of animal nutrition*, 62(1), 33-43.
188. Lin, F., Wu, J., Abdelnabi, M. A., Ottinger, M. A., & Giusti, M. M. (2004). Effects of dose and glycosylation on the transfer of genistein into the eggs of the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(8), 2397-2403.
189. Liu, H. N., Liu, Y., Hu, L. L., Suo, Y. L., Zhang, L., Jin, F., Feng, X. A., Teng, N., & Li, Y. (2014). Effects of dietary supplementation of quercetin on performance, egg quality, cecal microflora populations, and antioxidant status in laying hens. *Poultry science*, 93(2), 347-353.
190. Lokaewmanee, K., Yamauchi, K., & Thongwittaya, N. (2012). Effects of fermented plant product on growth performance, some blood variables, carcass characteristics, and intestinal histology in broilers. *British poultry science*, 53(2), 215-223.
191. Lopez-Garcia, E., Schulze, M. B., Manson, J. E., Meigs, J. B., Albert, C. M., Rifai, N., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2004). Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *The journal of nutrition*, 134(7), 1806-1811.
192. Luciano, G., Monahan, F. J., Vasta, V., Pennisi, P., Bella, M., & Priolo, A. (2009). Lipid and colour stability of meat from lambs fed fresh herbage or concentrate. *Meat science*, 82(2), 193-199.
193. Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M. A., & Aruoma, O. I. (2002). Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(18), 5042-5047.
194. Lv, Z., Dai, H., Wei, Q., Jin, S., Wang, J., Wei, X., Yuan, Y., Yu, D., & Shi, F. (2020). Dietary genistein supplementation protects against lipopolysaccharide-induced intestinal injury through altering transcriptomic profile. *Poultry science*, *in press*.
195. Lv, Z., Fan, H., Zhang, B., Xing, K., & Guo, Y. (2018a). Dietary genistein supplementation for breeders and their offspring improves the growth performance and immune function of broilers. *Scientific reports*, 8(1), 1-14.
196. Lv, Z., Xing, K., Li, G., Liu, D., & Guo, Y. (2018b). Dietary genistein alleviates lipid metabolism disorder and inflammatory response in laying hens with fatty liver syndrome. *Frontiers in physiology*, 9 (1493). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01493>
197. Mahn, K., Borrás, C., Knock, G. A., Taylor, P., Khan, I. Y., Sugden, D., Poston, L., Ward, J. P., Sharpe, M. R., Viña, J., Aaronson, P. I., & Mann, G. E. (2005). Dietary soy isoflavone

- induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure *in vivo*. *The FASEB journal*, 19(12), 1755-1757.
198. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
  199. Margioris, A. N. (2009). Fatty acids and postprandial inflammation. *Current opinion in clinical nutrition & metabolic care*, 12(2), 129-137.
  200. Marković, R., Baltić, M. Ž., Pavlovic, M., Glišić, M., Radulović, S., Đorđević, V., & Šefer, D. (2015). Isoflavones-from biotechnology to functional foods. *Procedia food science*, 5, 176-179.
  201. Marković, R., Ćirić, J., Drljačić, A., Šefer, D., Jovanović, I., Jovanović, D., Milanović, S., Trbović, D., Radulović, S., Baltić, M. Ž., & Starčević, M. (2018b). The effects of dietary Selenium-yeast level on glutathione peroxidase activity, tissue Selenium content, growth performance, and carcass and meat quality of broilers. *Poultry science*, 97(8), 2861-2870.
  202. Marković, R., Ćirić, J., Starčević, M., Šefer, D., & Baltić, M. Ž. (2018a). Effects of selenium source and level in diet on glutathione peroxidase activity, tissue selenium distribution, and growth performance in poultry. *Animal health research reviews*, 19, 166-176.
  203. Martín-Castillo, A., Castells, M. T., Adánez, G., Polo, M. T. S., Pérez, B. G., & Ayala, I. (2010). Effect of atorvastatin and diet on non-alcoholic fatty liver disease activity score in hyperlipidemic chickens. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 64(4), 275-281.
  204. Máthé, Á. (2007). Essential oils as phytogenic feed additives. In: Franz, C., Máthé, Á., Buchbauer, G., (eds) *Essential oils: basic and applied research*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 315-325.
  205. Matsuura, M., Obata, A., & Fukushima, D. (1989). Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. *Journal of food science*, 54(3), 602-605.
  206. Maubach, J., Depypere, H. T., Goeman, J., Van Der Eycken, J., Heyerick, A., Bracke, M. E., ... & De Keukeleire, D. (2004). Distribution of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids. *Obstetrics & gynecology*, 103(5), 892-898.
  207. Mayeda, B., & Ernst, R. A. (2008). Prevention of fatal cage-layer osteoporosis. *Avian diseases*, 52(3), 544-545.
  208. Merz-Demlow, B. E., Duncan, A. M., Wangen, K. E., Xu, X., Carr, T. P., Phipps, W. R., & Kurzer, M. S. (2000). Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *The American journal of clinical nutrition*, 71(6), 1462-1469.

209. Messina, M. J., Persky, V., Setchell, K. D., & Barnes, S. (1994). Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutrition and cancer*, 21(2), 113-131.
210. Messina, M., Ho, S., & Alekel, D. L. (2004). Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Current opinion in clinical nutrition & metabolic care*, 7(6), 649-658.
211. Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
212. Middleton, Jr., MD, E. (1996). Biological properties of plant flavonoids: an overview. *International journal of pharmacognosy*, 34(5), 344-348.
213. Milanković, B., Ćirić, J., Krstić, M., Starčević, M., Baltić, B., Šefer, D., Đorđević, V., Popović, M., & Marković, R. (2019). Effect of dietary fatty acid pattern on growth performance, carcass characteristics, fatty acid profile, and serum biochemistry parameters in broiler chickens. *Kafkas üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 25(4), 507- 516.
214. Miller, D. M., & Aust, S. D. (1989). Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 271(1), 113-119.
215. Ming, L. G., Chen, K. M., & Xian, C. J. (2013). Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling. *Journal of cellular physiology*, 228(3), 513-521.
216. Mitchell, J. H., Gardner, P. T., McPhail, D. B., Morrice, P. C., Collins, A. R., & Duthie, G. G. (1998). Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Archives of biochemistry and biophysics*, 360(1), 142-148.
217. Mitsumoto, M. (2000). Dietary delivery versus exogenous addition of antioxidants. *Antioxidants in muscle foods: Nutritional strategies to improve quality (Ed. EA Decker, C. Faustman and CJ Lopez-Bote)*, 315-343.
218. Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., Lasco, A., Frisina, N., D'Anna, R., Corrado, F., Pizzoleo, M. A., Cincotta, M., Altavilla, D., Ientile, R., & Squadrito, F. (2002). Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Journal of bone and mineral research*, 17(10), 1904-1912.
219. Mountzouris, K. C., Paraskevas, V., Tsirtsikos, P., Palamidi, I., Steiner, T., Schatzmayr, G., & Fegeros, K. (2011). Assessment of a phytogenic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition. *Animal feed science and technology*, 168(3-4), 223-231.

220. Mukne, A. P., Viswanathan, V., & Phadatare, A. G. (2011). Structure pre-requisites for isoflavones as effective antibacterial agents. *Pharmacognosy reviews*, 5(9), 13-18.
221. Nagata, C., Inaba, S., Kawakami, N., Kakizoe, T., & Shimizu, H. (2000). Inverse association of soy product intake with serum androgen and estrogen concentrations in Japanese men. *Nutrition and cancer*, 36(1), 14-18.
222. Nahashon, S. N., & Kilonzo-Nthenge, A. K. (2011). Advances in Soybean and Soybean by-products in monogastric nutrition and health. *Soybean and nutrition*, 125-156.
223. Nemitz, M. C., Argenta, D. F., Koester, L. S., Bassani, V. L., von Poser, G. L., & Teixeira, H. F. (2016). The international scenario of patents concerning isoflavones. *Trends in food science & technology*, 49, 85-95.
224. Nemitz, M. C., Moraes, R. C., Koester, L. S., Bassani, V. L., von Poser, G. L., & Teixeira, H. F. (2015). Bioactive soy isoflavones: extraction and purification procedures, potential dermal use and nanotechnology-based delivery systems. *Phytochemistry reviews*, 14(5), 849-869.
225. Nestel, P. J., Pomeroy, S., Kay, S., Komesaroff, P., Behrsing, J., Cameron, J. D., & West, L. (1999). Isoflavones from red clover improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal women. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, 84(3), 895-898.
226. Nicoli, M. C., Anese, M., & Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in food science & technology*, 10(3), 94-100.
227. Nikolova, N., Eftimova, E., Pacinovski, N., Pavlovski, Z., Milosevic, N., & Peric, L. (2009). Effect of genotype, age, sex and composition of feed on content of abdominal fat in carcass of broiler chickens. *Contemporary agriculture*, 58(1-2), 92-100.
228. Nishimura, T., Ra Rhue, M., Okitani, A., & Kato, H. (1988). Components contributing to the improvement of meat taste during storage. *Agricultural and biological chemistry*, 52(9), 2323-2330.
229. NRC, 1994. Nutrient Requirements of Poultry (9th ed.). National Academy Press, Washington, D.C., USA.  
[https://www.academia.edu/19437209/NRC\\_Poultry\\_1994\\_Ninth\\_revised](https://www.academia.edu/19437209/NRC_Poultry_1994_Ninth_revised)
230. Ntukidem, N. I., Nguyen, A. T., Stearns, V., Rehman, M., Schott, A., Skaar, T., Jin, Y., Blanche, P., Li, L., Lemler, S., Hayden, J., Krauss, R. M., Desta, Z., Flockhart, D. A., & Hayes, D. F. (2008). Estrogen receptor genotypes, menopausal status, and the lipid effects of tamoxifen. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 83(5), 702-710.

231. Nuhu, F. (2010). *Effect of Moringa leaf meal (MOLM) on nutrient digestibility, growth, carcass and blood indices of weaner rabbits*. Master thesis, Kwame Nkrumah University of science and technology, Kumasi.
232. OECD/FAO. (2019). OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028. Chapter 6. Meat. OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. [https://doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2019-en](https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2019-en)
233. Ogawara, H., Akiyama, T., Ishida, J., Watanabe, S. I., & Suzuki, K. I. (1986). A specific inhibitor for tyrosine protein kinase from *Pseudomonas*. *The journal of antibiotics*, 39(4), 606-608.
234. Okubo, K., Iijima, M., Kobayashi, Y., Yoshikoshi, M., Uchida, T., & Kudou, S. (1992). Components responsible for the undesirable taste of soybean seeds. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(1), 99-103.
235. Onderci, M., Sahin, K., Sahin, N., Gursu, M. F., Doerge, D., Sarkar, F. H., & Kucuk, O. (2004). The effect of genistein supplementation on performance and antioxidant status of Japanese quail under heat stress. *Archives of animal nutrition*, 58(6), 463-471.
236. Onyango, E. M., Hester, P. Y., Strohshine, R., & Adeola, O. (2003). Bone densitometry as an indicator of percentage tibia ash in broiler chicks fed varying dietary calcium and phosphorus levels. *Poultry science*, 82(11), 1787-1791.
237. Oomah, B. D., Tiger, N., Olson, M., & Balasubramanian, P. (2006). Phenolics and antioxidative activities in narrow-leaved lupins (*Lupinus angustifolius* L.). *Plant foods for human nutrition*, 61(2), 86-92.
238. Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., & Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food chemistry*, 143, 48-53.
239. Orhan, E. I., Tosun, F., Tamer, U., Duran, A., Alan, B., & Kök, F. A. (2011). Quantification of genistein and daidzein in two endemic *Genista* species and their antioxidant activity. *Journal of the Serbian chemical society*, 76(1), 35-42.
240. Ouyang, K., Xu, M., Jiang, Y., & Wang, W. (2016). Effects of alfalfa flavonoids on broiler performance, meat quality, and gene expression. *Canadian journal of animal science*, 96(3), 332-341.
241. Pakalapati, G., Li, L., Gretz, N., Koch, E., & Wink, M. (2009). Influence of red clover (*Trifolium pratense*) isoflavones on gene and protein expression profiles in liver of ovariectomized rats. *Phytomedicine*, 16(9), 845-855.



242. Papadopoulos, M. C. (1989). Effect of processing on high-protein feedstuffs: a review. *Biological wastes*, 29(2), 123-138.
243. Parvin, S. S., & Rahman, J. (2015a). Effect of genistein isoflavone on performance and antibody responses in broiler chicks. 4<sup>th</sup> National Congress on Medical Plants, 12-13 May, Teheran, Iran, 1042.
244. Parvin, S. S., & Rahman, J. (2015b). Effect of dietary supplementation of genistein on performance and ileal microflora of broiler chicks fed on diets containing different protein levels. 4<sup>th</sup> National Congress on Medical Plants, 12-13 May, Teheran, Iran, 304.
245. Pascual-Teresa, D., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *International journal of molecular sciences*, 11(4), 1679-1703.
246. Patisaul, H. B., & Jefferson, W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in neuroendocrinology*, 31(4), 400-419.
247. Payne, R. L., Bidner, T. D., Southern, L. L., & Geaghan, J. P. (2001b). Effects of dietary soy isoflavones on growth, carcass traits, and meat quality in growing-finishing pigs. *Journal of animal science*, 79(5), 1230-1239.
248. Payne, R. L., Bidner, T. D., Southern, L. L., & McMillin, K. W. (2001a). Dietary effects of soy isoflavones on growth and carcass traits of commercial broilers. *Poultry science*, 80(8), 1201-1207.
249. Peisker, M. (2001). Manufacturing of soy protein concentrate for animal nutrition. *Cahiers options mediterraneennes*, 54, 103-107.
250. Peña, J. E. M., Vieira, S. L., López, J., Reis, R. N., Barros, R., Furtado, F. V. F., & Silva, P. X. (2008). Ascorbic acid and citric flavonoids for broilers under heat stress: effects on performance and meat quality. *Brazilian journal of poultry science*, 10(2), 125-130.
251. Pereira, M. A., Barnes, L. H., Rassman, V. L., Kelloff, G. V., & Steele, V. E. (1994). Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis*, 15(5), 1049-1054.
252. Perić, L., Rodić, V., & Milošević, N. (2011). Production of poultry meat and eggs as functional food: Challenges and opportunities. *Biotechnology in animal husbandry*, 27(3), 511-520.
253. Pesti, G. M., Vedenov, D., Cason, J. A., & Billard, L. (2009). A comparison of methods to estimate nutritional requirements from experimental data. *British poultry science*, 50(1), 16-32.

254. Peurača, M. (2017). *Uticaj dodavanja različitih količina natrijum butirata u hranu na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate prasadi*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
255. Picherit, C., Chanteranne, B., Bennetau-Pelissero, C., Davicco, M. J., Lebecque, P., Barlet, J. P., & Coxam, V. (2001). Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomised rat. *British journal of nutrition*, 85(3), 307-316.
256. Pisulewski, P. M. (2005). Nutritional potential for improving meat quality in poultry. *Animal science papers and reports*, 23, 303-315.
257. Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T., & Jerala, R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and biophysical research communications*, 306(2), 530-536.
258. Plowchalk, D. R., & Teeguarden, J. (2002). Development of a physiologically based pharmacokinetic model for estradiol in rats and humans: a biologically motivated quantitative framework for evaluating responses to estradiol and other endocrine-active compounds. *Toxicological Sciences*, 69(1), 60-78.
259. Polkowski, K., & Mazurek, A. P. (2000). Biological properties of genistein. A review of *in vitro* and *in vivo* data. *Acta poloniae pliarmaceutica-drug research*, 57(2), 135-155.
260. Potter, S. M., Baum, J. A., Teng, H., Stillman, R. J., Shay, N. F., & Erdman Jr, J. W. (1998). Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *The American journal of clinical nutrition*, 68(6), 1375-1379.
261. Pratt, D. E. (1993). Antioxidants indigenous to foods. *Toxicology and industrial health*, 9(1-2), 63-75.
262. Pratt, D. E., & Birac, P. M. (1979). Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *Journal of food science*, 44(6), 1720-1722.
263. Proestos, C., Boziaris, I. S., Nychas, G. J., & Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food chemistry*, 95(4), 664-671.
264. Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3396-3402.
265. Qian, L. C., & Sun, J. Y. (2009). Effect of  $\beta$ -glucosidase as a feed supplementary on the growth performance, digestive enzymes and physiology of broilers. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 22(2), 260-266.
266. Qian, L. C., Sun, J. Y., & Fu, S. J. (2012). Effect of  $\beta$ -glucosidase on the meat quality and digestibility in broilers. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 96(2), 270-274.

267. Rafii, F. (2015). The role of colonic bacteria in the metabolism of the natural isoflavone daidzin to equol. *Metabolites*, 5(1), 56-73.
268. Raj, A. B., Gregory, N. G., & Wilkins, L. J. (1992). Survival rate and carcass downgrading after the stunning of broilers with carbon dioxide-argon mixtures. *The veterinary record*, 130(15), 325-328.
269. Ranilla, L. G., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2009). Isoflavones and antioxidant capacity of Peruvian and Brazilian lupin cultivars. *Journal of food composition and analysis*, 22(5), 397-404.
270. Raschke, M., Rowland, I. R., Magee, P. J., & Pool-Zobel, B. L. (2006). Genistein protects prostate cells against hydrogen peroxide-induced DNA damage and induces expression of genes involved in the defence against oxidative stress. *Carcinogenesis*, 27(11), 2322-2330.
271. Rasouli, E., & Jahanian, R. (2015). Improved performance and immunological responses as the result of dietary genistein supplementation of broiler chicks. *Animal*, 9(9), 1473-1480.
272. Rasouli, E., & Jahanian, R. (2019). Comparative effects of genistein and antibiotics on performance, meat oxidative stability, jejunal morphology, and ileal microbial community in broiler chicks. *Animal feed science and technology*, 256, 114153.
273. Ratna, W. N. (2002). Inhibition of estrogenic stimulation of gene expression by genistein. *Life sciences*, 71(8), 865-877.
274. Record, I. R., Dreosti, I. E., & McInerney, J. K. (1995). The antioxidant activity of genistein *in vitro*. *The journal of nutritional biochemistry*, 6(9), 481-485.
275. Regulation (EC) No 1831/2003. (2003). Regulation of the European Parliament and of the Council on additives for use in animal nutrition. *Official journal of the European Union*, 22. septembar. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32003R1831>
276. Reitznerová, A., Šuleková, M., Nagy, J., Marcinčák, S., Semjon, B., Čertík, M., & Klempová, T. (2017). Lipid peroxidation process in meat and meat products: a comparison study of malondialdehyde determination between modified 2-Thiobarbituric acid spectrophotometric method and reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Molecules*, 22(11), 1988.
277. Rietjens, I. M., Sotoca, A. M., Vervoort, J., & Lousse, J. (2013). Mechanisms underlying the dualistic mode of action of major soy isoflavones in relation to cell proliferation and cancer risks. *Molecular nutrition & food research*, 57(1), 100-113.
278. Rimbach, G., De Pascual-Teresa, S., Ewins, B. A., Matsugo, S., Uchida, Y., Minihane, A. M., Turner, R., Vafeiadou, K., & Weinberg, P. D. (2003). Antioxidant and free radical scavenging activity of isoflavone metabolites. *Xenobiotica*, 33(9), 913-925.

