

ẢNH HƯỞNG CÁC TỈ LỆ ACID BÉO ω -6/ ω -3 KHẨU PHẦN LÊN NĂNG SUẤT SINH SẢN VÀ THÀNH PHẦN ACID BÉO, CHOLESTEROL CỦA LÒNG ĐÓ TRỨNG GÀ

Lê Thanh Phương¹, Lưu Hữu Mãnh¹ và Nguyễn Nhựt Xuân Dung¹

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/9/2014

Ngày chấp nhận: 07/11/2014

Title:

Effect of dietary fatty acid omega-6/omega-3 ratios on egg production, egg yolk fatty acids and cholesterol

Từ khóa:

Cholesterol, DHA, dầu, gen FADS1 và FADS2, năng suất trứng

Keywords:

Cholesterol, DHA, egg production, gene FADS1 and FADS2, oil

ABSTRACT

This study was conducted to show the effect of dietary fatty acid ω -6/ ω -3 ratios on egg production, egg yolk fatty acids and cholesterol on 480 Hisex Brown laying hens of 38 weeks of age. Birds were allocated according to a completely randomized design into 6 treatments consisting of a control and 5 ratios of fatty acid ω -6/ ω -3 (2, 3, 4, 5 and 6). The first was a control given 0% oil; the second treatment received 2.5% salmon fish oil (SFO) + 0.5 % soybean oil (SO), the third given 2% SFO+1%SO; the fourth given 1.5% SFO+1.5% SO; the fifth given 1% SFO+2% SO and the last given 0.5% SFO+2.5% SO. Dietary treatments did not affect on egg production, feed intake but increased egg weight and improved feed efficiency as compared to control ($P < 0.01$). The ratios of fatty acid ω -6/ ω -3 did not influenced on egg quality but the increasing dietary fish oil reduced egg shell thickness. Contents of linolenic acid, DHA and omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) in egg were increased in ratio 2 ($P < 0.01$), while cholesterol content was reduced ($P = 0.01$) in the hens fed diet rich of SFO. DHA content in egg yolk was affected by dietary fatty acid ω -6/ ω -3 and highly related to the expression of desaturase delta-5 (FADS1) và 6 (FADS2).

TÓM TẮT

Thí nghiệm được tiến hành trên 480 gà mái đẻ giống Hisex Brown từ 38 đến 50 tuần tuổi, gà được nuôi với 6 khẩu phần có cùng mức độ protein và năng lượng. Khẩu phần cơ sở (KPCS) nhận 0% dầu, 5 khẩu phần còn lại được bố trí với 5 tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 (TLO6/3) là 2 (TLO2), 3 (TLO3), 4 (TLO4), 5 (TLO5) và 6 (TLO6) theo các mức độ phối hợp giữa dầu nành (DN) với dầu cá hồi (DCH) như sau: TLO2: 2,5%DCH+0,5%DN; TLO3: 2%DCH+1%DN; TLO4: 1,5%DCH + 1,5% DN; TLO5: 1% DCH + 2% DN; TLO6: 0,5% DCH + 2,5%DN, để đánh giá ảnh hưởng của các tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần lên năng suất sinh sản, thành phần chất béo và hàm lượng cholesterol của lòng đỏ trứng. Các tỉ lệ ω -6/ ω -3 trong khẩu phần không ảnh hưởng đến tỉ lệ đẻ, tiêu tốn thức ăn nhưng làm tăng khối lượng trứng và hiệu quả sử dụng thức ăn so với KPCS. Chất lượng trứng không bị ảnh hưởng bởi các TLO6/3, nhưng làm giảm độ dày vỏ so với KPCS. Các tỉ lệ ω -6/ ω -3 đã làm thay đổi thành phần chất béo của lòng đỏ trứng, hàm lượng acid omega 3 như linolenic, DHA cao ở các khẩu phần có mức DCH cao (TLO2). Hàm lượng cholesterol lòng đỏ trứng giảm ý nghĩa ở khẩu phần TL2, TL3, TL4 ($P=0,01$). Mức độ biểu hiện của các gen desaturase delta-5 (FADS1) và 6 (FADS2) của gan gà có tương quan rất cao với hàm lượng DHA lòng đỏ trứng.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Các acid béo chưa no nhiều nối đôi như acid linoleic (Cis-9,12-Octadecadienoic acid, C18:2) và alpha acid linolenic (Cis-9,12,15-Octadecatrienoic acid, C18:3) còn được phân loại là acid béo omega 6 và omega 3, có vai trò rất quan trọng trong dinh dưỡng động vật, nhất là ở người. Các acid béo omega 6 là tiền chất của các eicosanoids của hệ thống nội tiết trong cơ thể như prostagladin, leukotriene, prostacyclin, thromboxane và hydroxyacid. Các acid béo omega 3 có chức năng quan trọng trong việc hình thành mô thần kinh và mắt, đáp ứng cho các hoạt động ổn định của hệ thống tim mạch và điều hòa hoạt động của hệ thống miễn dịch (Neuringer *et al.*, 1988; Levinson *et al.*, 1990). Trong cơ thể các acid béo omega 6 nhiều nối đôi như acid arachidonic (AA, C20:4) được tổng hợp từ acid linoleic và docosahexaenoic acid (DHA, C22:6) được tổng hợp từ các alpha linolenic. Động vật không thể chuyển đổi các acid béo omega 6 thành DHA. Ngoài ra, tỉ số acid béo ω -6/ ω -3 rất quan trọng đối với sức khỏe của người và động vật vì nó chỉ ra sự cân bằng các acid béo chưa no. Một quả trứng tiêu chuẩn có tỉ số này là 20:1. Trong khi trứng gà nuôi ngoài tự nhiên có tỉ số là 1:1 (Simopoulos, 1999). Theo Bourre (2005), các nước Châu Âu khuyến cáo tỉ số acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần của người là 5:1 – 6:1 và theo FAO và WHO thì tỉ số này có thể từ 5:1 – 10:1.

Một số loại dầu giàu các acid béo thiết yếu đã được đưa vào khẩu phần của gà mái đẻ để làm thay đổi thành phần acid béo của quả trứng như dầu hạt lanh, nành, dầu cá, dầu hạt hướng dương. Tuy nhiên sử dụng riêng lẻ một loại dầu cũng có ảnh hưởng bất lợi như dầu hạt lanh quá giàu các acid béo chưa no omega 3. Khi đưa dầu hạt hướng dương quá nhiều acid linoleic vào khẩu phần gà mái kết quả là quả trứng quá nhiều AA (acid arachidonic, C20:4) (Baucells *et al.*, 2000, Schreiner *et al.*, 2004). Nhiều nghiên cứu đã chỉ rằng gà mái sử dụng tiêu thụ các acid béo omega 3 trong dầu cá đã làm tăng các acid béo omega 3 như EPA và DHA (Hargis *et al.*, 1991), tuy nhiên làm cho quả trứng có mùi tanh cá. Dầu nành rất giàu các acid béo omega 6 (55%) nhưng cũng có một tỉ lệ omega 3 (8%) (OLiveira *et al.*, 2010). Do đó cần thiết phải nghiên cứu phối hợp các loại chất béo để kiểm soát tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 vào khẩu phần gà mái đẻ.

Mục tiêu đề tài là đánh giá ảnh hưởng các tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần bằng cách phối hợp dầu cá hồi với dầu nành theo các tỉ lệ khác nhau lên năng suất sinh sản, sự tích lũy hàm lượng các ω -3 PUFA, hàm lượng cholesterol trong lòng đỏ trứng đồng thời xác định sự biểu hiện của hai gen FADS1 và FADS2, đây là những gen có vai trò kéo dài chuỗi carbon và “chưa no hóa” các acid béo thành AA và DHA lòng đỏ trứng gà.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

2.1 Địa điểm, chuồng trại và động vật thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện trên 480 gà mái đẻ giống Hisex brown từ 38 đến 50 tuần tuổi tại một trang trại chăn nuôi gà công nghiệp ở Bình Dương. Gà được nuôi trong chuồng kín có hệ thống thông gió, nhiệt độ trong chuồng nuôi dao động từ 26 – 29°C. Tất cả các gà mái đẻ đã đi vào giai đoạn sản xuất ổn định, được tiêm phòng các bệnh truyền nhiễm đầy đủ.

2.2 Thức ăn và khẩu phần thí nghiệm

Đề tài được thực hiện trên 6 khẩu phần thức ăn thí nghiệm với 2 loại chất béo là dầu nành (DN) và dầu cá hồi (DCH). Dầu nành là dầu tinh luyện được mua từ siêu thị. Dầu cá hồi được nhập khẩu từ Chile. Công thức các khẩu phần thí nghiệm được trình bày như sau:

- (1) Khẩu phần cơ sở (KPCS): không bổ sung chất béo
- (2) NT1: KPCS + 0,5% DN + 2,5% DCH có tỉ lệ ω -6/ ω -3 = 2 (TLO2)
- (3) NT2: KPCS + 1% DN + 2% DCH có tỉ lệ ω -6/ ω -3 = 3 (TLO3)
- (4) NT3: KPCS + 1,5% DN + 1,5% DCH có tỉ lệ ω -6/ ω -3 = 4 (TLO4)
- (5) NT4: KPCS + 1% DN + 2% DCH có tỉ lệ ω -6/ ω -3 = 5 (TLO5)
- (6) NT5: KPCS + 0,5% DN + 2,5% DCH có tỉ lệ ω -6/ ω -3 = 6 (TLO6)

Thành phần hóa học và giá trị dinh dưỡng của khẩu phần cơ sở được trình bày qua Bảng 1, và thành phần acid béo của dầu nành và dầu cá hồi thí nghiệm được trình bày qua Bảng 2.