279. Robinson, K. M., Klein, B. P., & Lee, S. Y. (2005). Utilizing the R-index measure for threshold testing in model caffeine solutions. *Food quality and preference*, 16(4), 283-289.
280. Ropero, A. B., Alonso-Magdalena, P., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2006). Rapid endocrine disruption: environmental estrogen actions triggered outside the nucleus. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 102(1-5), 163-169.
281. Rossi, M., Amaretti, A., Roncaglia, L., Leonardi, A., & Raimondi, S. (2010). Dietary isoflavones and intestinal microbiota: metabolism and transformation into bioactive compounds. In Thompson, M. J.: (ed.) *Isoflavones biosynthesis, occurrence and health effects*, Nova Science Publishers, 137-161.
282. Ruiz, J. A., Pérez-Vendrell, A. M., & Esteve-García, E. (1999). Effect of  $\beta$ -carotene and vitamin E on oxidative stability in leg meat of broilers fed different supplemental fats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(2), 448-454.
283. Ryökkönen, A. (2006). *Effects of phytoestrogens on the reproduction and weight regulation of mammals*. PhD Dissertations in Biology, University of Joensuu.
284. Sahin, N., Akdemir, F., Orhan, C., Kucuk, O., Hayirli, A., & Sahin, K. (2008). Lycopene-enriched quail egg as functional food for humans. *Food research international*, 41(3), 295-300.
285. Sahin, N., Onderci, M., Balci, T. A., Cikim, G., Sahin, K., & Kucuk, O. (2007). The effect of soy isoflavones on egg quality and bone mineralisation during the late laying period of quail. *British poultry science*, 48(3), 363-369.
286. Sahin, N., Sahin, K., Onderci, M., Sarkar, F. H., Doerge, D., Prasad, A., & Kucuk, O. (2006). Effects of dietary genistein on nutrient use and mineral status in heat-stressed quails. *Experimental animals*, 55(2), 75-82.
287. Saitoh, S., Sato, T., Harada, H., & Matsuda, T. (2004). Biotransformation of soy isoflavone-glycosides in laying hens: intestinal absorption and preferential accumulation into egg yolk of equol, a more estrogenic metabolite of daidzein. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-General subjects*, 1674(2), 122-130.
288. Saitoh, S., Sato, T., Harada, H., & Takita, T. (2001). Transfer of soy isoflavone into the egg yolk of chickens. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(10), 2220-2225.
289. Salgado, J. M., & Donado-Pestana, C. M. (2011). Soy as a functional food. Hany A. El-Shemy (ed.). *In soybean and nutrition*. InTech. Croatia, 21-44.
290. Setchell, K. D., & Cassidy, A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *The journal of nutrition*, 129(3), 758-767.
291. Setchell, K. D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., & Heubi, J. E. (1997). Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *The lancet*, 350(9070), 23-27.

292. Shiralinezhad, A., & Shakouri, M. D. (2017). Improvement of growth performance and intestinal digestive function in broiler chickens by supplementation of soy isoflavone in corn-soy diet. *Journal of animal plant science*, 27(1), 28-33.
293. Simeonovová, J. (1999). Technology of poultry, eggs and other minor animal products. *MZLU Brno, 1999*, 247.
294. Simitzis, P. E., Symeon, G. K., Charismiadou, M. A., Ayoutanti, A. G., & Deligeorgis, S. G. (2011). The effects of dietary hesperidin supplementation on broiler performance and chicken meat characteristics. *Canadian journal of animal science*, 91(2), 275-282.
295. Sinovec, Z., i Ševković, N. (2008). Praktikum iz ishrane, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
296. Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51(3), 456-467.
297. Sirotkin, A. V., & Harrath, A. H. (2014). Phytoestrogens and their effects. *European journal of pharmacology*, 741, 230-236.
298. Smirnov, A., Perez, R., Amit-Romach, E., Sklan, D., & Uni, Z. (2005). Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. *The journal of nutrition*, 135(2), 187-192.
299. Song, T., Barua, K., Buseman, G., & Murphy, P. A. (1998). Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *The American journal of clinical nutrition*, 68(6), 1474-1479.
300. Souza, H. B. A. (2006). Parâmetros físicos e sensoriais utilizados para avaliação de qualidade da carne de frango. *V Seminário Internacional De Aves E Suínos. Florianópolis. Santa Catarina. Brasil Concórdia: Embrapa Suínos e Aves.*
301. Spencer, J. P., Schroeter, H., Rechner, A. R., & Rice-Evans, C. (2001). Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms *in vivo*. *Antioxidants and redox signaling*, 3(6), 1023-1039.
302. Sredanović, S., & Lević, J. (2000). Kondicioniranje-važan korak u proizvodnji stočne hrane. *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi/PTEP*, 4(3-4), 82-84.
303. SRPS EN ISO 8586:2015. Senzorske analize - Opšta uputstva za odabir, obuku i praćenje odabranih ocenjivača i stručnjaka za senzorska ocenjivanja.
304. SRPS EN ISO 8586-2:2012. Senzorske analize - Opšte uputstvo za odabir, obuku i praćenje ocenjivača - Deo 2: Senzorski ocenjivači (eksperti).
305. SRPS ISO 1442:1998. Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja vlage (referentna metoda).
306. SRPS ISO 1443:1992. Meso i proizvodi od mesa. Određivanje sadržaja ukupne masti.

307. SRPS ISO 5983:2000. Određivanje sadržaja azota i izračunavanje sadržaja proteina (volumetrijski). Metoda po Kjeldalu.
308. SRPS ISO 5984:2013. Hrana za životinje - Određivanje sirovog pepela.
309. SRPS ISO 6490-1:2001. Hrana za životinje - određivanje sadržaja kalcijuma - deo 1: volumetrijska metoda.
310. SRPS ISO 6491:2002. Hrana za životinje - Određivanje sadržaja fosfora - Spektrometrijska metoda.
311. SRPS ISO 6492:2001. Hrana za životinje - Određivanje sadržaja masti.
312. SRPS ISO 6496:2001. Hrana za životinje - Određivanje sadržaja vlage i drugih isparljivih materija.
313. SRPS ISO 6564:2001. Senzorske analize - Metodologija - Metode profilisanja ukusnosti.
314. SRPS ISO 6865:2004. Hrana za životinje - Određivanje sadržaja sirove celuloze - Metoda sa međufiltracijom.
315. SRPS ISO 6869:2008. Hrana za životinje - Određivanje sadržaja kalcijuma, bakra, gvožđa, magnezijuma, mangana, kalijuma, natrijuma i cinka - Metoda atomske apsorpcione spektrometrije.
316. SRPS ISO 936:1999. Meso i proizvodi od mesa - određivanje ukupnog pepela.
317. SRPS ISO 937:1992. Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja azota (referentna metoda).
318. Stanačev, V., Božić, A., Kovčín, S., Milošević, N., & Perić, L. (2005). Effect of copper level and type of oil in feed on cholesterol content in broiler meat. *Veterinarski glasnik*, 59(1-2), 251-259.
319. Steensma, A., Noteborn, H. P., van der Jagt, R. C., Polman, T. H., Mengelers, M. J., & Kuiper, H. A. (1999). Bioavailability of genistein, daidzein, and their glycosides in intestinal epithelial Caco-2 cells. *Environmental toxicology and pharmacology*, 7(3), 209-212.
320. Steer, T. E., Johnson, I. T., Gee, J. M., & Gibson, G. R. (2003). Metabolism of the soyabean isoflavone glycoside genistin *in vitro* by human gut bacteria and the effect of prebiotics. *British journal of nutrition*, 90(3), 635-642.
321. Steiner, T., & Syed, B. (2015). Phytogetic feed additives in animal nutrition. In *Medicinal and aromatic plants of the world*. Springer, Dordrecht, 403-423.
322. Stevenson, L. (2007). *Effects of the soy phytoestrogen genistein on the reproductive development of immature female broiler chickens*. Master thesis, Faculty of Auburn, University of Alabama.
323. Stevenson, L. (2012). *The estrogenic effects of the soy phytoestrogen genistein on the liver and bone of chickens*. Doctoral dissertation, Faculty of Auburn, University of Alabama.

324. Suchý, P., Jelínek, P., Straková, E., & Hucl, J. (2002). Chemical composition of muscles of hybrid broiler chickens during prolonged feeding. *Czech journal of animal science*, 47(12), 511-518.
325. Surai, P. F. (2007, August). Natural antioxidants in poultry nutrition: new developments. In *Proceedings of the 16th European symposium on poultry nutrition*. World Poultry Science Association, 26-30.
326. Surai, P. F. (2014). Polyphenol compounds in the chicken/animal diet: from the past to the future. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 98(1), 19-31.
327. Symonowicz, M., & Kolanek, M. (2012). Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnology food science*, 76(1), 35-41.
328. Takahashi, Y., Odbayar, T. O., & Ide, T. (2009). A comparative analysis of genistein and daidzein in affecting lipid metabolism in rat liver. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 44(3), 223-230.
329. Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Younathan, M. T., & Dugan Jr, L. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American oil chemists' society*, 37(1), 44-48.
330. Tešić, M. M., Nedić, N. D., & Tajdić, N. (2013). *Ekonomika veterinarstva, praktikum*. Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
331. Tzounis, X., Vulevic, J., Kuhnle, G. G., George, T., Leonczak, J., Gibson, G. R., Kwik-Uribe, C., & Spencer, J. P. (2008). Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *British journal of nutrition*, 99(4), 782-792.
332. Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., & Węgrzyn, G. (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, 62(2), 132-135.
333. Ulanowska, K., Tkaczyk, A., Konopa, G., & Węgrzyn, G. (2006). Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Archives of microbiology*, 184(5), 271-278.
334. Ullah, M. F., Ahmad, A., Zubair, H., Khan, H. Y., Wang, Z., Sarkar, F. H., & Hadi, S. M. (2011). Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. *Molecular nutrition & food research*, 55(4), 553-559.
335. Umasuthan, N., Bathige, S. D. N. K., Revathy, K. S., Lee, Y., Whang, I., Choi, C. Y., Park, H. C., & Lee, J. (2012). A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from *Ruditapes philippinarum*: comparative structural-and expressional-analysis with copper/zinc

- superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) and biochemical analysis of its antioxidant activities. *Fish & shellfish immunology*, 33(4), 753-765.
336. Urpi-Sarda, M., Morand, C., Besson, C., Kraft, G., Viala, D., Scalbert, A., Besle, J. M., & Manach, C. (2008). Tissue distribution of isoflavones in ewes after consumption of red clover silage. *Archives of biochemistry and biophysics*, 476(2), 205-210.
337. USDA. US Department of Agriculture, A.R.S. (2008). USDA Database for the isoflavone content of selected foods, Release 2.0. <https://data.nal.usda.gov/dataset/usda-database-isoflavone-content-selected-foods-release-20>
338. Valverde, M. A., & Parker, M. G. (2002). Classical and novel steroid actions: a unified but complex view. *Trends in biochemical sciences*, 4(27), 172-173.
339. Van Elswyk, M. E., Hargis, B. M., Williams, J. D., & Hargis, P. S. (1994). Dietary menhaden oil contributes to hepatic lipidosis in laying hens. *Poultry science*, 73(5), 653-662.
340. Vargas Galdos, D. M. M. (2009). *Quantification of soy isoflavones in commercial eggs and their transfer from poultry feed into eggs and tissues*. Doctoral dissertation, The Ohio State University.
341. Verbeke, W. (2005). Consumer acceptance of functional foods: socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants. *Food quality and preference*, 16(1), 45-57.
342. Verdrengh, M., Collins, L. V., Bergin, P., & Tarkowski, A. (2004). Phytoestrogen genistein as an anti-staphylococcal agent. *Microbes and infection*, 6(1), 86-92.
343. Villares, A., Rostagno, M. A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., & Martínez, J. A. (2011). Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. *Food and bioprocess technology*, 4(1), 27-38.
344. Viña, S. Z., & Chaves, A. R. (2008). Effect of heat treatment and refrigerated storage on antioxidant properties of pre-cut celery (*Apium graveolens* L.). *International journal of food science & technology*, 43(1), 44-51.
345. Waheed, A., Ahmad, T., Yousaf, A., & Zaefr, I. J. (2004). Effect of various levels of fat and antioxidant on the quality of broiler rations stored at high temperature for different periods. *Pakistan veterinary journal*, 24(2), 70-75.
346. Wallace, R. J., Oleszek, W., Franz, C., Hahn, I., Baser, K. H. C., Mathe, A., & Teichmann, K. (2010). Dietary plant bioactives for poultry health and productivity. *British poultry science*, 51(4), 461-487.
347. Wang, G. J., Han, Z. K., Chen, J., & Chen, W. H. (1994). Effect of daidzein on muscle growth in broilers and mechanism involved. *Guangdong journal of animal and veterinary science*, 19(3), 4-7.



348. Wang, H. J., & Murphy, P. A. (1994). Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(8), 1674-1677.
349. Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S., & Wang, Y. (1995). Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 208(1), 124-130.
350. Wei, X. J., Ni, Y. D., Lu, L. Z., Grossmann, R., & Zhao, R. Q. (2011). The effect of equol injection *in ovo* on posthatch growth, meat quality and antioxidation in broilers. *Animal*, 5(2), 320-327.
351. Weng, L., Zhang, F., Wang, R., Ma, W., & Song, Y. (2019). A review on protective role of genistein against oxidative stress in diabetes and related complications. *Chemico-biological interactions*, 310, 108665.
352. Wenk, C., Leonhardt, M., & Scheeder, M. R. L. (2000). Monogastric nutrition and potential for improving muscle quality. *Antioxidants in muscle foods: Nutritional strategies to improve quality*, 199-227.
353. Whitehead, C. C. (2004). Overview of bone biology in the egg-laying hen. *Poultry science*, 83(2), 193-199.
354. Whittow, G. C. (2000). *Sturkie's avian physiology*, 5th edition. Academic Press, San Diego, CA, USA.
355. Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., & Kroismayr, A. (2008). Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of animal science*, 86(14), 140-148.
356. Wiseman, H., O'Reilly, J. D., Adlercreutz, H., Mallet, A. I., Bowey, E. A., Rowland, I. R., & Sanders, T. A. (2000). Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *The american journal of clinical nutrition*, 72(2), 395-400.
357. Witmer, J. R. (2012). *Quantitative analysis and modeling of redox networks in biology*. PhD thesis, University of Iowa. <http://ir.uiowa.edu/etd/3407>
358. Yalniz, M., Bahcecioglu, I. H., Kuzu, N., Poyrazoglu, O. K., Bulmus, O., Celebi, S., Ustundag, B., Ozercan, I. H., & Sahin, K. (2007). Preventive role of genistein in an experimental non-alcoholic steatohepatitis model. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 22(11), 2009-2014.
359. Yang, H. Y., Tzeng, Y. H., Chai, C. Y., Hsieh, A. T., Chen, J. R., Chang, L. S., & Yang, S. S. (2011). Soy protein retards the progression of non-alcoholic steatohepatitis via improvement of insulin resistance and steatosis. *Nutrition*, 27(9), 943-948.

360. Yang, Y., Gao, M., Wu, Z., & Guo, Y. (2010). Genistein attenuates low temperature induced pulmonary hypertension in broiler chicks by modulating endothelial function. *European journal of pharmacology*, 649(1-3), 242-248.
361. Yao, W., Han, Z. K., Williams, B. A., Tamminga, S., & Akkermans, A. D. L. (2004). Daidzein increased the density but not composition of *Lactobacillus* community in piglet digesta during *in vitro* fermentation as revealed by DGGE and dilution PCR. *Reproduction nutrition development*, 44, 17.
362. Yaroshenko, F. O., Surai, P. F., Yaroshenko, Y. F., Karadas, F., & Sparks, N. H. C. (2004, June). Theoretical background and commercial application of production of Se-enriched chicken. In *Proceedings of XXII World's poultry congress. Istanbul (Turkey)*.
363. Yellayi, S., Naaz, A., Szewczykowski, M. A., Sato, T., Woods, J. A., Chang, J., Segre, M., Allred, C. D., Helferich, W. G., & Cooke, P. S. (2002). The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern?. *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(11), 7616-7621.
364. Yeoman, C. J., Chia, N., Jeraldo, P., Sipos, M., Goldenfeld, N. D., & White, B. A. (2012). The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Animal health research reviews*, 13(1), 89-99.
365. Yilmaz, O., Guvenc, M., Cetintas, B., Tuzcu, M., Dayangac, A., & Sahin, K. (2008). Effects of isoflavones supplementation on cholesterol and fatty acid levels of muscle and liver tissues of quail. *Journal of animal and veterinary advances*, 7, 1444-1449.
366. Young, J. F., Stagsted, J., Jensen, S. K., Karlsson, A. H., & Henckel, P. (2003). Ascorbic acid, alpha-tocopherol, and oregano supplements reduce stress-induced deterioration of chicken meat quality. *Poultry science*, 82(8), 1343-1351.
367. Youssef, M. K., & Barbut, S. (2011). Effects of two types of soy protein isolates, native and preheated whey protein isolates on emulsified meat batters prepared at different protein levels. *Meat science*, 87(1), 54-60.
368. Yu, L. H., Lee, E. S., Jeong, J. Y., Paik, H. D., Choi, J. H., & Kim, C. J. (2005). Effects of thawing temperature on the physicochemical properties of pre-rigor frozen chicken breast and leg muscles. *Meat science*, 71(2), 375-382.
369. Yue, X., Abdallah, A. M., & Xu, Z. (2010). Thermal dynamic properties of isoflavones during dry heating. *International journal of food science & technology*, 45(9), 1878-1882.
370. Zanini, S. F., Torres, C. A. A., Bragagnolo, N., Turatti, J. M., Silva, M. G., & Zanini, M. S. (2004). Effect of oil sources and vitamin E levels in the diet on the composition of fatty acids in rooster thigh and chest meat. *Journal of the science of food and agriculture*, 84(7), 672-682.