Bảng 1: Công thức phối hợp, thành phần hóa học và giá trị dinh dưỡng khẩu phần cơ sở

Thực liệu	%	Thành phần hóa học	%
Bắp	56,0	Vật chất khô	89,51
Cám khử dầu	10,0	Tro	8,90
Khô dầu nành ly trích	20,77	Protein thô	17,22
Bột cá 55% CP	3,00	Béo thô	2,42
Bột đá hạt	4,00	Xơ thô	3,73
Bột đá mịn	3,50	NDF	11,46
Dicalciphosphat	1,30	Calcium	3,09
Muối ăn	0,25	Phosphor	0,83
Premix layer	0,26	Lysine	0,90
Premix khoáng	0,25	Methionine	0,40
DL-Methionin (98%)	0,22	ME, MJ/kg	10,89
L-Lysin (98%)	0,50		

ME: được tính theo Jansen (1989) trích dẫn từ NRC (1994)

Bảng 2: Thành phần acid của dầu nành và dầu cá hồi

	Dầu cá hồi	Dầu nành
Acid linoleic (C18:2)	18,24	50,65
Acid linolenic (C18:3)	3,28	6,19
EPA (C20:5)	5,73	-
DHA (C22:6)	4,52	-
Σ SFA	26,70	15,27
Σ MUFA	39,65	27,89
Σ PUFA	32,73	56,84
Σ PUFA ω-6	19,20	50,65
Σ PUFA ω-3	13,53	6,19
Tỉ số ω-6/ ω-3	1,4	8,2

ΣSFA, ΣUFA, ΣPUFA: tổng acid béo no, tổng acid béo chưa no, tổng acid béo chưa no nhiều nối đôi, ω-6: omega 6, ω-3: omega 3, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid

2.3 Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với sáu nghiệm thức là khẩu phần cơ sở và 5 nghiệm thức tương ứng với 5 tỉ lệ acid béo ω-6/ ω-3. Thí nghiệm được lặp lại 10 lần, với 60 đơn vị thí nghiệm, mỗi đơn vị thí nghiệm nuôi 8 gà mái. Có tổng cộng 480 gà mái.

Khẩu phần cơ sở dùng làm tham khảo để xác định gene FDAS1 và FDAS2.

2.4 Phương pháp lấy mẫu trứng

Sau 8 tuần nuôi thức ăn thí nghiệm, mẫu trứng sẽ được thu thập 2 lần, lần 2 cách lần 1 hai tuần. Mỗi lần lấy mẫu liên tục 2 ngày, lấy tất cả số trứng trong mỗi đơn vị thí nghiệm, sau đó chọn ngẫu nhiên ra 4 quả để khảo sát chất lượng và phân tích thành phần hóa học.

Tổng số trứng là: 60 ĐVTN x 4 quả x 2 lần = 480 quả trứng.

2.5 Chỉ tiêu theo dõi

2.5.1 Các chỉ tiêu năng suất của gà mái

- Tỉ lệ đẻ của gà (%).
- Tiêu tốn thức ăn/ngày (g).
- Khối lượng trứng (g).
- Khối lượng trứng (g/gà mái/ngày) = Tỉ lệ đẻ (%) * khối lượng trứng (g).
- Hiệu quả thức ăn (g/g) = tiêu tốn thức ăn (g/ngày)/ khối lượng trứng (g/gà mái/ngày).

2.5.2 Các chỉ tiêu kiểm tra chất lượng trứng

- Chỉ số hình dáng = (chiều rộng quả trứng/chiều dài quả trứng)*100.
- Đơn vị Haugh (Haugh Unit, HU): HU = 100 x log(T- 1,7 x W0,37+ 7,57).

Với T (mm): chiều cao lòng trắng đặc, W (g): khối lượng trứng.

- Độ dày vỏ được tính trung bình dựa trên 3 điểm: đầu lớn, xích đạo và đầu nhỏ của quả trứng.
- Tỷ lệ các thành phần của quả trứng (%).
- Chỉ số lòng đỏ = chiều cao lòng đỏ (cm)/ đường kính lòng đỏ (cm).
- Chỉ số lòng trắng (mm) = Chiều cao lòng trắng đặc (mm)/ đường kính trung bình lòng trắng đặc (mm).

2.6 Phân tích hóa học

Tiến hành phân tích thành phần hóa học của thức ăn với các chỉ tiêu như vật chất khô, tro, protein thô (CP), béo thô (EE), xơ thô (CF), Ca và P theo qui trình tiêu chuẩn của Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990), xơ trung tính (NDF) được xác định theo qui trình được đề nghị bởi Robertson *et al.* (1981).

- Thành phần các acid béo trong dầu và lòng đỏ trứng được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí (phương pháp thử AOAC 996.06 For Food và AOAC 969.33 For Oil GC/FID) do chi nhánh KHCN sắc ký Hải Đăng tại Cần Thơ thực hiện.

- Hàm lượng cholesterol trong lòng đỏ trứng được xác định theo quy trình được đề nghị bởi Pasin *et al.* (1998), sử dụng bộ kit cholesterol liquicolor, CHOC-PAR- Method Do công ty Human Diagnostics Worldwide (Human GmbH-65205 Wiesbaden- Đức) sản xuất.

2.7 Phương pháp thu mẫu và trữ mẫu gan thí nghiệm

Đến cuối kỳ thí nghiệm (sau 12 tuần cho ăn thức ăn thí nghiệm), mỗi ô chuồng chọn ngẫu nhiên 2 gà mái đẻ mổ lấy mẫu gan. Mẫu gan gà đẻ sau khi lấy ra khỏi cơ thể gà được bảo quản ngay trong nơơ lỏng ở nhiệt độ âm 196oC, sau đó mang về phòng thí nghiệm trữ ở -80oC.

2.7.1 Phân lập RNA từ mẫu gan

- Tách và kiểm tra chất lượng RNA: RNA tổng số từ mẫu gan gà được phân lập bằng cách sử dụng Trizol pH8 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) và thực hiện theo quy trình ly trích của nhà sản xuất. Mẫu sau khi tách chiết được kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 1%.

- Tinh sạch RNA: Sử dụng Rneasy Mini Kit (74106 – Qiagen) và thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Mẫu RNA sau khi tinh sạch được chuyển thành cDNA bằng cách sử dụng High Capacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystems) và thực hiện theo hướng dẫn của hãng Applied Biosystems.

2.7.2 Real time PCR

Môi

Các cặp môi sử dụng trong phản ứng Real time RT-PCR được tham khảo hoặc thiết kế dựa theo chương trình Primer3. Chi tiết về các cặp môi được thể hiện qua Bảng sau:

Bảng 3: Trình tự các đoạn môi sử dụng trong phản ứng Real time PCR

Gene	Trình tự môi (5' → 3')	Sản phẩm (bp)	Acc. No
Beta-actin*	Fw: GTGATGGACTCTGGTGATGG Rv: TGGTGAAGCTGTAGCCTCTC	150	NM-205518
FADS1	Fw: CAAATCGAGCACCACCTTTT Rv: TCTAGCCAGAGTTCCCCTGA	173	HQ667600.1
FADS2	Fw: CATTGGCTTGCTAATGGTT Rv: CAAACTTGTGGACGATGTGG	168	NM_001160428.2

* Wang *et al.* 2009

Thực hiện phản ứng Real time PCR

Phản ứng Real time PCR được thực hiện trên máy ABI Prism 7000 SDS với chu trình nhiệt như sau: 1 chu kỳ 95°C - 5' và 45 chu kỳ 95°C - 15'' và 60°C - 1'. Thành phần của phản ứng bao gồm môi xuôi và môi ngược (0,2 µl mỗi loại), SYBR Green (10 µl), nước khử ion (7,6 µl) và cDNA (2 µl). Mức độ biểu hiện phiên mã của gen FADS1 và FADS2 được tính tương đối với sự phiên mã của gen beta-actin dựa theo phương pháp 2-ΔΔCT

(Livak and Schmittgen, 2001). Trong đó giá trị ΔCT = giá trị CT của mỗi gen (FADS1 hoặc FADS2) - giá trị CT của gen beta-actin trên cùng một mẫu, cố định giá trị ΔCT, sử dụng như mẫu đối chứng (kí hiệu: ΔCt'), từ đó tính giá trị ΔΔCT = giá trị ΔCT của các mẫu còn lại - ΔCt'.

2.8 Phân tích thống kê

Số liệu thu thập được tiến hành xử lý sơ bộ trên Excel, sau đó tiến hành phân tích phương sai, sử dụng mô hình hồi qui tuyến tính bằng chương trình

Minitab 16. Khi F tính chỉ ra sự khác biệt giữa các số trung bình ($p < 0,05$), so sánh sự sai khác giữa các nghiệm thức được kiểm tra bằng phép thử Turkey.

Mô hình phân tích thống kê như sau:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij} \quad [1]$$

Y_i: Giá trị biến phụ thuộc thứ i của gà nuôi trong nghiệm thức T.

μ: Trung bình quần thể.