371. Zhang, D. Y., Zu, Y. G., Fu, Y. J., Wang, W., Zhang, L., Luo, M., Mu, F. S., Yao, X. H., & Duan, M. H. (2013). Aqueous two-phase extraction and enrichment of two main flavonoids from pigeon pea roots and the antioxidant activity. *Separation and purification technology*, 102, 26-33.
372. Zhang, M., Chen, H., Li, J., Pei, Y., & Liang, Y. (2010). Antioxidant properties of tartary buckwheat extracts as affected by different thermal processing methods. *LWT-Food science and technology*, 43(1), 181-185.
373. Zhang, M., Kou, J., Wu, Y., Wang, M., Zhou, X., Yang, Y., & Wu, Z. (2020). Dietary genistein supplementation improves intestinal mucosal barrier function in *Escherichia coli* O78-challenged broilers. *The journal of nutritional biochemistry*, 77, 108267.
374. Zhang, Y., Song, T. T., Cunnick, J. E., Murphy, P. A., & Hendrich, S. (1999). Daidzein and genistein glucuronides *in vitro* are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *The journal of nutrition*, 129(2), 399-405.
375. Zhengkang, H., Wang, G., Yao, W., & Zhu, W. Y. (2006). Isoflavonic phytoestrogens-new prebiotics for farm animals: a review on research in China. *Current issues in intestinal microbiology*, 7(2), 53-60.
376. Zhu, C., Wu, Y., Jiang, Z., Zheng, C., Wang, L., Yang, X., Gao, X. K., & Hu, Y. (2015). Dietary soy isoflavone attenuated growth performance and intestinal barrier functions in weaned piglets challenged with lipopolysaccharide. *International immunopharmacology*, 28(1), 288-294.
377. Zhu, W. Y., Mao, S. Y., Wang, Q. J., Yao, W., Liu, Q., & Theodorou, M. K. (2002). Effect of daidzein on *in vitro* fermentation of micro-organisms from the goat rumen. *Reproduction nutrition development*, 42(1), 71-74.
378. Zoppi, G., Gerosa, F., Pezzini, A., Bassani, N., Rizzotti, P., Bellini, P., Todeschini, G., Zamboni, G., Vazzoler, G., & Tridente, G. (1982). Immunocompetence and dietary protein intake in early infancy. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 1(2), 175-182.

## 9. PRILOZI

## Prilog A

## Proizvodni rezultati

Tabela 1. Telesne mase piladi 1., 10., 21., 42. i 58. dana tova

Grupa	n	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
			Sd	Se	Iv		
					Xmin	Xmax	
<b>1. dan</b>							
	360	44,11	4,25	0,22	43,67	44,55	9,63
<b>10. dan</b>							
	360	343,10	32,14	1,70	183	419	9,37
<b>21. dan (n=6x12)</b>							
<b>K</b>	72	966,90	57,12	6,73	869	1125	5,91
<b>O-I</b>	72	980,30	46,25	5,45	900	1096	4,72
<b>O-II</b>	72	993,30	68,45	8,07	895	1131	6,89
<b>O-III</b>	72	971,90	52,38	6,17	880	1095	5,39
<b>O-IV</b>	72	979,40	57,15	6,74	900	1101	5,84
<b>42. dan (n=6x12)</b>							
<b>K</b>	72	2623 <sup>ab</sup>	347,40	40,94	2017	3252	13,24
<b>O-I</b>	72	2727	281,20	33,15	2390	3301	10,31
<b>O-II</b>	72	2847 <sup>a</sup>	322,90	38,05	2406	3477	11,34
<b>O-III</b>	72	2781 <sup>b</sup>	354,90	41,83	2130	3397	12,76
<b>O-IV</b>	72	2772	327,20	38,56	2243	3360	11,80
<b>58. dan (n=6x6)</b>							
<b>K</b>	36	4021	396,80	66,13	3450	4690	9,87
<b>O-I</b>	36	4029	516,50	86,09	3260	5040	12,82
<b>O-II</b>	36	4122	401,40	66,89	3400	4740	9,74
<b>O-III</b>	36	3835	536,80	89,47	2770	4665	14,00
<b>O-IV</b>	36	4095	475,00	79,16	3500	4820	11,60

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

Tabela 2. Prosečan ukupni prirast brojlera u toku 58 dana tova

Grupa	n	g $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
			Sd	Se	Iv		
					Xmin	Xmax	
<b>1-10. dan</b>							
	360	299,00	28,27	1,49	150,00	367,00	9,45
<b>11-20. dan</b>							
	360	635,30	32,24	1,70	577,00	745,00	5,07
<b>21-42. dan (n=6x12)</b>							
K	72	1656 <sup>abc</sup>	292,90	34,52	1138	2180	17,69
O-I	72	1747	237,50	27,99	1480	2229	13,60
O-II	72	1854 <sup>a</sup>	257,30	30,32	1499	2357	13,88
O-III	72	1809 <sup>b</sup>	305,10	35,96	1236	2371	16,87
O-IV	72	1793 <sup>c</sup>	272,90	32,16	1343	2260	15,22
<b>43-58. dan (n=6x6)</b>							
K	36	1293 <sup>a</sup>	221,70	36,95	996	1734	17,15
O-I	36	1298 <sup>b</sup>	259,90	43,32	866	1849	20,03
O-II	36	1323 <sup>c</sup>	173,10	28,85	984	1589	13,08
O-III	36	1139 <sup>abcd</sup>	264,10	44,01	640	1574	23,19
O-IV	36	1407 <sup>d</sup>	171,90	28,65	1186	1765	12,22

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 3. Prosečna ukupna konzumacija brojlera u toku 58 dana tova

Grupa	n	g $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
			Sd	Se	Iv		
					Xmin	Xmax	
<b>1-10. dan</b>							
	360	341,40	6,88	1,26	327,30	351,10	2,01
<b>11-20. dan</b>							
	360	847,30	66,47	12,14	724,30	978,30	7,84
<b>21-42. dan (n=6x12)</b>							
K	6	3236	250,60	102,30	2859	3524	7,74
O-I	6	3133	214,70	87,63	2875	3451	6,85
O-II	6	3293	308,00	125,70	2918	3636	9,35
O-III	6	2964	230,60	94,12	2614	3211	7,78
O-IV	6	2959	206,00	84,12	2701	3205	6,96
<b>43-58. dan (n=6x6)</b>							
K	6	3460	305,20	124,60	3036	3792	8,82
O-I	6	3251	256,30	104,70	2964	3564	7,88
O-II	6	3484	376,20	153,60	3064	3971	10,80
O-III	6	3282	294,80	120,30	2975	3774	8,98
O-IV	6	3332	244,00	99,63	3037	3707	7,32

Tabela 4. Prosečna konverzija hrane brojlera u toku 58 dana tova

Grupa	n	$\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
			Sd	Se	Iv		
					Xmin	Xmax	
<b>1-10. dan</b>							
	360	1,143	0,026	0,005	1,09	1,18	2,30
<b>11-20. dan</b>							
	360	1,333	0,107	0,020	1,140	1,560	8,02
<b>21-42. dan (n=6x12)</b>							
K	6	1,957 <sup>ab</sup>	0,150	0,061	1,73	2,12	7,65
O-I	6	1,793	0,113	0,046	1,66	1,96	6,30
O-II	6	1,777	0,166	0,068	1,57	1,95	9,35
O-III	6	1,638 <sup>a</sup>	0,120	0,049	1,46	1,78	7,31
O-IV	6	1,648 <sup>b</sup>	0,112	0,046	1,51	1,78	6,80
<b>43-58. dan (n=6x6)</b>							
K	6	2,677 <sup>a</sup>	0,202	0,083	2,35	2,96	7,55
O-I	6	2,503 <sup>b</sup>	0,080	0,033	2,38	2,60	3,21
O-II	6	2,632	0,230	0,094	2,37	2,94	8,74
O-III	6	2,877 <sup>bc</sup>	0,190	0,078	2,68	3,22	6,62
O-IV	6	2,370 <sup>ac</sup>	0,156	0,064	2,18	2,64	6,57

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c</sup>-P<0,05

## Prilog B

## Biohemijske analize krvnog seruma

Tabela 1. Holesterol 42. dan

Grupa	mmol/l $\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	3,42	0,20	0,08	3,16	3,60	5,83
<b>O-I</b>	2,81	0,37	0,15	2,16	3,26	13,37
<b>O-II</b>	2,97	0,46	0,19	2,37	3,56	15,47
<b>O-III</b>	3,19	0,56	0,23	2,64	4,26	17,56
<b>O-IV</b>	3,11	0,34	0,14	2,50	3,40	10,93

Tabela 2. Holesterol 58. dan

Grupa	mmol/l $\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	3,36	0,33	0,13	2,77	3,64	9,68
<b>O-I</b>	2,77	0,23	0,09	2,53	3,08	8,22
<b>O-II</b>	3,10	0,36	0,15	2,62	3,61	11,67
<b>O-III</b>	3,22	0,40	0,16	2,58	3,61	12,37
<b>O-IV</b>	3,30	0,53	0,22	2,29	3,85	16,03

Tabela 3. Trigliceridi 42. dan

Grupa	mmol/l $\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,50 <sup>abcd</sup>	0,07	0,03	0,40	0,57	14,27
<b>O-I</b>	0,35 <sup>a</sup>	0,10	0,04	0,19	0,48	29,30
<b>O-II</b>	0,34 <sup>b</sup>	0,05	0,02	0,27	0,38	13,45
<b>O-III</b>	0,30 <sup>c</sup>	0,08	0,03	0,20	0,43	27,48
<b>O-IV</b>	0,31 <sup>d</sup>	0,07	0,03	0,21	0,39	23,35

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 4. Trigliceridi 58. dan

Grupa	mmol/l $\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,31 <sup>ab</sup>	0,03	0,01	0,27	0,35	10,40
<b>O-I</b>	0,40	0,03	0,01	0,37	0,45	6,95
<b>O-II</b>	0,39	0,05	0,02	0,35	0,49	13,76
<b>O-III</b>	0,42 <sup>a</sup>	0,06	0,03	0,33	0,51	14,83
<b>O-IV</b>	0,43 <sup>b</sup>	0,09	0,04	0,36	0,58	19,89

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

## Prilog C

## Masa unutrašnjih organa

Tabela 1. Masa jetre, 42. dan tova

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	41,60	5,18	1,34	34,00	53,00	12,45
<b>O-I</b>	44,00	7,36	1,90	28,00	59,00	16,72
<b>O-II</b>	45,07	7,64	1,97	33,00	61,00	16,95
<b>O-III</b>	46,07	5,16	1,33	37,00	54,00	11,20
<b>O-IV</b>	47,87	6,63	1,71	33,00	57,00	13,85

Tabela 2. Masa jetre, 58. dan tova

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	63,07	12,82	3,31	43,00	99,00	20,33
<b>O-I</b>	60,07	9,15	2,36	45,00	78,00	15,23
<b>O-II</b>	58,40	7,06	1,82	47,00	69,00	12,09
<b>O-III</b>	57,20	9,72	2,51	38,00	72,00	16,99
<b>O-IV</b>	56,60	10,45	2,70	43,00	74,00	18,46

Tabela 3. Masa slezine, 42. dan tova

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	2,133 <sup>a</sup>	0,352	0,091	2	3	16,49
<b>O-I</b>	2,067 <sup>b</sup>	0,258	0,067	2	3	12,49
<b>O-II</b>	2,267 <sup>c</sup>	0,704	0,182	1	4	31,05
<b>O-III</b>	2,333 <sup>d</sup>	0,617	0,159	2	4	26,45
<b>O-IV</b>	3,867 <sup>abcd</sup>	1,187	0,307	2	5	30,70

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 4. Masa slezine, 58. dan tova

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	3,800	1,014	0,262	3	6	26,69
<b>O-I</b>	3,933	1,100	0,284	2	6	27,96
<b>O-II</b>	3,867	1,187	0,307	2	6	30,70
<b>O-III</b>	3,800	1,146	0,296	2	6	30,17
<b>O-IV</b>	3,400	1,056	0,273	2	5	31,05



Tabela 5. Masa srca, 42. dan tova

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	12,27 <sup>a</sup>	2,79	0,72	8	17	22,74
<b>O-I</b>	12,73 <sup>b</sup>	2,99	0,77	9	18	23,46
<b>O-II</b>	14,67	3,56	0,92	8	21	24,27
<b>O-III</b>	15,47	2,59	0,67	11	20	16,73
<b>O-IV</b>	17,33 <sup>ab</sup>	3,74	0,96	11	24	21,55

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

Tabela 6. Masa srca, 58. dan tova

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	22,33	4,94	1,28	16	32	22,11
<b>O-I</b>	19,13	4,58	1,18	14	32	23,94
<b>O-II</b>	21,87	4,31	1,11	17	33	19,70
<b>O-III</b>	21,33	3,83	0,99	17	30	17,95
<b>O-IV</b>	19,47	3,40	0,88	13	26	17,46

Tabela 7. Masa jajnika, 58. dan tova

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	<1	-	-	-	-	-
<b>O-I</b>	2,167 <sup>a</sup>	0,408	0,167	2	3	23,94
<b>O-II</b>	1,667	0,516	0,211	1	2	19,70
<b>O-III</b>	1,833 <sup>b</sup>	0,408	0,167	1	2	17,95
<b>O-IV</b>	1,167 <sup>ab</sup>	0,258	0,105	1	2	17,46

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 8. Relativna masa jetre (% žive mase), 42. dan tova

Grupa	$\frac{\%}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,69	0,211	0,055	1,26	2,20	12,48
<b>O-I</b>	1,63	0,217	0,056	1,03	1,92	13,31
<b>O-II</b>	1,56	0,200	0,052	1,21	2,01	12,83
<b>O-III</b>	1,63	0,182	0,047	1,36	2,03	11,19
<b>O-IV</b>	1,68	0,209	0,054	1,38	2,13	12,44

Tabela 9. Relativna masa jetre, (% žive mase) 58. dan tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,573	0,303	0,078	1,16	2,34	19,28
<b>O-I</b>	1,494	0,166	0,043	1,24	1,84	11,08
<b>O-II</b>	1,419	0,141	0,036	1,24	1,70	9,94
<b>O-III</b>	1,494	0,181	0,047	1,18	1,91	12,12
<b>O-IV</b>	1,377	0,144	0,037	1,14	1,64	10,44

Tabela 10. Relativna masa slezine (% žive mase), 42. dan tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,088 <sup>a</sup>	0,017	0,004	0,062	0,134	19,72
<b>O-I</b>	0,077 <sup>b</sup>	0,013	0,003	0,062	0,119	17,28
<b>O-II</b>	0,079 <sup>c</sup>	0,024	0,006	0,035	0,130	30,36
<b>O-III</b>	0,083 <sup>d</sup>	0,025	0,006	0,059	0,142	30,16
<b>O-IV</b>	0,137 <sup>abcd</sup>	0,043	0,011	0,068	0,208	31,74

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 11. Relativna masa slezine, (% žive mase), 58. dan tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,096	0,028	0,007	0,07	0,16	29,41
<b>O-I</b>	0,101	0,037	0,010	0,04	0,17	30,88
<b>O-II</b>	0,094	0,029	0,008	0,04	0,16	31,09
<b>O-III</b>	0,101	0,029	0,008	0,04	0,13	29,20
<b>O-IV</b>	0,083	0,027	0,007	0,04	0,13	31,60

Tabela 12. Relativna masa srca (% žive mase), 42. dan tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,496	0,096	0,025	0,37	0,67	19,26
<b>O-I</b>	0,473 <sup>a</sup>	0,112	0,029	0,34	0,70	23,73
<b>O-II</b>	0,509	0,116	0,030	0,26	0,68	22,85
<b>O-III</b>	0,551	0,128	0,033	0,35	0,88	23,23
<b>O-IV</b>	0,606 <sup>a</sup>	0,107	0,028	0,45	0,81	17,67

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 13. Relativna masa srca, (% žive mase) 58. dan tova

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,555	0,110	0,028	0,41	0,80	19,85
<b>O-I</b>	0,472	0,080	0,021	0,36	0,63	16,95
<b>O-II</b>	0,530	0,089	0,023	0,43	0,77	16,88
<b>O-III</b>	0,560	0,088	0,023	0,46	0,76	15,80
<b>O-IV</b>	0,474	0,055	0,014	0,37	0,55	11,55

Tabela 14. Relativna masa jajnika, (% žive mase) 58. dan tova

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	-	-	-	-	-	-
<b>O-I</b>	0,060 <sup>a</sup>	0,012	0,005	0,053	0,083	19,17
<b>O-II</b>	0,045	0,016	0,006	0,025	0,059	31,66
<b>O-III</b>	0,055 <sup>b</sup>	0,014	0,006	0,031	0,072	24,59
<b>O-IV</b>	0,032 <sup>ab</sup>	0,008	0,003	0,026	0,043	24,12

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

## Prilog D

## Ukupni proteini jetre i aktivnost antioksidativnih enzima jetre brojlera

Tabela 1. Ukupni proteini jetre nakon 42. dana tova

Grupa	mg proteina/ ml homogenata $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	3,58	0,30	0,12	3,27	4,09	8,38
<b>O-I</b>	3,40	0,27	0,11	2,99	3,76	7,79
<b>O-II</b>	3,79	0,33	0,14	3,37	4,30	8,75
<b>O-III</b>	3,85	0,22	0,09	3,48	4,06	5,62
<b>O-IV</b>	3,77	0,38	0,16	3,32	4,41	10,12

Tabela 2. Ukupni proteini jetre nakon 58. dana tova

Grupa	mg proteina/ ml homogenata $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	4,05 <sup>a</sup>	0,54	0,22	3,50	4,81	13,41
<b>O-I</b>	3,25 <sup>abcd</sup>	0,15	0,06	3,09	3,44	4,68
<b>O-II</b>	3,84 <sup>b</sup>	0,27	0,11	3,50	4,20	6,99
<b>O-III</b>	4,28 <sup>c</sup>	0,35	0,14	3,91	4,80	8,22
<b>O-IV</b>	3,88 <sup>d</sup>	0,19	0,08	3,68	4,25	5,02

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 3. Aktivnost SOD u uzorcima jetre brojlera nakon 42. dana tova

Grupa	mU/mg proteina $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,01	0,09	0,04	0,93	1,13	9,31
<b>O-I</b>	1,07 <sup>a</sup>	0,11	0,05	0,95	1,25	10,60
<b>O-II</b>	0,94	0,07	0,03	0,86	1,03	7,46
<b>O-III</b>	0,93 <sup>a</sup>	0,06	0,02	0,85	1,01	6,56
<b>O-IV</b>	1,02	0,02	0,01	0,99	1,05	2,43

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 4. Aktivnost SOD u uzorcima jetre brojlera nakon 58. dana tova

Grupa	mU/mg proteina $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,96 <sup>a</sup>	0,13	0,05	0,79	1,11	13,66
<b>O-I</b>	1,23 <sup>abcd</sup>	0,06	0,02	1,15	1,28	4,64
<b>O-II</b>	1,03 <sup>b</sup>	0,06	0,02	0,95	1,07	5,35
<b>O-III</b>	0,91 <sup>ce</sup>	0,05	0,02	0,86	0,98	5,09
<b>O-IV</b>	1,05 <sup>de</sup>	0,04	0,02	0,99	1,09	3,92

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e</sup>-P<0,05

Tabela 5. Aktivnost CAT u uzorcima jetre brojlera nakon 42. dana tova

Grupa	mU/mg proteina $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,46	0,44	0,18	0,82	1,90	29,95
<b>O-I</b>	1,69	0,50	0,20	0,94	2,25	29,48
<b>O-II</b>	1,80	0,41	0,17	1,27	2,27	22,64
<b>O-III</b>	1,61	0,35	0,14	1,19	2,10	21,49
<b>O-IV</b>	1,47	0,16	0,07	1,30	1,77	11,01

Tabela 6. Aktivnost CAT u uzorcima jetre brojlera nakon 58. dana tova

Grupa	mU/mg proteina $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,27 <sup>ab</sup>	0,35	0,14	0,82	1,68	27,57
<b>O-I</b>	1,75 <sup>acde</sup>	0,11	0,05	1,56	1,89	6,38
<b>O-II</b>	1,09 <sup>bc</sup>	0,23	0,09	0,83	1,40	20,75
<b>O-III</b>	0,83 <sup>df</sup>	0,13	0,05	0,64	1,03	15,95
<b>O-IV</b>	1,32 <sup>ef</sup>	0,27	0,11	1,00	1,63	20,44