T_i: Ảnh hưởng của nghiệm thức, i = 1-6; i=1= KPCS; i=2=TLO2; i=3=TLO3; i=4=TLO4; i=5= TLO5 và i=6=TLO6; (TLO: tỉ lệ acid béo ω-6/ ω-3).

e_{ij}: Ảnh hưởng của yếu tố ngẫu nhiên.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng tỉ lệ acid béo ω-6/ ω-3 trong khẩu phần lên năng suất sinh sản của gà thí nghiệm

Kết quả thí nghiệm được trình bày trong Bảng 4 chỉ tỉ lệ acid béo ω-6/ ω-3 không ảnh hưởng lên tỉ lệ đẻ (P=0,76) và tiêu tốn thức ăn (TTTA) của gà (P=0,12) thí nghiệm vì đang ở giai đoạn sản xuất ổn định, nên tỉ lệ đẻ trung bình trong 12 tuần thí nghiệm tương đối ổn định và đảm bảo tiêu chuẩn của giống gà (Hendrix, 2011). Trong một thí nghiệm tiến hành trước đó cũng chỉ ra rằng sự kết hợp giữa dầu cám gạo với dầu cá hồi cũng không ảnh hưởng lên tỉ lệ đẻ của gà (Lê Thanh Phương *et al.*, 2014a). Kết quả tương tự được Balevi and Coşkun (2000) báo cáo trong thí nghiệm sử dụng chín loại dầu mỡ khác nhau như dầu hạt hướng dương, dầu bông vải, dầu bắp, dầu lanh, dầu nành, dầu olive, dầu cá, mỡ heo và dầu tinh luyện trong khẩu phần gà ở mức độ 2,5% đều không ảnh hưởng lên năng suất trứng của gà đẻ. Cachaldora *et al.* (2008) đã kết luận là nguồn dầu trong khẩu phần không ảnh hưởng lên năng suất sinh sản của gà mái đẻ.

Bảng 4 chỉ rằng khối lượng trứng gà nuôi ở KPCS thấp hơn các nghiệm thức có bổ sung dầu rất

có ý nghĩa ($p < 0,01$) vì khẩu phần này không sử dụng dầu, qua đó cho thấy chất béo có ảnh hưởng lên khối lượng của trứng gà, các nghiệm thức có tỉ lệ dầu nành càng cao thì khối lượng trứng càng lớn. Do đó, hiệu quả sử dụng thức ăn thấp hơn có ý nghĩa ở các NT có acid béo ω-6/ω-3 cao ($p = 0,01$). Shafey *et al.* (1999) so sánh giữa nhóm gà không bổ sung dầu với nhóm có bổ sung 2% dầu nành đã phát hiện rằng khối lượng trứng tăng từ 53,7 lên 54,5 g. Kết quả tương tự được Küçükersan *et al.* (2010) báo cáo rằng bổ sung 3% dầu nành đã làm tăng khối lượng trứng gà so với dầu cá và dầu hazelnut. Sự khác biệt về khối lượng trứng giữa các nghiệm thức có thể do mức độ năng lượng ăn vào của các khẩu phần thí nghiệm cao hơn KPCS (do không bổ sung dầu), ngoài ra dầu nành rất giàu acid linoleic, khi tỉ lệ acid béo ω-6/ ω-3 tăng lên tương ứng với việc tăng tỉ lệ dầu nành, dẫn đến tăng hàm lượng acid linoleic trong khẩu phần, đây là chất đã được chứng minh là có ảnh hưởng dương tính lên khối lượng trứng của gà (Whitehead, 1981). Ngược lại, tỉ lệ dầu cá trong khẩu phần cao làm giảm khối lượng trứng, kết quả thí nghiệm thu được tương tự các báo cáo của van Elswyk *et al.* (1994).

3.2 Ảnh hưởng các tỉ lệ acid béo ω-6/ ω-3 trong khẩu phần lên chất lượng quả trứng

Các tính chất của trứng được trình bày trong Bảng 5, tỉ lệ acid béo trong khẩu phần không ảnh hưởng lên chỉ số lòng đỏ, lòng trắng, đơn vị Haugh, màu sắc lòng đỏ, tỉ lệ lòng trắng và lòng đỏ ($p > 0,05$), nhưng ảnh hưởng lên chỉ số hình dáng của quả trứng ($p = 0,01$). Gà nuôi KPCS sản xuất quả trứng có chỉ số hình dáng cao nhất (78,7), tuy nhiên quả trứng gà của các NT khác cũng có CSHD nằm trong khoảng giới hạn của những quả trứng có hình dáng bình thường. Khi tỉ lệ ω-6/ ω-3 trong khẩu phần tăng lên đã làm giảm độ dày vỏ trứng, trứng gà nuôi KPCS có độ dày vỏ cao nhất (0,401 mm), thấp nhất ở khẩu phần có TLO6/3 bằng 2. Kết quả tương tự được Pappas *et al.* (2005) báo cáo rằng dầu cá trong khẩu phần đã làm giảm độ dày vỏ trứng khi so sánh với dầu nành.