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup>-P<0,05

Tabela 7. Aktivnost GSH-Px u uzorcima jetre brojlera nakon 42. dana tova

Grupa	mU/mg proteina $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	230,80 <sup>a</sup>	25,98	10,61	198,60	266,60	11,25
<b>O-I</b>	238,40 <sup>b</sup>	27,06	11,05	196,00	263,60	11,35
<b>O-II</b>	232,90 <sup>c</sup>	42,57	17,38	185,90	283,50	18,27
<b>O-III</b>	175,60 <sup>abcd</sup>	31,57	12,89	139,30	210,90	17,98
<b>O-IV</b>	261,60 <sup>d</sup>	25,93	10,58	222,60	291,90	9,91

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 8. Aktivnost GSH-Px u uzorcima jetre brojlera nakon 58. dana tova

Grupa	mU/mg proteina $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	129,50 <sup>ab</sup>	9,61	3,92	120,50	143,40	7,42
<b>O-I</b>	229,90 <sup>acd</sup>	68,69	28,04	168,20	316,30	29,88
<b>O-II</b>	208,00 <sup>be</sup>	9,39	3,83	199,60	222,60	4,51
<b>O-III</b>	142,70 <sup>ce</sup>	27,59	11,26	114,80	178,40	19,34
<b>O-IV</b>	169,20 <sup>d</sup>	13,24	5,41	148,80	185,20	7,83

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e</sup>-P<0,05

## Prilog E

## Histološke analize

Tabela 1. Duodenum, visina resice, 42. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1197 <sup>a</sup>	73,89	13,49	1066	1331	6,17
<b>O-I</b>	1212 <sup>b</sup>	79,81	14,57	1082	1341	6,59
<b>O-II</b>	1284 <sup>ab</sup>	68,50	12,51	1146	1460	5,33
<b>O-III</b>	1226	126,20	23,04	1036	1493	10,29
<b>O-IV</b>	1257	87,62	16,00	1109	1409	6,97

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

Tabela 2. Duodenum, visina resice, 58. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	996,10	102,70	18,74	804,50	1162	10,31
<b>O-I</b>	962,80	92,11	16,82	814,70	1143	9,57
<b>O-II</b>	964,10	63,17	11,53	844,00	1060	6,55
<b>O-III</b>	944,50	63,80	11,65	837,70	1049	6,76
<b>O-IV</b>	969,20	79,13	14,45	824,90	1121	8,16

Tabela 3. Duodenum, širina resice, 42. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	101,50 <sup>abc</sup>	11,33	2,07	80,36	122,50	11,16
<b>O-I</b>	101,70 <sup>def</sup>	7,70	1,41	89,07	114,00	7,57
<b>O-II</b>	87,01 <sup>adg</sup>	12,75	2,33	67,44	107,80	14,66
<b>O-III</b>	76,36 <sup>beg</sup>	10,92	1,99	59,36	95,34	14,30
<b>O-IV</b>	79,48 <sup>cf</sup>	9,61	1,99	64,28	96,17	12,09

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>-P<0,05

Tabela 4. Duodenum, širina resice, 58. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	77,57	11,60	2,12	58,55	97,36	14,95
<b>O-I</b>	77,50	9,67	1,77	61,41	97,03	12,47
<b>O-II</b>	81,36 <sup>a</sup>	7,01	1,28	67,87	92,15	8,62
<b>O-III</b>	84,85 <sup>b</sup>	7,59	1,39	70,52	97,03	8,94
<b>O-IV</b>	72,85 <sup>ab</sup>	15,31	2,80	52,93	98,22	21,02

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

Tabela 5. Duodenum, dubina kriпти, 42. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	162,90 <sup>abcd</sup>	19,76	3,61	135,60	200,80	12,13
<b>O-I</b>	133,60 <sup>a</sup>	11,66	2,13	117,80	156,70	8,73
<b>O-II</b>	131,30 <sup>b</sup>	10,99	2,01	113,60	163,00	8,38
<b>O-III</b>	131,40 <sup>c</sup>	14,35	2,62	109,30	156,40	10,92
<b>O-IV</b>	125,90 <sup>d</sup>	13,82	2,52	107,30	150,60	10,98

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 6. Duodenum, dubina kriпти, 58. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	153,70 <sup>abc</sup>	10,25	1,87	135,60	172,90	6,67
<b>O-I</b>	147,60 <sup>cdef</sup>	17,09	3,12	121,40	170,00	11,58
<b>O-II</b>	135,00 <sup>adg</sup>	15,10	2,76	111,50	166,00	11,19
<b>O-III</b>	137,10 <sup>beh</sup>	17,35	3,17	111,50	174,40	12,65
<b>O-IV</b>	122,10 <sup>cfgh</sup>	11,38	2,08	105,40	140,10	9,33

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup>-P<0,05

Tabela 7. Duodenum, odnos visina resice/dubina kriпти, 42. dan

Grupa	$\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	7,48 <sup>abcd</sup>	1,10	0,20	5,63	9,48	14,66
<b>O-I</b>	9,10 <sup>ac</sup>	0,90	0,16	7,52	10,76	9,86
<b>O-II</b>	9,86 <sup>b</sup>	1,09	0,20	7,72	12,68	11,08
<b>O-III</b>	9,38 <sup>c</sup>	0,85	0,15	8,01	10,79	9,04
<b>O-IV</b>	10,10 <sup>de</sup>	1,32	0,24	7,45	12,39	13,06

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e</sup>-P<0,05

Tabela 8. Duodenum, odnos visina resice/dubina kriпти, 58. dan

Grupa	$\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	6,50 <sup>a</sup>	0,75	0,14	5,03	7,55	11,51
<b>O-I</b>	6,63 <sup>b</sup>	1,15	0,21	4,85	9,09	17,29
<b>O-II</b>	7,22 <sup>c</sup>	0,85	0,16	5,70	8,81	11,79
<b>O-III</b>	7,02 <sup>d</sup>	1,15	0,21	5,23	8,92	16,35
<b>O-IV</b>	8,02 <sup>abcd</sup>	1,07	0,20	6,16	9,77	13,34

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 9. Jejunum, visina resice, 42. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	978,70 <sup>ab</sup>	16,95	16,95	857,7	1189	9,48
<b>O-I</b>	950,60 <sup>c</sup>	14,79	14,79	817	1115	8,52
<b>O-II</b>	1132,00 <sup>acde</sup>	24,17	24,17	868	1336	11,69
<b>O-III</b>	991,40 <sup>df</sup>	24,36	24,36	759	1218	13,46
<b>O-IV</b>	880,10 <sup>bef</sup>	16,64	16,64	711	1050	10,36

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup> -P<0,05

Tabela 10. Jejunum, visina resice, 58. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	812,90 <sup>abcd</sup>	108,30	19,78	641,80	984,70	13,33
<b>O-I</b>	965,70 <sup>a</sup>	156,30	28,53	698,60	1203,00	16,18
<b>O-II</b>	960,40 <sup>b</sup>	96,23	17,57	785,80	1131,00	10,02
<b>O-III</b>	938,60 <sup>c</sup>	89,61	16,36	791,00	1092,00	9,55
<b>O-IV</b>	904,00 <sup>d</sup>	112,10	20,46	737,00	1101,00	12,40

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup> -P<0,05

Tabela 11. Jejunum, širina resice, 42. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	81,21 <sup>ab</sup>	10,19	1,86	66,55	101,50	12,55
<b>O-I</b>	76,24 <sup>c</sup>	10,32	1,89	59,23	94,88	13,54
<b>O-II</b>	74,28 <sup>ad</sup>	9,48	1,73	58,64	95,05	12,76
<b>O-III</b>	75,16 <sup>e</sup>	7,01	1,28	65,01	88,19	9,33
<b>O-IV</b>	62,54 <sup>bcde</sup>	8,94	1,63	51,09	84,88	14,29

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e</sup> -P<0,05

Tabela 12. Jejunum, širina resice, 58. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	80,54 <sup>abc</sup>	9,25	1,69	59,13	97,93	11,49
<b>O-I</b>	82,60	9,69	1,77	65,43	101,10	11,73
<b>O-II</b>	88,00 <sup>a</sup>	8,07	1,47	71,83	101,50	9,17
<b>O-III</b>	87,83 <sup>b</sup>	9,45	1,73	70,28	102,60	10,76
<b>O-IV</b>	88,33 <sup>c</sup>	8,21	1,50	75,11	101,10	9,30

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c</sup> -P<0,05



Tabela 13. Jejunum, dubina kriпти, 42. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	98,34 <sup>abc</sup>	13,23	2,42	78,04	122,40	13,46
<b>O-I</b>	104,90 <sup>de</sup>	12,47	2,28	83,90	127,70	11,88
<b>O-II</b>	108,60 <sup>af</sup>	9,36	1,71	95,95	124,60	8,61
<b>O-III</b>	121,70 <sup>bdf</sup>	11,72	2,14	106,30	147,60	9,63
<b>O-IV</b>	114,20 <sup>ce</sup>	9,69	1,77	100,70	131,70	8,49

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup> -P<0,05

Tabela 14. Jejunum, dubina kriпти, 58. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	148,90 <sup>ab</sup>	11,32	2,07	132,00	172,60	7,60
<b>O-I</b>	134,70 <sup>a</sup>	10,17	1,86	117,80	154,10	7,55
<b>O-II</b>	142,20 <sup>c</sup>	16,33	2,98	115,60	171,40	11,49
<b>O-III</b>	143,50 <sup>d</sup>	13,71	2,50	120,50	170,50	9,55
<b>O-IV</b>	127,40 <sup>bcd</sup>	11,93	2,18	108,50	149,10	9,37

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup> -P<0,05

Tabela 15. Jejunum, odnos visina resice/dubina kriпти, 42. dan

Grupa	$\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	10,09 <sup>ab</sup>	1,42	0,26	8,11	13,37	14,03
<b>O-I</b>	9,17 <sup>cde</sup>	1,20	0,22	6,66	11,64	13,08
<b>O-II</b>	10,61 <sup>cfg</sup>	1,54	0,28	7,79	13,37	14,49
<b>O-III</b>	8,21 <sup>adf</sup>	1,27	0,23	5,43	10,59	15,49
<b>O-IV</b>	7,75 <sup>beg</sup>	0,99	0,18	6,32	10,15	12,74

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> -P<0,05

Tabela 16. Jejunum, odnos visina resice/dubina kriпти, 58. dan

Grupa	$\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	5,51 <sup>abcd</sup>	0,96	0,18	3,80	7,42	17,41
<b>O-I</b>	7,26 <sup>a</sup>	1,59	0,29	5,06	9,96	21,95
<b>O-II</b>	6,85 <sup>b</sup>	1,07	0,20	5,04	8,58	15,69
<b>O-III</b>	6,51 <sup>c</sup>	0,88	0,16	5,01	8,07	13,53
<b>O-IV</b>	7,13 <sup>d</sup>	0,86	0,16	5,22	9,00	12,11

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup> -P<0,05

Tabela 17. Ileum, visina resice, 42. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	563,30 <sup>ab</sup>	46,39	8,47	486,40	642,80	8,23
<b>O-I</b>	541,50	85,20	15,56	402,20	679,00	15,73
<b>O-II</b>	542,30	47,00	8,58	454,00	616,50	8,67
<b>O-III</b>	503,60 <sup>a</sup>	44,77	8,17	414,00	581,20	8,89
<b>O-IV</b>	503,90 <sup>b</sup>	46,33	8,46	431,80	596,00	9,19

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

Tabela 18. Ileum, visina resice, 58. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	590,10 <sup>abcd</sup>	78,19	14,27	472,20	753,70	13,25
<b>O-I</b>	505,90 <sup>a</sup>	57,17	10,44	429,00	624,50	11,30
<b>O-II</b>	531,10 <sup>b</sup>	78,15	14,27	407,20	640,50	14,71
<b>O-III</b>	492,30 <sup>c</sup>	38,35	7,00	433,10	564,60	7,79
<b>O-IV</b>	493,70 <sup>d</sup>	53,83	9,83	423,50	573,70	10,90

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 19. Ileum, širina resice, 42. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	66,56 <sup>ab</sup>	5,83	1,06	58,23	76,33	8,76
<b>O-I</b>	70,99 <sup>acde</sup>	6,64	1,21	61,11	81,06	9,35
<b>O-II</b>	60,23 <sup>bef</sup>	5,02	0,92	50,56	68,84	8,33
<b>O-III</b>	65,19 <sup>df</sup>	5,06	0,92	53,99	72,97	7,76
<b>O-IV</b>	64,14 <sup>e</sup>	7,25	1,32	53,22	77,02	11,30

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup>-P<0,05

Tabela 20. Ileum, širina resice, 58. dan

Grupa	$\mu\text{m}$ $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	65,53 <sup>abc</sup>	6,53	1,19	52,81	78,30	9,97
<b>O-I</b>	71,52 <sup>ad</sup>	6,96	1,27	58,60	81,20	9,73
<b>O-II</b>	63,95 <sup>def</sup>	7,72	1,41	51,84	80,55	12,07
<b>O-III</b>	72,85 <sup>be</sup>	5,95	1,09	63,42	85,15	8,16
<b>O-IV</b>	74,28 <sup>cf</sup>	6,99	1,28	60,57	86,52	9,41

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup>-P<0,05

Tabela 21. Ileum, dubina kriпти, 42. dan

Grupa	$\mu\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	118,50 <sup>abc</sup>	11,53	2,11	95,95	138,50	9,74
<b>O-I</b>	135,10 <sup>ad</sup>	12,58	2,30	118,00	157,10	9,31
<b>O-II</b>	141,80 <sup>be</sup>	10,32	1,88	123,80	160,70	7,28
<b>O-III</b>	139,50 <sup>cf</sup>	12,87	2,35	117,20	161,10	9,22
<b>O-IV</b>	120,10 <sup>def</sup>	10,64	1,94	103,80	142,20	8,85

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup> -P<0,05

Tabela 22. Ileum, dubina kriпти, 58. dan

Grupa	$\mu\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	131,30	17,51	3,20	103,30	156,90	13,34
<b>O-I</b>	130,40	9,79	1,79	115,50	148,40	7,51
<b>O-II</b>	136,30 <sup>a</sup>	9,53	1,74	121,80	157,30	6,99
<b>O-III</b>	136,10 <sup>b</sup>	8,02	1,46	123,80	149,30	5,89
<b>O-IV</b>	125,10 <sup>ab</sup>	10,04	1,83	106,80	140,60	8,03

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup> -P<0,05

Tabela 23. Ileum, odnos visina resice/dubina kriпти, 42. dan

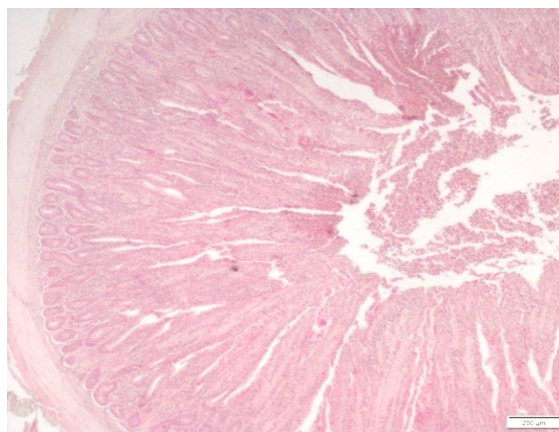
Grupa	$\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	4,79 <sup>abcd</sup>	0,56	0,10	3,73	5,94	11,60
<b>O-I</b>	4,06 <sup>ae</sup>	0,81	0,15	2,82	5,23	19,85
<b>O-II</b>	3,84 <sup>b</sup>	0,35	0,06	3,04	4,58	9,19
<b>O-III</b>	3,63 <sup>cef</sup>	0,36	0,07	2,98	4,37	9,91
<b>O-IV</b>	4,22 <sup>df</sup>	0,52	0,09	3,12	5,74	12,24

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup> -P<0,05

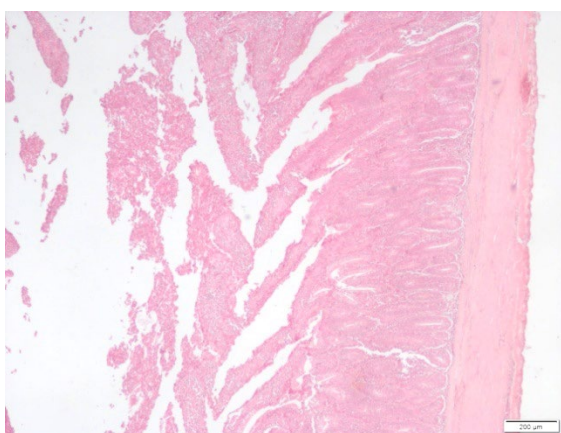
Tabela 24. Ileum, odnos visina resice/dubina kriпти, 58. dan

Grupa	$\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	4,54 <sup>abcd</sup>	0,67	0,12	3,38	5,99	14,67
<b>O-I</b>	3,90 <sup>a</sup>	0,54	0,10	2,94	5,02	13,86
<b>O-II</b>	3,93 <sup>b</sup>	0,73	0,13	2,71	5,05	18,68
<b>O-III</b>	3,63 <sup>c</sup>	0,37	0,07	2,94	4,32	10,27
<b>O-IV</b>	3,97 <sup>d</sup>	0,48	0,09	3,10	5,37	12,19

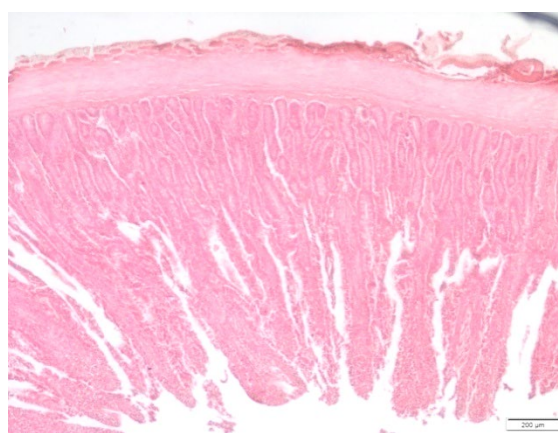
Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup> -P<0,05



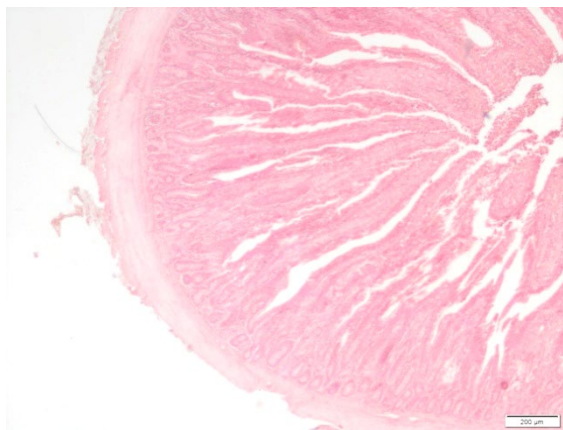
Slika 1. Duodenum kontrolne grupe brojlera, 58. dan tova (*H/E*, bar 200μm)



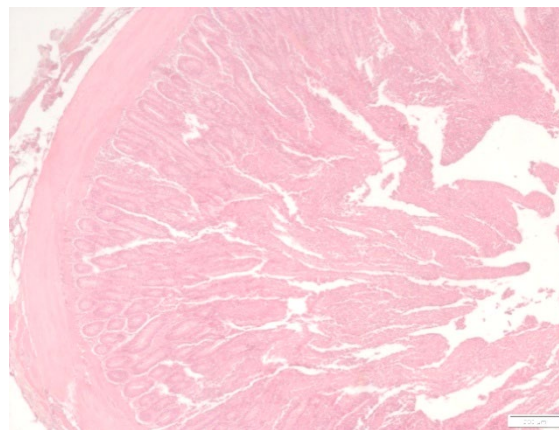
Slika 2. Duodenum grupe brojlera suplementirane sa 200 mg genisteina/kg hrane, 42. dan tova (*H/E*, bar 200μm)



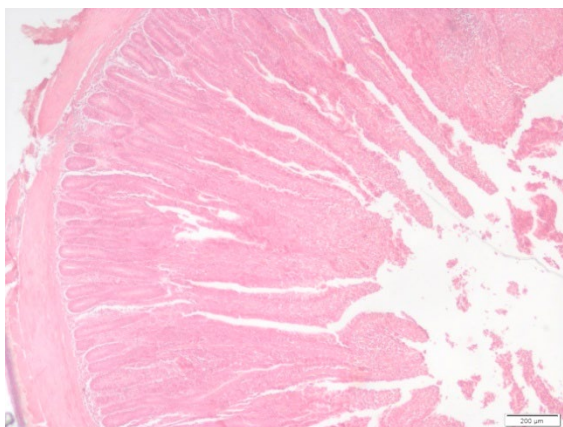
Slika 3. Duodenum grupe brojlera suplementirane sa 200 mg genisteina/kg hrane, 58. dan tova (*H/E*, bar 200μm)



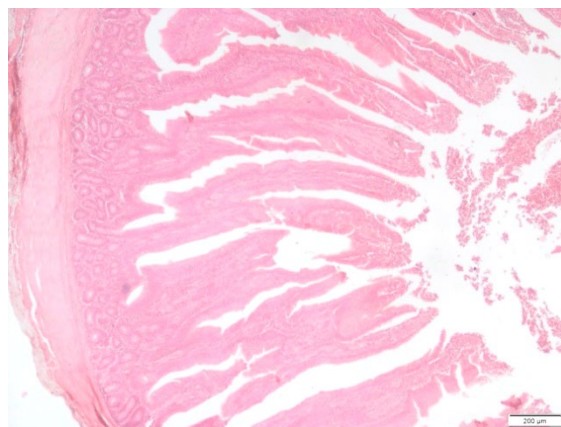
Slika 4. Duodenum grupe brojlera suplementirane sa 400 mg genisteina/kg hrane, 42. dan tova (*H/E*, bar 200μm)



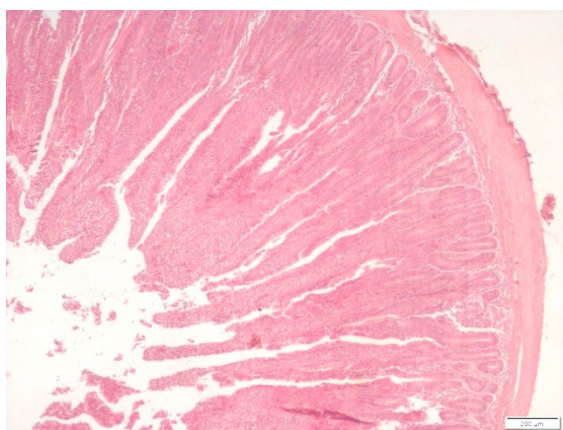
Slika 5. Duodenum grupe brojlera suplementirane sa 400 mg genisteina/kg hrane, 58. dan tova (*H/E*, bar 200μm)



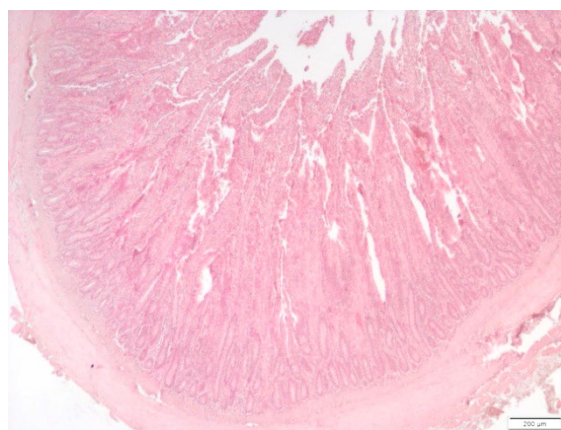
Slika 6. Duodenum grupe brojlera suplementirane sa 600 mg genisteina/kg hrane, 42. dan tova (*H/E*, bar 200 $\mu$ m)



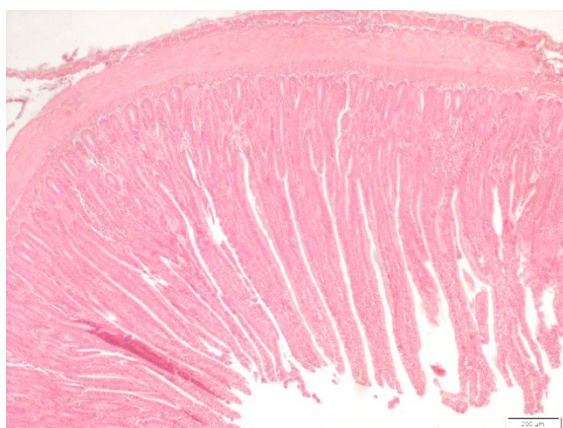
Slika 7. Duodenum grupe brojlera suplementirane sa 600 mg genisteina/kg hrane, 58. dan tova (*H/E*, bar 200 $\mu$ m)



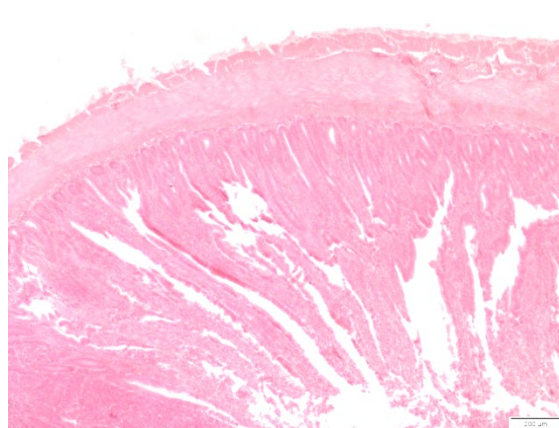
Slika 8. Duodenum grupe brojlera suplementirane sa 800 mg genisteina/kg hrane, 42. dan tova (*H/E*, bar 200 $\mu$ m)



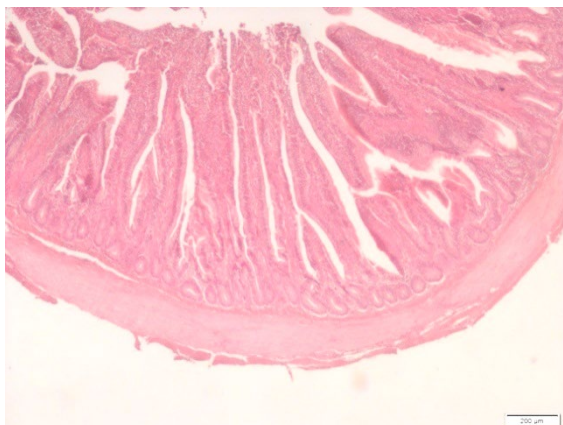
Slika 9. Duodenum grupe brojlera suplementirane sa 800 mg genisteina/kg hrane, 58. dan tova (*H/E*, bar 200 $\mu$ m)



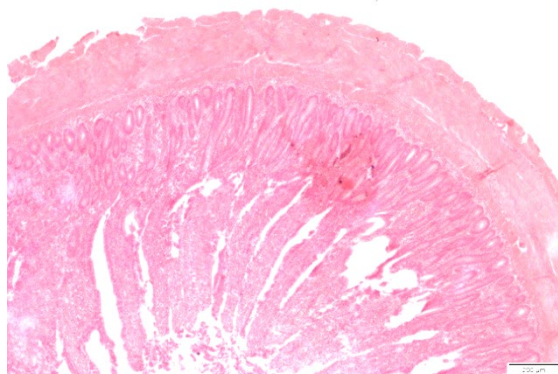
Slika 10. Jejunum kontrolne grupe brojlera, 42. dan tova (*H/E*, bar 200 $\mu$ m)



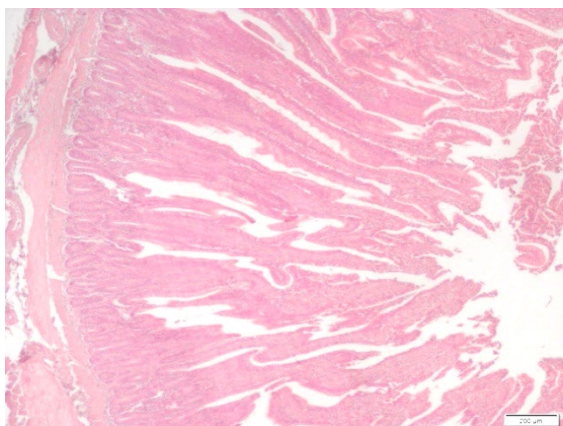
Slika 11. Jejunum kontrolne grupe brojlera, 58. dan tova (*H/E*, bar 200 $\mu$ m)



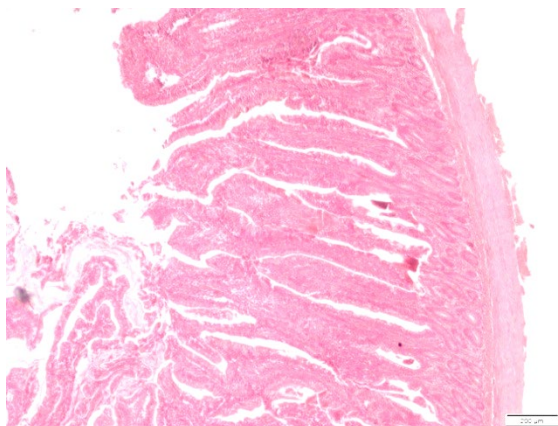
Slika 12. Jejunum grupe brojlera suplementirane sa 200 mg genisteina/kg hrane, 42. dan tova (*H/E*, bar 200 $\mu$ m)



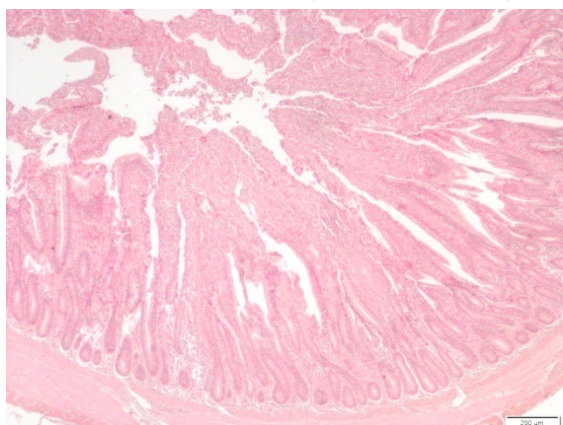
Slika 13. Jejunum grupe brojlera suplementirane sa 200 mg genisteina/kg hrane, 58. dan tova (*H/E*, bar 200 $\mu$ m)



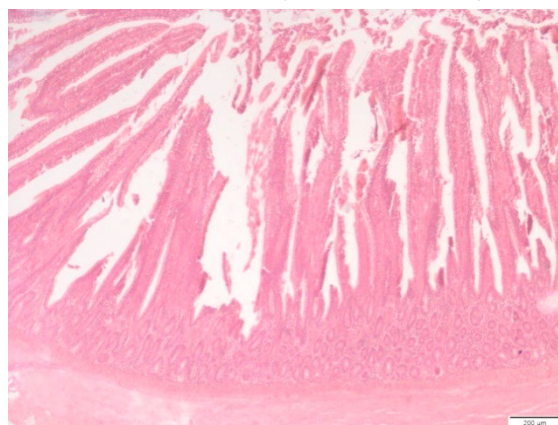
Slika 14. Jejunum grupe brojlera suplementirane sa 400 mg genisteina/kg hrane, 42. dan tova (*H/E*, bar 200 $\mu$ m)



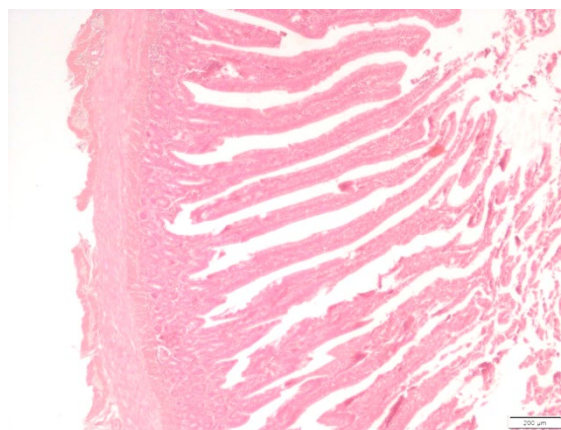
Slika 15. Jejunum grupe brojlera suplementirane sa 400 mg genisteina/kg hrane, 58. dan tova (*H/E*, bar 200 $\mu$ m)



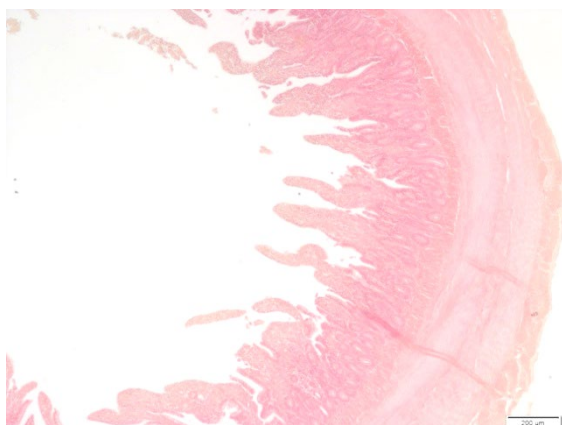
Slika 16. Jejunum grupe brojlera suplementirane sa 600 mg genisteina/kg hrane, 42. dan tova (*H/E*, bar 200 $\mu$ m)



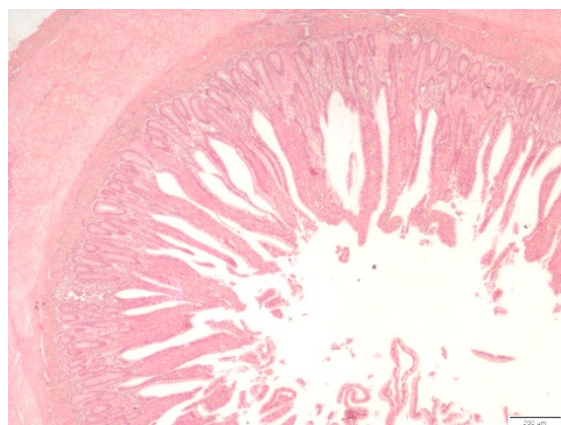
Slika 17. Jejunum grupe brojlera suplementirane sa 600 mg genisteina/kg hrane, 58. dan tova (*H/E*, bar 200 $\mu$ m)



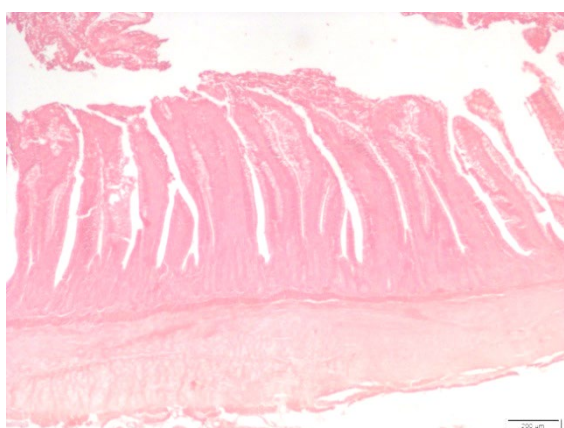
Slika 18. Jejunum grupe brojlera suplementirane sa 800 mg genisteina/kg hrane, 58. dan tova (H/E, bar 200μm)



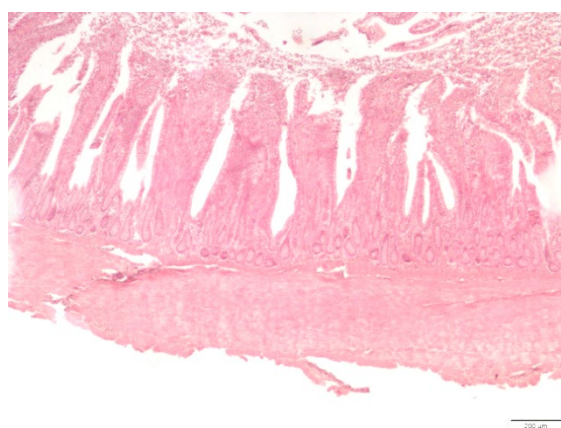
Slika 19. Ileum kontrolne grupe brojlera, 42. dan tova (H/E, bar 200μm)



Slika 20. Ileum kontrolne grupe brojlera, 58. dan tova (H/E, bar 200μm)



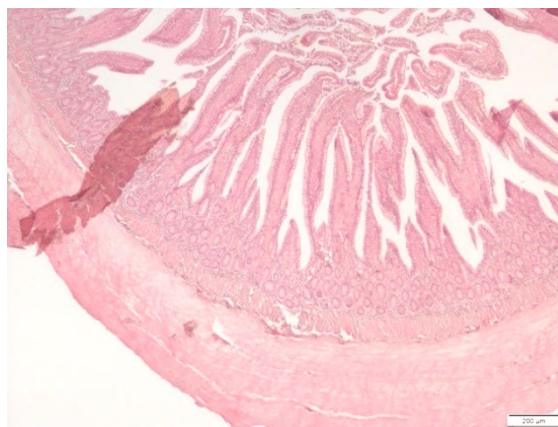
Slika 21. Ileum grupe brojlera suplementirane sa 200 mg genisteina/kg hrane, 42. dan tova (H/E, bar 200μm)



Slika 22. Ileum grupe brojlera suplementirane sa 200 mg genisteina/kg hrane, 58. dan tova (H/E, bar 200μm)