Bảng 4: Ảnh hưởng các tỉ lệ acid béo ω-6/ ω-3 trong khẩu phần lên tỉ lệ đẻ và tiêu tốn thức ăn

	KPCS	TLO2	TLO3	TLO4	TLO5	TLO6	SEM	P
Tỉ lệ đẻ, %	92,04	91,47	92,60	93,53	91,76	93,84	1,35	0,76
KL trứng, g	61,88 ^c	62,42 ^{bc}	62,94 ^{abc}	63,35 ^{ab}	63,37 ^{ab}	63,78 ^a	0,26	<0,01
TTTÁ, g/ngày	115,1	113,3	114,4	112,6	117,8	116,3	1,40	0,12
KL trứng, g/gà/ngày	53,87	56,77	58,93	55,75	58,57	54,68	1,74	0,24
HQTÁ	2,03 ^a	1,99 ^{ab}	1,97 ^{ab}	1,90 ^b	2,03 ^a	1,95 ^a	0,03	0,01

Ghi chú: KL: khối lượng; TTTÁ: tiêu tốn thức ăn; HQTÁ= Tiêu tốn thức ăn (g/ngày); KL trứng (g/gà/ngày); TL: tỉ lệ; a,b Các số trung bình cùng hàng mang chữ số mũ khác nhau sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$)

Tuy nhiên, Mazalli *et al.* (2004) báo cáo rằng các nguồn dầu khác trong khẩu phần (dầu hạt cải, hạt hướng dương, hạt lanh, dầu cá hoặc dầu hỗn hợp với mức độ 3%) không ảnh hưởng lên độ dày vỏ trứng, điều này có thể do không có sự khác biệt về khối lượng trứng trong thí nghiệm của họ. Gà

sản xuất ra quả trứng có khối lượng trứng to thường có độ dày vỏ mỏng hơn quả trứng nhỏ bởi vì gà mái sản xuất cùng một số lượng Calci khi quả trứng đi vào vùng hình thành vỏ trứng, nếu quả trứng có khối lượng lớn thì độ dày vỏ mỏng hơn quả trứng nhỏ.

Bảng 5: Ảnh hưởng các tỉ lệ acid béo omega 6/omega 3 trong khẩu phần lên chất lượng trứng

	KPCS	TLO2	TLO3	TLO4	TLO5	TLO6	SEM	P
CS hình dáng	78,70 ^a	76,01 ^b	75,45 ^b	76,45 ^b	75,97 ^b	76,78 ^b	0,42	0,01
CS lòng trắng đặc	0,12	0,12	0,14	0,12	0,11	0,11	0,01	0,46
CS lòng đỏ	0,44	0,44	0,43	0,44	0,43	0,43	0,01	0,22
Màu lòng đỏ	8,30	8,20	8,13	8,03	8,20	8,13	0,10	0,54
Đơn vị Haugh	94,88	93,12	93,57	96,16	88,55	89,44	2,30	0,24
Tỉ lệ lòng trắng, %	61,14	61,54	60,47	61,63	61,04	61,19	0,42	0,51
Tỉ lệ lòng đỏ, %	26,39	26,47	26,95	25,99	26,85	26,57	0,38	0,62
Tỉ lệ vỏ, %	12,47	12,32	12,68	12,40	12,56	12,31	0,22	0,87
Độ dày vỏ, mm	0,401 ^a	0,373 ^b	0,385 ^{ab}	0,379 ^{ab}	0,382 ^{ab}	0,397 ^{ab}	0,01	0,03

Ghi chú: CS: chỉ số; a,b Các số trung bình cùng hàng mang chữ số mũ khác nhau sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$) theo phép thử Tukey)

3.3 Ảnh hưởng các tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần lên hàm lượng acid béo của lòng đỏ trứng

Bảng 6 trình bày ảnh hưởng các tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 lên hàm lượng acid béo của lòng đỏ trứng gà thí nghiệm. Gà nuôi KPCS sản xuất quả trứng có SFA có khuynh hướng cao hơn các khẩu phần thí nghiệm khác ($p=0,08$), ngược lại USFA của KPCS lại thấp hơn ($p=0,07$). Quả trứng gà là nơi loại chất béo của gà mái dù KPCS không cung cấp chất béo, thì gà mái vẫn có khả năng tổng hợp chất béo theo con đường de novo để sản xuất ra chất béo cho lòng đỏ trứng. Khi tăng tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần đã ảnh hưởng lên hàm lượng acid palmitic (C16:0, $P=0,01$), cao nhất ở trứng gà nuôi KPCS và thấp nhất ở khẩu phần TLO6. Acid palmitic là một acid béo no, trong tự nhiên có nhiều ở dầu cọ, có tỉ lệ cao nhất ở trứng gà; kế đến là acid stearic (C18:0). Acid béo chưa no có hàm lượng cao nhất ở lòng đỏ trứng gà là acid oleic (C18:1), hàm lượng của nó thay đổi theo tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần ($P=0,02$), thấp nhất ở KP có tỉ lệ dầu cá hồi cao nhất (TLO2), kế đến là TLO3, TLO4 và TLO5.

Tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần đã ảnh hưởng lên hàm lượng acid linoleic (C18:2) của lòng đỏ trứng ($p < 0,01$), thấp nhất ở KPCS (13,8%), sau đó tăng theo acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần, cao nhất ở nghiệm thức TLO6 (18,77%). Do đó, tổng acid béo ω -6 của lòng đỏ trứng tăng dần theo việc tăng acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần ($p < 0,01$). KPCS có hàm lượng acid linolenic thấp

nhất (0,17%), cao nhất ở khẩu phần TLO6 (0,46%), tuy nhiên theo phép so sánh cặp của Tukey, không có sự khác biệt có ý nghĩa về hàm lượng acid linoleic giữa các khẩu phần có bổ sung dầu ($p=0,01$). Khẩu phần TLO6 có tỉ lệ dầu nành cao nhất (2,5%), dầu nành rất giàu acid linoleic do đó đã làm tăng hàm lượng này trong lòng đỏ trứng, kết quả của thí nghiệm phù hợp với nghiên cứu của Beynen (2004), cho rằng gà nuôi khẩu phần bổ sung dầu nành cho quả trứng giàu acid linoleic hơn bổ sung dầu phộng (giàu acid oleic), bổ sung dầu hạt lanh thì hàm lượng acid linolenic của trứng tăng lên.

Các tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần đã ảnh hưởng có ý nghĩa lên hàm lượng DHA của quả trứng ($P=0,03$), gà nuôi khẩu phần TLO2 sản xuất ra quả trứng có hàm lượng DHA cao nhất (4,63%), hàm lượng DHA giảm khi tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 tăng lên. Kết quả thí nghiệm tương tự báo cáo của Marshall *et al.* (1994), có sự liên quan các mức độ EPA và DHA trong lòng đỏ trứng gà bởi vì các acid béo này là các acid omega 3 có chuỗi carbon dài, hàm lượng của chúng có thể tăng lên gấp 3 lần trong quả trứng gà nuôi khẩu phần có bổ sung nguồn cung cấp EPA và DHA gấp 3 lần quả trứng bình thường. Baucells *et al.* (2000) cho rằng các nguồn dầu giàu acid béo omega 3 như dầu cá và dầu hạt lanh được bổ sung vào khẩu phần gà mái có khuynh hướng tăng hàm lượng acid béo này trong lòng đỏ trứng. Mặc dù khi phân tích hàm lượng acid béo trong lòng đỏ trứng đã phát hiện được EPA ở dầu cá hồi (xem Bảng 2) nhưng không phát hiện được acid béo này trong lòng đỏ trứng vì

EPA cũng chỉ là một acid béo trung gian trong sự hình thành DHA từ acid linolenic. Kết quả tương tự được Mazalli *et al.* (2004) phát hiện khi đánh giá ảnh hưởng của dầu hạt cải, hạt hướng dương, hạt lanh và dầu cá trong khẩu phần gà mái đẻ cũng không phát hiện được EPA trong lòng đỏ trứng.

Tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần có khuynh hướng làm thay đổi tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 của lòng đỏ trứng ($p=0,14$). Quả trứng gà nuôi KPCS có tỉ lệ cao nhất (14,9), kể đến là TL6 (12,9) và thấp nhất ở khẩu phần TL2 (3,5). Theo Marshall *et al.* (1994), tỉ số ω -6/ ω -3 trong lòng đỏ trứng thấp hơn 4:1 được xem là tuyệt vời và ảnh hưởng tốt lên sức khỏe của người.