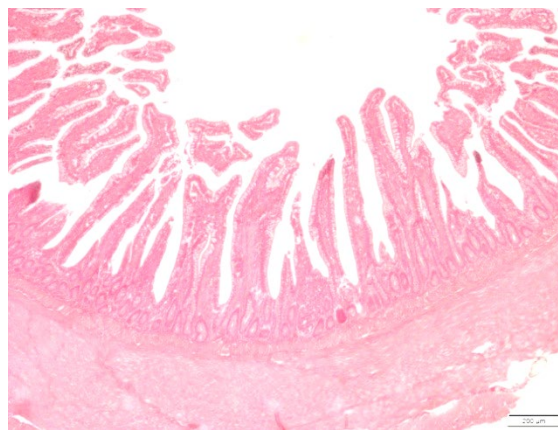
Slika 23. Ileum grupe brojlera suplementirane sa 400 mg genisteina/kg hrane, 42. dan tova (H/E, bar 200 $\mu$ m)



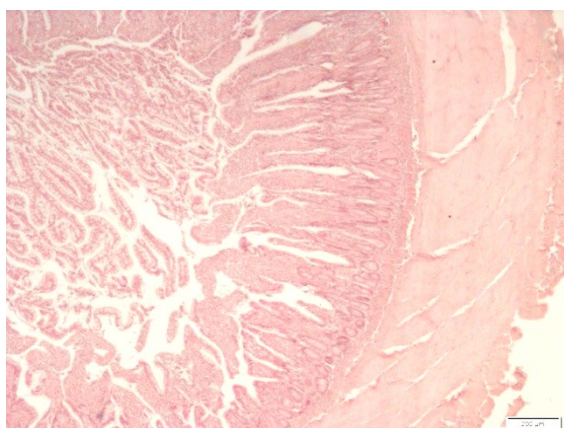
Slika 24. Ileum grupe brojlera suplementirane sa 400 mg genisteina/kg hrane, 58. dan tova (H/E, bar 200 $\mu$ m)



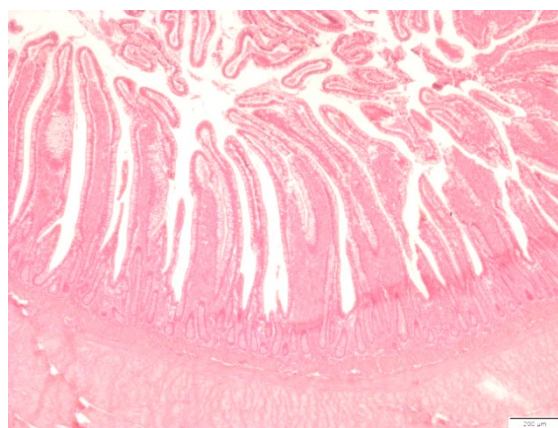
Slika 25. Ileum grupe brojlera suplementirane sa 600 mg genisteina/kg hrane, 42. dan tova (H/E, bar 200 $\mu$ m)



Slika 26. Ileum grupe brojlera suplementirane sa 600 mg genisteina/kg hrane, 58. dan tova (H/E, bar 200 $\mu$ m)



Slika 27. Ileum grupe brojlera suplementirane sa 800 mg genisteina/kg hrane, 42. dan tova (H/E, bar 200 $\mu$ m)



Slika 28. Ileum grupe brojlera suplementirane sa 800 mg genisteina/kg hrane, 58. dan tova (H/E, bar 200 $\mu$ m)



## Prilog F

## Mikrobiota cekuma

Tabela 1. Ukupan broj *Lactocacillus* spp. u cekumu brojlera starih 42 dana

Grupa	log CFU/g $\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	6,40 <sup>a</sup>	0,335	0,137	5,90	6,90	5,24
<b>O-I</b>	5,80 <sup>a</sup>	0,223	0,091	5,42	6,05	3,85
<b>O-II</b>	6,00	0,299	0,122	5,55	6,40	4,98
<b>O-III</b>	6,16	0,271	0,111	5,80	6,60	4,40
<b>O-IV</b>	5,93	0,300	0,122	5,60	6,45	5,05

Legenda: Isto slovo <sup>a</sup>-P<0,05Tabela 2. Ukupan broj *Lactocacillus* spp. u cekumu brojlera starih 58 dana

Grupa	log CFU/g $\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	5,62 <sup>abc</sup>	0,342	0,140	5,20	6,10	6,09
<b>O-I</b>	6,07	0,339	0,138	5,55	6,56	5,58
<b>O-II</b>	6,24 <sup>a</sup>	0,271	0,111	5,80	6,55	4,34
<b>O-III</b>	6,42 <sup>b</sup>	0,284	0,116	6,10	6,85	4,42
<b>O-IV</b>	6,38 <sup>c</sup>	0,296	0,121	6,05	6,90	4,64

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c</sup>-P<0,05

## Prilog G

## Analize kostiju

Tabela 1. Masa tibije 42. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
K	12,00 <sup>abc</sup>	1,12	0,37	11,00	14,00	9,32
O-I	14,67 <sup>a</sup>	1,12	0,37	13,00	16,00	7,62
O-II	15,33 <sup>bd</sup>	1,41	0,47	13,00	17,00	9,22
O-III	14,00 <sup>c</sup>	1,41	0,47	12,00	16,00	10,10
O-IV	13,33 <sup>d</sup>	1,41	0,47	12,00	16,00	10,61

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 2. Masa tibije 58. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
K	17,89	2,76	0,92	15,00	22,00	15,42
O-I	18,89	2,47	0,82	15,00	22,00	13,09
O-II	19,00	2,69	0,90	16,00	24,00	14,17
O-III	17,56	2,07	0,69	15,00	21,00	11,78
O-IV	20,00	2,24	0,75	17,00	23,00	11,18

Tabela 3. Relativna masa tibije (% žive mase), 42. dan

Grupa	$\frac{\%}{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
K	0,51	0,077	0,026	0,40	0,64	15,29
O-I	0,55	0,047	0,016	0,49	0,63	8,58
O-II	0,55	0,094	0,031	0,42	0,67	17,01
O-III	0,49	0,085	0,028	0,38	0,65	17,37
O-IV	0,47	0,046	0,016	0,40	0,54	9,91

Tabela 4. Relativna masa tibije (% žive mase), 58. dan

Grupa	$\frac{\%}{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
K	0,43	0,076	0,025	0,32	0,53	17,75
O-I	0,46	0,089	0,030	0,34	0,58	19,43
O-II	0,44	0,054	0,018	0,36	0,53	12,44
O-III	0,45	0,088	0,029	0,35	0,61	19,56
O-IV	0,48	0,075	0,025	0,37	0,63	15,45

Tabela 5. Sadržaj pepela tibije, 42. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	42,15 <sup>abc</sup>	1,79	0,73	39,95	44,11	4,24
<b>O-I</b>	49,19 <sup>ade</sup>	0,63	0,26	48,25	49,95	1,28
<b>O-II</b>	49,27 <sup>bfg</sup>	0,61	0,25	48,21	49,88	1,24
<b>O-III</b>	44,24 <sup>cdh</sup>	0,41	0,17	43,72	44,86	0,93
<b>O-IV</b>	41,62 <sup>egh</sup>	0,82	0,34	40,65	42,63	1,98

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup>-P<0,05

Tabela 6. Sadržaj pepela tibije, 58. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	42,96 <sup>ab</sup>	0,44	0,18	42,39	43,46	1,02
<b>O-I</b>	36,77 <sup>acd</sup>	1,58	0,64	34,28	38,57	4,29
<b>O-II</b>	39,05 <sup>b</sup>	1,45	0,59	37,38	41,02	3,70
<b>O-III</b>	40,94 <sup>c</sup>	1,69	0,69	38,95	42,99	4,12
<b>O-IV</b>	41,32 <sup>d</sup>	2,78	1,14	37,10	44,60	6,73

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 7. Sadržaj Ca tibije, 42. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	15,32 <sup>abc</sup>	0,35	0,14	14,90	15,80	2,27
<b>O-I</b>	17,33 <sup>adef</sup>	0,11	0,05	17,18	17,45	0,65
<b>O-II</b>	16,75 <sup>bdgh</sup>	0,33	0,13	16,25	17,11	1,95
<b>O-III</b>	15,53 <sup>eg</sup>	0,31	0,13	15,00	15,85	1,98
<b>O-IV</b>	14,24 <sup>cfh</sup>	0,29	0,12	13,82	14,55	2,02

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup>-P<0,05

Tabela 8. Sadržaj Ca tibije, 58. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	14,91 <sup>ab</sup>	0,28	0,11	14,41	15,22	1,89
<b>O-I</b>	12,95 <sup>acd</sup>	0,35	0,14	12,56	13,29	2,72
<b>O-II</b>	13,66 <sup>b</sup>	0,23	0,09	13,31	14,00	1,67
<b>O-III</b>	14,35 <sup>c</sup>	0,33	0,13	13,90	14,81	2,28
<b>O-IV</b>	14,74 <sup>d</sup>	1,52	0,62	13,28	17,22	10,29

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 9. Sadržaj P tibije, 42. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	8,23	0,34	0,14	7,81	8,67	4,10
<b>O-I</b>	8,60 <sup>ab</sup>	0,66	0,27	7,67	9,18	7,67
<b>O-II</b>	8,34 <sup>cd</sup>	0,20	0,08	8,02	8,56	2,39
<b>O-III</b>	7,63 <sup>ac</sup>	0,17	0,07	7,40	7,88	2,23
<b>O-IV</b>	7,55 <sup>bd</sup>	0,50	0,20	7,03	8,28	6,57

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 10. Sadržaj P tibije, 58. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	7,35	0,22	0,09	7,14	7,76	3,04
<b>O-I</b>	6,68 <sup>a</sup>	0,38	0,16	6,36	7,40	5,75
<b>O-II</b>	8,13 <sup>abc</sup>	0,69	0,28	7,47	9,07	8,54
<b>O-III</b>	7,28 <sup>b</sup>	0,52	0,21	6,88	8,00	7,18
<b>O-IV</b>	7,24 <sup>c</sup>	0,41	0,17	6,81	7,94	5,66

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c</sup>-P<0,05

## Prilog H

## Klanični parametri

Tabela 1. Masa trupa nakon klanja 42. dan

Grupa	$\frac{g}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1718 <sup>abcd</sup>	292,60	53,42	1379	2284	17,03
<b>O-I</b>	1898 <sup>a</sup>	177,00	32,32	1659	2261	9,33
<b>O-II</b>	2004 <sup>b</sup>	243,40	44,44	1659	2331	12,15
<b>O-III</b>	1980 <sup>c</sup>	284,70	51,99	1577	2362	14,38
<b>O-IV</b>	2005 <sup>d</sup>	222,90	40,69	1660	2381	11,12

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 2. Masa trupa nakon klanja 58. dan

Grupa	$\frac{g}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	2876	347,9	63,52	2330	3320	12,10
<b>O-I</b>	3036	386,6	70,58	2449	3833	12,73
<b>O-II</b>	3074 <sup>a</sup>	335,9	61,33	2530	3616	10,93
<b>O-III</b>	2808 <sup>ab</sup>	370,7	67,68	2084	3572	13,20
<b>O-IV</b>	3085 <sup>b</sup>	370,9	67,72	2615	3559	12,02

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

Tabela 3. Prinos mesa brojlera- randman 42. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	69,06 <sup>ab</sup>	1,26	0,23	67,38	70,87	1,83
<b>O-I</b>	70,25 <sup>a</sup>	1,48	0,27	67,86	72,06	2,11
<b>O-II</b>	69,26	1,71	0,31	66,19	71,32	2,46
<b>O-III</b>	69,32	1,51	0,28	65,57	71,23	2,17
<b>O-IV</b>	70,13 <sup>b</sup>	1,06	0,19	68,40	71,62	1,50

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

Tabela 4. Prinos mesa brojlera- randman 58. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	71,40 <sup>abcd</sup>	3,49	0,64	65,16	76,78	4,89
<b>O-I</b>	75,35 <sup>ae</sup>	1,57	0,29	73,35	78,33	2,08
<b>O-II</b>	74,50 <sup>b</sup>	2,08	0,38	70,16	78,09	2,79
<b>O-III</b>	73,34 <sup>cef</sup>	2,14	0,39	69,94	76,57	2,92
<b>O-IV</b>	75,29 <sup>df</sup>	1,39	0,25	72,90	77,51	1,85

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup>-P<0,05

Tabela 5. Masa grudi, 42. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	702,60 <sup>abc</sup>	105,00	33,20	576	934	14,94
<b>O-I</b>	817,20	47,09	14,89	754	927	5,76
<b>O-II</b>	854,80 <sup>a</sup>	107,10	33,86	689	971	12,53
<b>O-III</b>	869,60 <sup>b</sup>	93,80	29,66	707	1003	10,79
<b>O-IV</b>	863,80 <sup>c</sup>	87,07	27,53	737	1014	10,08

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c</sup>-P<0,05

Tabela 6. Masa grudi, 58. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1267	137,00	43,31	1085	1462	10,81
<b>O-I</b>	1350	134,80	42,64	1154	1542	9,99
<b>O-II</b>	1340	150,50	47,58	1084	1605	11,23
<b>O-III</b>	1277	114,30	36,15	1111	1495	8,96
<b>O-IV</b>	1391	154,90	49,00	1162	1596	11,14

Tabela 7. Masa bataka sa karabatakom, 42. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	503,50	78,92	24,96	398	666	15,67
<b>O-I</b>	548,20	49,38	15,62	488	648	9,01
<b>O-II</b>	572,60	61,75	19,53	451	666	10,78
<b>O-III</b>	565,50	66,56	21,05	489	667	11,77
<b>O-IV</b>	559,70	74,19	23,46	460	677	13,25

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 8. Masa bataka sa karabatakom, 58. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	828,00	94,88	30,00	702	991	11,46
<b>O-I</b>	870,90	165,50	52,34	738	1251	19,01
<b>O-II</b>	830,40	120,40	38,09	664	1030	14,50
<b>O-III</b>	796,00	111,60	35,29	664	980	14,02
<b>O-IV</b>	849,20	111,90	35,37	716	999	13,17

Tabela 9. Masa leđa, 42. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	393,10 <sup>a</sup>	69,02	21,83	288	497	17,56
<b>O-I</b>	419,60	43,48	13,75	355	503	10,36
<b>O-II</b>	461,30	60,11	19,01	365	555	13,03
<b>O-III</b>	486,50 <sup>a</sup>	73,59	23,27	398	590	15,13
<b>O-IV</b>	449,00	60,38	19,09	340	540	13,45

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 10. Masa leđa, 58. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	592,80	68,59	21,69	515	712	11,57
<b>O-I</b>	585,20	105,90	33,49	461	759	18,09
<b>O-II</b>	582,30	51,14	16,17	511	671	8,78
<b>O-III</b>	549,30	76,17	24,09	430	671	13,87
<b>O-IV</b>	596,40	70,48	22,29	516	710	11,82

Tabela 11. Masa krila, 42. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	173,10 <sup>a</sup>	20,98	6,63	142	216	12,12
<b>O-I</b>	187,30	14,04	4,44	161	206	7,50
<b>O-II</b>	195,30	23,93	7,57	156	242	12,25
<b>O-III</b>	203,50 <sup>a</sup>	15,91	5,03	179	233	7,82
<b>O-IV</b>	192,90	14,25	4,51	173	221	7,39

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 12. Masa krila, 58. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	296,40	30,48	9,64	260	341	10,28
<b>O-I</b>	305,80	38,17	12,07	263	363	12,48
<b>O-II</b>	270,50	48,31	15,28	195	332	17,86
<b>O-III</b>	283,50	41,03	12,98	236	356	14,47
<b>O-IV</b>	304,90	39,20	12,40	258	371	12,86

Tabela 13. Masa vrata, 42. dan

Grupa	$\frac{g}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	92,18	27,22	8,21	55	157	29,53
<b>O-I</b>	91,00	7,65	2,21	77	103	8,41
<b>O-II</b>	93,64	22,83	6,88	48	129	24,38
<b>O-III</b>	87,46	12,82	3,56	72	108	14,65
<b>O-IV</b>	85,45	10,50	3,17	70	101	12,29

Tabela 14. Masa vrata, 58. dan

Grupa	$\frac{g}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	142,00	16,44	5,20	125	174	11,58
<b>O-I</b>	141,80	16,92	5,35	116	170	11,93
<b>O-II</b>	125,40	22,96	7,26	100	161	18,31
<b>O-III</b>	132,20	16,84	5,33	95	151	12,74
<b>O-IV</b>	123,30	16,53	5,23	101	154	13,41

Tabela 15. Udeo mase grudi u masi ohlađenog trupa, 42. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	37,63 <sup>a</sup>	1,45	0,46	35,00	39,58	3,86
<b>O-I</b>	39,66	1,88	0,59	36,64	42,38	4,74
<b>O-II</b>	39,27	1,81	0,57	36,52	42,22	4,62
<b>O-III</b>	39,27	1,74	0,55	37,54	41,81	4,43
<b>O-IV</b>	40,20 <sup>a</sup>	1,95	0,62	37,63	44,09	4,85

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 16. Udeo mase grudi u masi ohlađenog trupa, 58. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	40,54	1,59	0,50	38,78	43,55	3,93
<b>O-I</b>	41,66	2,98	0,94	35,92	47,12	7,14
<b>O-II</b>	42,58	1,97	0,62	39,04	46,05	4,63
<b>O-III</b>	42,14	1,91	0,60	38,67	44,46	4,54
<b>O-IV</b>	42,62	1,02	0,32	40,85	43,98	2,38



Tabela 17. Udeo mase bataka sa karabtakom u masi ohlađenog trupa, 42. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	26,95	1,38	0,44	25,62	30,15	5,11
<b>O-I</b>	26,55	1,12	0,36	25,05	28,72	4,23
<b>O-II</b>	26,35	1,01	0,32	24,83	28,39	3,84
<b>O-III</b>	25,51	0,89	0,28	24,58	27,12	3,48
<b>O-IV</b>	25,96	1,33	0,42	23,58	27,83	5,11

Tabela 18. Udeo mase bataka sa karabatakom u masi ohlađenog, 58. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	26,46	0,65	0,21	25,70	27,53	2,47
<b>O-I</b>	26,65	2,35	0,74	23,00	31,91	8,80
<b>O-II</b>	26,30	1,41	0,45	23,99	28,28	5,36
<b>O-III</b>	26,16	1,41	0,44	23,40	28,03	5,38
<b>O-IV</b>	25,97	0,87	0,27	24,95	27,28	3,34

Tabela 19. Udeo mase leđa u masi ohlađenog trupa, 42. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	21,05	2,14	0,68	17,07	23,45	10,15
<b>O-I</b>	20,30	1,01	0,32	18,35	22,04	4,99
<b>O-II</b>	21,18	0,99	0,31	19,44	22,38	4,68
<b>O-III</b>	21,89	1,35	0,43	20,15	23,56	6,16
<b>O-IV</b>	20,81	0,93	0,29	19,10	22,00	4,45

Tabela 20. Udeo mase leđa u masi ohlađenog trupa, 58. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	18,97	1,09	0,34	16,93	20,74	5,75
<b>O-I</b>	17,90	1,39	0,44	15,48	19,59	7,74
<b>O-II</b>	18,55	0,92	0,29	16,59	19,71	4,96
<b>O-III</b>	18,04	0,64	0,20	16,96	19,12	3,57
<b>O-IV</b>	18,28	0,74	0,23	17,33	19,39	4,04

Tabela 21. Udeo mase krila u masi ohlađenog trupa, 42. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	9,30	0,44	0,14	8,69	10,07	4,75
<b>O-I</b>	9,08	0,46	0,14	8,26	9,65	5,04
<b>O-II</b>	8,99	0,56	0,18	8,09	9,61	6,24
<b>O-III</b>	9,22	0,48	0,15	8,38	10,08	5,24
<b>O-IV</b>	9,00	0,51	0,16	8,26	9,72	5,63

Tabela 22. Udeo mase krila u masi ohlađenog trupa, 58. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	9,49 <sup>a</sup>	0,42	0,13	8,95	10,39	4,42
<b>O-I</b>	9,41	0,57	0,18	8,66	10,63	6,09
<b>O-II</b>	8,58 <sup>a</sup>	1,15	0,36	6,36	9,85	13,44
<b>O-III</b>	9,31	0,48	0,15	8,72	10,30	5,19
<b>O-IV</b>	9,34	0,51	0,16	8,44	10,19	5,41

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 23. Udeo mase vrata u masi ohlađenog trupa, 42. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	5,07 <sup>abc</sup>	0,59	0,19	4,39	6,36	11,58
<b>O-I</b>	4,41	0,38	0,12	3,95	5,18	8,51
<b>O-II</b>	4,22 <sup>a</sup>	0,84	0,26	2,67	5,17	19,85
<b>O-III</b>	4,11 <sup>b</sup>	0,53	0,17	3,42	5,02	12,95
<b>O-IV</b>	4,03 <sup>c</sup>	0,34	0,11	3,45	4,66	8,34

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c</sup>-P<0,05

Tabela 24. Udeo mase vrata u masi ohlađenog trupa, 58. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	4,55 <sup>a</sup>	0,34	0,11	4,01	5,24	7,47
<b>O-I</b>	4,38	0,51	0,16	3,75	5,44	11,73
<b>O-II</b>	3,99	0,64	0,20	3,02	5,04	16,12
<b>O-III</b>	4,36	0,49	0,16	3,63	5,06	11,27
<b>O-IV</b>	3,80 <sup>a</sup>	0,46	0,14	2,83	4,44	12,00

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 25. Masa delova grudi-meso, 42. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	535,80 <sup>abc</sup>	83,94	26,54	447	717	15,67
<b>O-I</b>	624,50	43,89	13,88	562	716	7,03
<b>O-II</b>	653,40 <sup>a</sup>	78,58	24,85	506	740	12,03
<b>O-III</b>	667,80 <sup>b</sup>	70,96	22,44	539	745	10,63
<b>O-IV</b>	676,10 <sup>c</sup>	74,26	23,48	561	801	10,98

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c</sup>-P<0,05

Tabela 26. Masa delova grudi - meso, 58. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	980,60	119,90	37,93	840	1135	12,23
<b>O-I</b>	1065,00	104,70	33,11	876	1216	9,83
<b>O-II</b>	1107,00	96,33	30,46	984	1269	8,70
<b>O-III</b>	990,10	98,36	31,10	890	1170	9,93
<b>O-IV</b>	1077,00	137,30	43,41	871	1262	12,75

Tabela 27. Masa delova grudi - koža, 42. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	64,60	12,55	3,97	49	82	19,42
<b>O-I</b>	64,40	17,30	5,47	29	82	26,87
<b>O-II</b>	71,80	9,31	2,94	60	83	12,96
<b>O-III</b>	70,20	13,01	4,11	53	93	18,53
<b>O-IV</b>	60,90	13,19	4,17	41	81	21,67

Tabela 28. Masa delova grudi - koža, 58. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	89,90	13,19	4,17	70	108	14,67
<b>O-I</b>	98,60	16,63	5,26	73	120	16,86
<b>O-II</b>	97,80	15,40	4,87	62	120	15,75
<b>O-III</b>	94,80	13,16	4,16	72	113	13,89
<b>O-IV</b>	91,20	14,10	4,46	70	115	15,46

Tabela 29. Masa delova grudi - kost, 42. dan

Grupa	$\frac{g}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	93,20 <sup>abcd</sup>	23,95	7,57	60	138	25,70
<b>O-I</b>	127,70 <sup>a</sup>	13,00	4,11	107	148	10,18
<b>O-II</b>	133,10 <sup>b</sup>	29,57	9,35	81	174	22,22
<b>O-III</b>	134,10 <sup>c</sup>	17,70	5,60	106	167	13,20
<b>O-IV</b>	128,70 <sup>d</sup>	13,70	4,33	96	143	10,64

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 30. Masa delova grudi - kost, 58. dan

Grupa	$\frac{g}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	199,90	23,10	7,31	161	236	11,56
<b>O-I</b>	197,00	28,81	9,11	159	264	14,63
<b>O-II</b>	218,20	42,53	13,45	155	295	19,49
<b>O-III</b>	195,30	24,55	7,76	168	236	12,57
<b>O-IV</b>	232,20	35,60	11,26	185	302	15,33

Tabela 31. Udeo mase mesa u masi grudi brojlera, 42. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	77,26	2,65	0,84	71,71	80,53	3,43
<b>O-I</b>	76,46	2,31	0,73	73,56	79,38	3,02
<b>O-II</b>	76,21	2,41	0,76	72,91	79,92	3,16
<b>O-III</b>	76,59	1,67	0,53	74,13	79,13	2,18
<b>O-IV</b>	78,04	1,20	0,38	76,00	79,64	1,54

Tabela 32. Udeo mase mesa u masi grudi brojlera, 58. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	77,10	1,89	0,60	73,94	80,84	2,45
<b>O-I</b>	78,27	1,48	0,47	75,78	79,89	1,89
<b>O-II</b>	77,88	1,73	0,55	75,27	80,54	2,22
<b>O-III</b>	77,30	1,96	0,62	74,24	80,41	2,53
<b>O-IV</b>	76,83	1,84	0,58	73,68	79,79	2,40

Tabela 33. Udeo mase kože u masi grudi brojlera, 42. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	9,30 <sup>a</sup>	0,99	0,31	8,43	10,98	10,63
<b>O-I</b>	7,86	2,02	0,64	3,86	10,10	25,64
<b>O-II</b>	8,38	0,46	0,15	7,29	8,82	5,53
<b>O-III</b>	8,02	0,90	0,28	6,41	9,25	11,19
<b>O-IV</b>	7,01 <sup>a</sup>	1,28	0,40	5,16	9,57	18,25

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 34. Udeo mase kože u masi grudi brojlera, 58. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	7,09	0,90	0,29	5,70	8,71	12,74
<b>O-I</b>	7,23	0,87	0,28	5,91	8,83	12,08
<b>O-II</b>	6,87	0,92	0,29	5,01	8,16	13,42
<b>O-III</b>	7,42	0,95	0,30	6,24	8,50	12,75
<b>O-IV</b>	6,55	0,97	0,31	5,01	8,37	14,75

Tabela 35. Udeo mase kosti u masi grudi brojlera, 42. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	13,45	2,83	0,90	9,42	19,01	21,05
<b>O-I</b>	15,68	1,81	0,57	13,14	19,68	11,57
<b>O-II</b>	15,42	2,33	0,74	11,30	18,63	15,09
<b>O-III</b>	15,39	1,33	0,42	13,25	16,95	8,67
<b>O-IV</b>	14,95	1,76	0,56	11,35	17,40	11,75

Tabela 36. Udeo mase kosti u masi grudi brojlera, 58. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	15,81	1,75	0,55	13,46	19,45	11,04
<b>O-I</b>	14,51	1,79	0,57	12,82	17,91	12,33
<b>O-II</b>	15,25	1,93	0,61	12,06	17,75	12,64
<b>O-III</b>	15,28	1,60	0,51	12,82	17,33	10,47
<b>O-IV</b>	16,62	1,91	0,61	13,52	19,67	11,52

Tabela 37. Masa delova bataka sa karabatakom - meso, 42. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	169,60	27,51	8,70	131	225	16,22
<b>O-I</b>	190,80	20,36	6,44	166	225	10,67
<b>O-II</b>	192,10	20,19	6,39	160	228	10,51
<b>O-III</b>	194,50	28,72	9,08	158	234	14,77
<b>O-IV</b>	190,30	30,62	9,68	152	234	16,09

Tabela 38. Masa delova bataka sa karabatakom - meso, 58. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	282,50	32,74	10,35	240	333	11,59
<b>O-I</b>	312,10	76,35	24,14	251	497	24,46
<b>O-II</b>	298,20	44,65	14,12	235	377	14,97
<b>O-III</b>	281,90	48,14	15,22	225	367	17,08
<b>O-IV</b>	296,10	42,34	13,39	236	346	14,30

Tabela 39. Masa delova bataka sa karabatakom - koža, 42. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	38,80	7,16	2,27	29	55	18,46
<b>O-I</b>	39,10	8,28	2,62	29	59	21,17
<b>O-II</b>	36,60	4,86	1,54	31	44	13,27
<b>O-III</b>	35,00	6,91	2,19	27	45	19,75
<b>O-IV</b>	35,10	9,39	2,97	24	51	26,74

Tabela 40. Masa delova bataka sa karabatakom - koža, 58. dan

Grupa	$\frac{g}{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	62,70 <sup>a</sup>	9,75	3,08	53	86	15,56
<b>O-I</b>	56,50	9,08	2,87	41	72	16,08
<b>O-II</b>	52,60	9,66	3,06	38	68	18,37
<b>O-III</b>	53,30	6,43	2,03	43	62	12,06
<b>O-IV</b>	48,00 <sup>a</sup>	10,99	3,48	33	68	22,91

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 41. Masa delova bataka sa karabatakom - kosti, 42. dan

Grupa	$\frac{g}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	41,60 <sup>ab</sup>	10,20	3,23	24	59	24,52
<b>O-I</b>	48,20	5,57	1,76	38	59	11,56
<b>O-II</b>	52,80	14,56	4,60	37	88	27,57
<b>O-III</b>	52,00 <sup>a</sup>	7,20	2,28	42	66	13,84
<b>O-IV</b>	53,00 <sup>b</sup>	6,60	2,09	43	62	12,45

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

Tabela 42. Masa delova bataka sa karabatakom - kosti, 58. dan

Grupa	$\frac{g}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	71,80	15,31	4,84	49	98	21,32
<b>O-I</b>	70,30	11,86	3,75	59	91	16,87
<b>O-II</b>	73,00	14,64	4,63	57	98	20,05
<b>O-III</b>	64,70 <sup>a</sup>	12,25	3,87	52	85	18,93
<b>O-IV</b>	85,80 <sup>a</sup>	14,16	4,48	63	104	16,50

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 43. Udeo mase mesa u masi bataka sa karabatakom, 42. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	67,90	1,15	0,36	66,37	70,36	1,69
<b>O-I</b>	68,55	2,39	0,76	66,26	74,26	3,49
<b>O-II</b>	68,45	3,44	1,09	59,38	70,54	5,02
<b>O-III</b>	68,99	2,64	0,84	63,20	72,38	3,83
<b>O-IV</b>	68,22	2,97	0,94	63,57	72,37	4,35

Tabela 44. Udeo mase mesa u masi bataka sa karabatakom, 58. dan

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	67,73	2,20	0,70	62,84	69,97	3,25
<b>O-I</b>	70,73	2,81	0,89	67,17	75,99	3,97
<b>O-II</b>	70,28	2,67	0,85	66,76	73,90	3,80
<b>O-III</b>	70,33	1,85	0,59	67,61	72,96	2,63
<b>O-IV</b>	68,79	3,34	1,06	60,98	71,76	4,85

Tabela 45. Udeo mase kože u masi bataka sa karabatakom, 42. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	15,65 <sup>ab</sup>	2,38	0,75	12,65	19,69	15,22
<b>O-I</b>	14,08	2,57	0,81	9,57	18,10	18,27
<b>O-II</b>	13,01	0,66	0,21	11,94	13,90	5,05
<b>O-III</b>	12,47 <sup>a</sup>	2,20	0,70	10,26	17,20	17,63
<b>O-IV</b>	12,65 <sup>b</sup>	3,16	1,00	9,41	18,35	24,96

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

Tabela 46. Udeo mase kože u masi bataka sa karabatakom, 58. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	15,20 <sup>a</sup>	2,83	0,90	11,67	21,03	18,63
<b>O-I</b>	13,10	2,19	0,69	9,26	16,62	16,69
<b>O-II</b>	12,58	2,74	0,87	9,24	16,83	21,80
<b>O-III</b>	13,53	2,20	0,69	10,74	16,86	16,23
<b>O-IV</b>	11,30 <sup>a</sup>	2,75	0,87	7,28	16,59	24,35

Legenda: Ista slova <sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 47. Udeo mase kosti u masi bataka sa karabatakom, 42. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	16,46	2,10	0,67	12,44	19,20	12,78
<b>O-I</b>	17,37	1,83	0,58	15,51	21,69	10,52
<b>O-II</b>	18,55	3,23	1,02	16,23	27,08	17,44
<b>O-III</b>	18,54	1,90	0,60	16,67	21,85	10,23
<b>O-IV</b>	19,13	1,67	0,53	17,40	21,43	8,74

Tabela 48. Udeo mase kosti u masi bataka sa karabatakom, 58. dan

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	17,08 <sup>a</sup>	2,14	0,68	14,29	20,68	12,51
<b>O-I</b>	16,18 <sup>b</sup>	1,78	0,56	13,00	19,53	10,99
<b>O-II</b>	17,15 <sup>c</sup>	1,81	0,57	14,62	20,99	10,55
<b>O-III</b>	16,15 <sup>d</sup>	1,40	0,44	13,30	18,06	8,67
<b>O-IV</b>	19,91 <sup>abcd</sup>	1,82	0,57	17,17	22,44	9,12

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05



## Prilog I

## pH vrednost i temperatura mesa grudi

Tabela 1. Vrednost pH mesa grudi 45 min. nakon klanja, 42. dan

Grupa	$\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	6,08 <sup>abc</sup>	0,154	0,040	5,9	6,42	2,52
<b>O-I</b>	6,16	0,135	0,035	6,02	6,51	2,19
<b>O-II</b>	6,27 <sup>a</sup>	0,160	0,041	6,02	6,55	2,55
<b>O-III</b>	6,31 <sup>b</sup>	0,161	0,042	6,07	6,64	2,55
<b>O-IV</b>	6,29 <sup>c</sup>	0,152	0,039	6,03	6,56	2,41

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P <0,05

Tabela 2. Vrednost pH mesa grudi 24 h nakon klanja, 42. dan

Grupa	$\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	5,78	0,268	0,110	5,50	6,15	4,64
<b>O-I</b>	5,92	0,138	0,056	5,80	6,16	2,33
<b>O-II</b>	5,94	0,150	0,061	5,81	6,17	2,53
<b>O-III</b>	5,93	0,055	0,023	5,88	6,03	0,94
<b>O-IV</b>	5,96	0,188	0,077	5,80	6,26	3,15

Tabela 3. Vrednost pH mesa grudi 48 h nakon klanja, 42. dan

Grupa	$\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	5,74	0,313	0,128	5,23	6,15	5,45
<b>O-I</b>	5,96	0,138	0,056	5,81	6,20	2,31
<b>O-II</b>	5,98	0,134	0,055	5,86	6,20	2,23
<b>O-III</b>	5,93	0,169	0,069	5,76	6,18	2,84
<b>O-IV</b>	5,83	0,293	0,119	5,28	6,12	5,02

Tabela 4. Tempertura mesa grudi 15-20 min. nakon klanja, 42. dan

Grupa	$\frac{^{\circ}\text{C}}{\bar{X}}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	34,11	3,49	0,64	28,30	40,50	10,24
<b>O-I</b>	35,09	8,09	1,48	30,80	64,20	23,05
<b>O-II</b>	34,69	3,24	0,59	30,60	40,60	9,33
<b>O-III</b>	35,21	3,38	0,62	30,70	39,70	9,61
<b>O-IV</b>	33,39	3,33	0,61	28,50	39,70	9,96

Tabela 5. Vrednost pH mesa grudi 45 min. nakon klanja, 58. dan

Grupa	$\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	6,25	0,142	0,037	6,00	6,51	2,27
<b>O-I</b>	6,18	0,129	0,033	6,00	6,46	2,08
<b>O-II</b>	6,14	0,119	0,031	6,00	6,44	1,94
<b>O-III</b>	6,24	0,131	0,034	6,02	6,43	2,10
<b>O-IV</b>	6,19	0,117	0,030	6,00	6,45	1,89

Tabela 6. Vrednost pH mesa grudi 24 h nakon klanja, 58. dan

Grupa	$\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	6,05	0,182	0,074	5,88	6,35	3,01
<b>O-I</b>	5,98	0,137	0,056	5,85	6,21	2,29
<b>O-II</b>	6,01	0,139	0,057	5,83	6,22	2,31
<b>O-III</b>	6,03	0,093	0,038	5,94	6,21	1,55
<b>O-IV</b>	5,99	0,100	0,041	5,87	6,12	1,67

Tabela 7. Vrednost pH mesa grudi 48 h nakon klanja, 58. dan

Grupa	$\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	6,00	0,158	0,065	5,80	6,23	2,64
<b>O-I</b>	6,02	0,150	0,061	5,86	6,27	2,49
<b>O-II</b>	5,96	0,154	0,063	5,80	6,18	2,58
<b>O-III</b>	5,98	0,153	0,063	5,80	6,21	2,56
<b>O-IV</b>	5,94	0,094	0,038	5,86	6,11	1,58

Tabela 8. Tempertura mesa grudi 15-20 min. nakon klanja, 58. dan

Grupa	$\frac{^{\circ}\text{C}}{\bar{X}}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	35,38 <sup>a</sup>	1,694	0,511	32,80	38,50	4,79
<b>O-I</b>	33,34 <sup>bc</sup>	1,925	0,514	30,60	37,90	5,77
<b>O-II</b>	35,66 <sup>d</sup>	2,983	0,770	30,30	40,80	8,37
<b>O-III</b>	37,94 <sup>b</sup>	2,800	0,777	31,60	41,20	7,38
<b>O-IV</b>	39,03 <sup>acd</sup>	1,584	0,409	35,20	41,40	4,06

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,01

## Prilog J

## Sposobnost vezivanja vode (SVV)

Tabela 1. SVV nakon 42. dana tova

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,37 <sup>abcd</sup>	0,15	0,06	1,13	1,58	11,29
<b>O-I</b>	0,87 <sup>ac</sup>	0,14	0,06	0,71	1,08	16,71
<b>O-II</b>	1,07 <sup>bf</sup>	0,12	0,05	0,85	1,18	10,90
<b>O-III</b>	0,97 <sup>cg</sup>	0,26	0,11	0,58	1,18	27,04
<b>O-IV</b>	0,55 <sup>defg</sup>	0,12	0,05	0,41	0,71	22,52

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>-P<0,05

Tabela 2. SVV nakon 58. dana tova

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,58 <sup>abc</sup>	0,37	0,15	1,04	1,93	23,60
<b>O-I</b>	0,66 <sup>ad</sup>	0,14	0,06	0,44	0,82	21,87
<b>O-II</b>	0,75 <sup>be</sup>	0,14	0,06	0,57	0,92	18,75
<b>O-III</b>	0,94 <sup>cf</sup>	0,14	0,06	0,76	1,08	14,90
<b>O-IV</b>	1,42 <sup>def</sup>	0,20	0,08	1,19	1,77	13,78

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f</sup>-P<0,05

## Prilog K

## Hemijski sastav mesa

Tabela 1. Sadržaj proteina u mesu grudi nakon 42. dana tova

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	23,53 <sup>a</sup>	0,25	0,10	23,20	23,91	1,05
<b>O-I</b>	22,38	0,19	0,08	22,11	22,62	0,84
<b>O-II</b>	22,48 <sup>a</sup>	0,35	0,14	21,94	22,80	1,57
<b>O-III</b>	21,33 <sup>b</sup>	1,64	0,67	18,91	22,46	7,69
<b>O-IV</b>	23,77 <sup>b</sup>	1,17	0,48	22,26	25,13	4,92

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

Tabela 2. Sadržaj proteina u mesu grudi nakon 58. dana tova

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	21,55 <sup>abcd</sup>	0,96	0,39	20,80	22,95	4,47
<b>O-I</b>	24,34 <sup>aef</sup>	1,01	0,41	23,14	25,58	4,16
<b>O-II</b>	24,32 <sup>bgh</sup>	0,43	0,17	23,66	24,76	1,76
<b>O-III</b>	27,29 <sup>ceg</sup>	1,05	0,43	25,89	28,50	3,85
<b>O-IV</b>	26,54 <sup>dgh</sup>	1,32	0,54	24,70	27,84	4,98

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup>-P<0,05

Tabela 3. Sadržaj vode u mesu grudi nakon 42. dana tova

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	73,38 <sup>abc</sup>	0,26	0,11	73,05	73,74	0,35
<b>O-I</b>	74,79 <sup>a</sup>	0,32	0,13	74,30	75,22	0,42
<b>O-II</b>	74,90 <sup>b</sup>	0,37	0,15	74,39	75,37	0,49
<b>O-III</b>	76,07 <sup>cd</sup>	1,36	0,55	74,94	77,97	1,78
<b>O-IV</b>	74,00 <sup>d</sup>	1,09	0,45	72,73	75,23	1,48

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup>-P<0,05

Tabela 4. Sadržaj vode u mesu grudi nakon 58. dana tova

Grupa	$\frac{\%}{\bar{X}}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	74,83 <sup>abcd</sup>	0,60	0,25	74,04	75,31	0,81
<b>O-I</b>	72,18 <sup>ae</sup>	1,37	0,56	71,00	73,96	1,90
<b>O-II</b>	73,00 <sup>bfg</sup>	0,64	0,26	72,29	74,05	0,88
<b>O-III</b>	69,97 <sup>cef</sup>	1,12	0,46	68,95	71,60	1,59
<b>O-IV</b>	70,81 <sup>dg</sup>	1,10	0,45	69,35	72,21	1,55

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>-P<0,05

Tabela 5. Sadržaj masti u mesu grudi nakon 42. dana tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,99 <sup>a</sup>	0,35	0,14	1,51	2,45	17,43
<b>O-I</b>	1,76 <sup>b</sup>	0,34	0,14	1,36	2,09	19,25
<b>O-II</b>	1,57	0,28	0,12	1,07	1,89	18,07
<b>O-III</b>	1,57	0,38	0,15	1,14	2,10	23,88
<b>O-IV</b>	1,18 <sup>ab</sup>	0,27	0,11	0,84	1,50	23,00

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

Tabela 6. Sadržaj masti u mesu grudi nakon 58. dana tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	2,50 <sup>abc</sup>	0,38	0,16	1,84	2,77	15,33
<b>O-I</b>	2,39 <sup>de</sup>	0,57	0,23	1,77	3,26	23,92
<b>O-II</b>	1,57 <sup>ad</sup>	0,25	0,10	1,22	1,83	15,99
<b>O-III</b>	1,67 <sup>b</sup>	0,46	0,19	1,24	2,40	27,63
<b>O-IV</b>	1,57 <sup>ce</sup>	0,43	0,18	0,99	1,96	27,70

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e</sup>-P<0,05

Tabela 7. Sadržaj pepela u mesu grudi nakon 42. dana tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,10 <sup>ab</sup>	0,03	0,014	1,05	1,15	3,15
<b>O-I</b>	1,07	0,03	0,012	1,03	1,10	2,71
<b>O-II</b>	1,05	0,02	0,007	1,03	1,08	1,66
<b>O-III</b>	1,03 <sup>a</sup>	0,03	0,011	1,01	1,08	2,57
<b>O-IV</b>	1,05 <sup>b</sup>	0,03	0,012	1,01	1,09	2,92

Legenda: Ista slova <sup>a,b</sup>-P<0,05

Tabela 8. Sadržaj pepela u mesu grudi nakon 58. dana tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,12	0,03	0,013	1,07	1,15	2,76
<b>O-I</b>	1,09	0,03	0,011	1,06	1,13	2,36
<b>O-II</b>	1,10	0,04	0,017	1,04	1,15	3,70
<b>O-III</b>	1,07	0,04	0,017	1,01	1,12	3,97
<b>O-IV</b>	1,08	0,04	0,015	1,03	1,13	3,48

Tabela 9. Sadržaj proteina u mesu karabataka nakon 42. dana tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	20,14	1,24	0,51	19,20	22,21	6,16
<b>O-I</b>	19,64	0,63	0,26	18,85	20,26	3,21
<b>O-II</b>	20,72	0,78	0,32	19,73	21,52	3,77
<b>O-III</b>	19,58	1,26	0,51	18,10	20,97	6,43
<b>O-IV</b>	19,57	0,52	0,21	18,99	20,28	2,66

Tabela 10. Sadržaj proteina u mesu karabataka nakon 58. dana tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	18,79 <sup>ab</sup>	0,54	0,22	18,09	19,42	2,87
<b>O-I</b>	18,94 <sup>cd</sup>	0,29	0,12	18,70	19,42	1,54
<b>O-II</b>	19,00 <sup>ef</sup>	0,23	0,09	18,78	19,40	1,22
<b>O-III</b>	21,53 <sup>ace</sup>	0,68	0,28	20,59	22,40	3,17
<b>O-IV</b>	20,94 <sup>bdf</sup>	0,36	0,15	20,50	21,33	1,74

Legenda: Ista slova<sup>a,b,c,d,e,f</sup>-P<0,05

Tabela 11. Sadržaj vode u mesu karabataka nakon 42. dana tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	76,10	1,33	0,54	73,97	77,19	1,75
<b>O-I</b>	76,77	0,23	0,09	76,39	77,06	0,30
<b>O-II</b>	75,65 <sup>a</sup>	0,89	0,36	74,65	77,16	1,18
<b>O-III</b>	76,97	0,65	0,27	76,09	77,8	0,85
<b>O-IV</b>	77,01 <sup>a</sup>	0,31	0,13	76,65	77,38	0,40

Legenda: Ista slova<sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 12. Sadržaj vode u mesu karabataka nakon 58. dana tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	75,37 <sup>ab</sup>	0,53	0,22	74,78	75,98	0,70
<b>O-I</b>	75,92 <sup>c</sup>	0,29	0,12	75,47	76,24	0,39
<b>O-II</b>	76,48 <sup>ad</sup>	0,32	0,13	76,00	76,77	0,42
<b>O-III</b>	74,64 <sup>bcde</sup>	0,41	0,17	73,89	75,02	0,55
<b>O-IV</b>	75,94 <sup>e</sup>	0,30	0,12	75,50	76,37	0,40

Legenda: Ista slova<sup>a,b,c,d,e</sup>-P<0,05

Tabela 13. Sadržaj masti u mesu karabataka nakon 42. dana tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	2,66	0,15	0,06	2,47	2,85	5,63
<b>O-I</b>	2,58	0,62	0,25	1,94	3,42	24,02
<b>O-II</b>	2,58	0,41	0,17	2,04	3,13	16,07
<b>O-III</b>	2,41	0,61	0,25	1,63	3,14	25,25
<b>O-IV</b>	2,38	0,38	0,15	2,05	2,95	15,90

Tabela 14. Sadržaj masti u mesu karabataka nakon 58. dana tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	4,83 <sup>abcd</sup>	0,20	0,08	4,61	5,14	4,24
<b>O-I</b>	4,15 <sup>aefg</sup>	0,48	0,20	3,59	4,71	11,57
<b>O-II</b>	3,47 <sup>behj</sup>	0,14	0,06	3,26	3,65	4,10
<b>O-III</b>	2,82 <sup>cfhj</sup>	0,38	0,16	2,50	3,41	13,64
<b>O-IV</b>	2,10 <sup>dgiij</sup>	0,30	0,12	1,81	2,61	14,28

Legenda: Ista slova<sup>a,b,c,d,e,f,g,h,i,j</sup>-P<0,05

Tabela 15. Sadržaj pepela u mesu karabataka nakon 42. dana tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,10 <sup>a</sup>	0,04	0,02	1,03	1,15	3,98
<b>O-I</b>	1,01 <sup>a</sup>	0,03	0,01	0,98	1,07	3,15
<b>O-II</b>	1,06	0,05	0,02	0,99	1,13	5,14
<b>O-III</b>	1,05	0,06	0,02	0,98	1,14	5,43
<b>O-IV</b>	1,04	0,05	0,02	0,98	1,10	4,52

Legenda: Ista slova<sup>a</sup>-P<0,05

Tabela 16. Sadržaj pepela u mesu karabataka nakon 58. dana tova

Grupa	% $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,01	0,03	0,011	0,98	1,05	2,70
<b>O-I</b>	0,99 <sup>a</sup>	0,02	0,007	0,97	1,02	1,74
<b>O-II</b>	1,05 <sup>a</sup>	0,03	0,013	1,01	1,09	3,09
<b>O-III</b>	1,01	0,02	0,010	0,98	1,04	2,34
<b>O-IV</b>	1,02	0,04	0,015	0,98	1,07	3,59

Legenda: Ista slova<sup>a</sup>-P<0,05

## Prilog L

## TBARS vrednost u mesu karabataka nakon skladištenja

Tabela 1. TBARS vrednost u mesu karabataka 0. dan, 42. dan tova

Grupa	mg MAL/kg $\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,162	0,025	0,010	0,12	0,19	15,36
<b>O-I</b>	0,150	0,025	0,010	0,12	0,18	16,87
<b>O-II</b>	0,133	0,018	0,007	0,11	0,16	13,13
<b>O-III</b>	0,150	0,024	0,010	0,12	0,18	15,78
<b>O-IV</b>	0,122	0,027	0,011	0,09	0,17	22,31

Tabela 2. TBARS vrednost u mesu karabataka 0. dan, 58. dan tova

Grupa	mg MAL/kg $\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,250 <sup>a</sup>	0,043	0,018	0,19	0,32	17,34
<b>O-I</b>	0,200 <sup>b</sup>	0,037	0,015	0,16	0,26	18,71
<b>O-II</b>	0,212 <sup>c</sup>	0,033	0,014	0,18	0,27	15,65
<b>O-III</b>	0,272 <sup>bd</sup>	0,047	0,019	0,22	0,34	17,33
<b>O-IV</b>	0,142 <sup>acd</sup>	0,023	0,009	0,11	0,17	16,35

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup> -P<0,05

Tabela 3. TBARS vrednost u mesu karabataka 3. mesec, 42. dan tova

Grupa	mg MAL/kg $\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,220 <sup>abc</sup>	0,038	0,015	0,18	0,28	17,25
<b>O-I</b>	0,172 <sup>a</sup>	0,019	0,008	0,15	0,20	11,31
<b>O-II</b>	0,162 <sup>b</sup>	0,020	0,008	0,13	0,19	12,63
<b>O-III</b>	0,192	0,026	0,011	0,16	0,23	13,77
<b>O-IV</b>	0,170 <sup>c</sup>	0,029	0,012	0,13	0,21	17,05

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c</sup> -P<0,05

Tabela 4. TBARS vrednost u mesu karabataka 3. mesec, 58. dan tova

Grupa	mg MAL/kg $\bar{X}$	Mere varijacije				
		Sd	Se	Iv		Cv %
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,443 <sup>abcd</sup>	0,058	0,024	0,38	0,53	13,05
<b>O-I</b>	0,292 <sup>ae</sup>	0,037	0,015	0,24	0,34	12,72
<b>O-II</b>	0,310 <sup>bf</sup>	0,040	0,016	0,26	0,37	12,90
<b>O-III</b>	0,332 <sup>cg</sup>	0,037	0,015	0,29	0,38	11,02
<b>O-IV</b>	0,205 <sup>defg</sup>	0,035	0,014	0,15	0,25	16,83

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> -P<0,05



Tabela 5. TBARS vrednost u mesu karabataka 6. mesec, 42. dan tova

Grupa	mg MAL/kg $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,42 <sup>ab</sup>	0,051	0,021	0,36	0,50	12,14
<b>O-I</b>	0,35 <sup>c</sup>	0,041	0,017	0,28	0,39	11,57
<b>O-II</b>	0,31 <sup>a</sup>	0,046	0,019	0,25	0,36	14,71
<b>O-III</b>	0,38 <sup>d</sup>	0,046	0,019	0,31	0,45	12,23
<b>O-IV</b>	0,27 <sup>bcd</sup>	0,041	0,017	0,23	0,34	15,00

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup> -P<0,05

Tabela 6. TBARS vrednost u mesu karabataka 6. mesec, 58. dan tova

Grupa	mg MAL/kg $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,912 <sup>abcd</sup>	0,104	0,043	0,81	1,09	11,43
<b>O-I</b>	0,592 <sup>a</sup>	0,057	0,023	0,51	0,67	9,70
<b>O-II</b>	0,540 <sup>b</sup>	0,057	0,023	0,46	0,61	10,61
<b>O-III</b>	0,662 <sup>c</sup>	0,055	0,023	0,59	0,73	8,36
<b>O-IV</b>	0,552 <sup>d</sup>	0,089	0,036	0,48	0,68	16,11

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup> -P<0,05

Tabela 7. TBARS vrednost u mesu karabataka 9. mesec, 42. dan tova

Grupa	mg MAL/kg $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,823 <sup>abc</sup>	0,096	0,039	0,68	0,95	11,64
<b>O-I</b>	0,652 <sup>a</sup>	0,058	0,024	0,58	0,73	8,92
<b>O-II</b>	0,655 <sup>b</sup>	0,066	0,027	0,59	0,75	10,02
<b>O-III</b>	0,770 <sup>d</sup>	0,071	0,029	0,70	0,87	9,22
<b>O-IV</b>	0,540 <sup>cd</sup>	0,065	0,026	0,45	0,61	11,94

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d</sup> -P<0,05

Tabela 8. TBARS vrednost u mesu karabataka 9. mesec, 58. dan tova

Grupa	mg MAL/kg $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,960 <sup>abcd</sup>	0,079	0,032	0,87	1,10	8,20
<b>O-I</b>	0,680 <sup>ae</sup>	0,072	0,029	0,58	0,77	10,52
<b>O-II</b>	0,730 <sup>bf</sup>	0,074	0,030	0,66	0,86	10,10
<b>O-III</b>	0,803 <sup>ceg</sup>	0,062	0,025	0,73	0,90	7,70
<b>O-IV</b>	0,612 <sup>dfg</sup>	0,059	0,024	0,55	0,71	9,61

Legenda: Ista slova <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> -P<0,05

Tabela 9. TBARS vrednost u mesu karabataka 12. mesec, 42. dan tova

Grupa	mg MAL/kg $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	0,960	0,080	0,032	0,88	1,08	8,28
<b>O-I</b>	0,872	0,093	0,038	0,76	1,00	10,72
<b>O-II</b>	0,890	0,074	0,030	0,80	1,02	8,29
<b>O-III</b>	0,910	0,078	0,032	0,83	1,05	8,57
<b>O-IV</b>	0,830	0,070	0,029	0,72	0,91	8,42

Tabela 10. TBARS vrednost u mesu karabataka 12. mesec, 58. dan tova

Grupa	mg MAL/kg $\bar{X}$	Mere varijacije				Cv %
		Sd	Se	Iv		
				Xmin	Xmax	
<b>K</b>	1,132	0,102	0,042	0,95	1,23	8,98
<b>O-I</b>	1,062	0,093	0,038	0,95	1,19	8,72
<b>O-II</b>	1,012	0,098	0,040	0,91	1,14	9,67
<b>O-III</b>	1,113	0,085	0,035	1,01	1,23	7,66
<b>O-IV</b>	0,982	0,116	0,047	0,82	1,16	11,76

## BIOGRAFIJA

Milica Glišić, rođena je 12.01.1988. godine u Smederevskoj Palanci. Nakon završene Palanačke gimnazije, prirodno-matematički smer, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2007/2008 godine. Integrisane osnovne i master akademske studije završila je u oktobru 2014. godine, sa zvanjem doktor veterinarske medicine i prosečnom ocenom položenih ispita 9,56. Tokom studija nagrađivana je za najboljeg studenta prve godine i najboljeg apsolventa nagradom Fakulteta. Školske 2011/2012 godine bila je stipendista Zadužbine "Dragoljuba Marinkovića". Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisala 2014/2015 godine. U periodu od novembra 2014. god. do novembra 2015. god. odradila je staž na Katedri za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, tokom koga je ovladala metodologijama koje se koriste u istraživačkom radu, a koje se rade na Katedri, kao i statističkom obradom podataka i tumačenjem rezultata. Od novembra meseca 2016. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik, a od decembra 2017. godine kao istraživač saradnik, na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije Br. TR 31034: "Odabrane biološke opasnosti za bezbednost/kvalitet hrane animalnog porekla i kontrolne mere od farme do potrošača". Tokom doktorskih studija, usmerila se u oblasti ishrane životinja i kvaliteta i bezbednosti namirnica animalnog porekla. Govori engleski jezik i kao autor ili koautor objavila je jedno poglavlje u monografiji međunarodnog značaja, 11 radova u časopisima sa impakt faktorom i preko 40 radova u časopisima od nacionalnog značaja i na naučnim skupovima nacionalnog i međunarodnog značaja. Radovi su joj citirani 117 puta, a h-indeks je 6. Recenzirala je dva rada u međunarodnim časopisima. Doktorske akademske studije završila je sa prosekom 9,92.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Милица А. Глишић

број уписа 14/2

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Утицај употребе изофлавона у исхрани на производне резултате и биолошке параметре бројлера“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 18.11.2020. год.

Потпис докторанда

Милица Глишић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица А. Глишић

Број уписа 14/2

Студијски програм Докторске академске студије

Наслов рада „Утицај употребе изофлавона у исхрани на производне  
резултате и биолошке параметре бројлера“

Ментор проф. др Радмила Марковић

Потписани Милица А. Глишић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 18.11.2020. год

Потпис докторанда

Милица Глишић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Утицај употребе изофлавоноа у исхрани на производне резултате и биолошке параметре бројлера“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

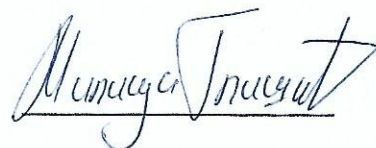
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 18. 11. 2020. год.

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.