3.4 Ảnh hưởng các tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần lên hàm lượng cholesterol lòng đỏ trứng

Ảnh hưởng các tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần lên hàm lượng cholesterol lòng đỏ trứng được trình bày trong Bảng 6. Hàm lượng cholesterol lòng đỏ trứng giảm có ý nghĩa ở các nghiệm thức thí nghiệm so với KPCS (12,03 mg/g lòng đỏ), thấp nhất là khẩu phần TLO2 (10,98 mg/g lòng đỏ), kể đến là TLO4 (11,2 mg), TLO3

(11,3 mg/g). Gà nuôi KPCS sản xuất quả trứng có hàm lượng cholesterol trung bình là 214 mg/quả trứng, trong khi khẩu phần TLO2, TLO4, TLO3 có 190, 191, 197, 198 mg cholesterol/trứng. Lin và Pratt (1992) báo cáo rằng khi bổ sung 3% dầu cá mòi dầu (menhaden oil) vào khẩu phần gà mái đẻ, hàm lượng cholesterol lòng đỏ trứng đã giảm được 15%. Với mức độ 3,5% dầu cá trong khẩu phần, Saleh (2013) báo cáo là đã làm giảm được 14,5% cholesterol so với khẩu phần đối chứng (0 % dầu cá + 5% dầu thực vật). Kết quả thí nghiệm này tương tự với các báo cáo trên. Tuy nhiên, Meluzzi *et al.* (1997) bổ sung dầu cá; Caston và Leeson (1990) sử dụng dầu hạt lanh trong khẩu phần gà mái đã cho biết thức ăn thí nghiệm không ảnh hưởng lên hàm lượng cholesterol lòng đỏ trứng. Báo cáo này tương tự trong kết quả thí nghiệm trước của chúng tôi (Lê Thanh Phương *et al.*, 2014a) là kết hợp dầu cám gạo và bột cá trong khẩu phần không làm giảm cholesterol lòng đỏ trứng so với khẩu phần đối chứng sử dụng 3% dầu cám gạo. Có sự khác biệt khả năng làm giảm cholesterol trong hai thí nghiệm có thể là do cách sử dụng khẩu phần đối chứng (có dầu và không có dầu).

Bảng 6: Ảnh hưởng các tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần lên hàm lượng acid béo (% tổng số lipid) của lòng đỏ trứng

Acid béo	KPCS	TLO2	TLO3	TLO4	TLO5	TLO6	SEM	P
Myristic (C14:0)	0,39	0,34	0,39	0,35	0,37	0,35	0,03	0,67
Palmitic (C16:0)	27,62 ^a	27,16 ^a	26,90 ^{ab}	26,60 ^{ab}	26,45 ^{ab}	25,15 ^b	0,38	0,01
Palmitoleic (C16:1)	3,70 ^a	2,44 ^b	2,74 ^a	2,23 ^b	2,57 ^b	2,40 ^b	0,12	<0,01
Stearic (C18:0)	8,51	9,02	8,39	8,92	8,43	8,59	0,32	0,66
Oleic (C18:1)	42,57 ^a	38,74 ^b	39,68 ^{ab}	38,01 ^b	39,46 ^{ab}	40,78 ^{ab}	0,79	0,02
Linoleic (C18:2)	13,80 ^c	15,06 ^c	16,37 ^{abc}	18,16 ^a	17,80 ^{ab}	18,77 ^a	0,61	<0,01
Linolenic (C18:3)	0,17 ^b	0,33 ^{ab}	0,41 ^a	0,32 ^{ab}	0,42 ^a	0,46 ^a	0,04	<0,01
Gadoleic (C20:1)	0,30	0,20	0,23	0,22	0,26	0,36	0,05	0,33
Arachidonic (C20:4)	2,03	2,12	1,97	2,18	1,93	1,88	0,12	0,48
DHA (C22:6)	0,91 ^b	4,63 ^a	2,92 ^{ab}	3,04 ^{ab}	2,30 ^{ab}	1,36 ^{ab}	0,71	0,03
Σ SFA	36,51	36,53	35,68	35,87	35,25	34,10	0,56	0,08
Σ USFA	63,48	63,47	64,32	64,16	64,74	66,01	0,56	0,07
Σ ω -6, %	15,83 ^c	17,13 ^{bc}	18,34 ^{abc}	20,35 ^a	19,73 ^{ab}	20,65 ^a	0,58	<0,01
Σ ω -3, %	1,08 ^b	4,96 ^a	3,33 ^{ab}	3,3 ^{ab}	2,72 ^{ab}	1,83 ^{ab}	0,71	0,03
Tỉ lệ ω -6/ ω -3	14,9	3,5	7,4	8,0	9,6	12,90	2,84	0,14

^{a,b} Các số trung bình cùng hàng mang chữ số mũ khác nhau sai khác có ý nghĩa ($p<0,05$)

Bảng 7: Hàm lượng cholesterol lòng đỏ trứng

	KPCS	TLO2	TLO3	TLO4	TLO5	TLO6	SEM	P
mg/g lòng đỏ	12,03 ^a	10,98 ^b	11,30 ^{ab}	11,20 ^{ab}	11,43 ^{ab}	11,65 ^{ab}	0,193	0,01
mg/trứng	214 ^a	190 ^b	197 ^{ab}	191 ^b	198 ^{ab}	202 ^{ab}	5,187	0,04

^{a,b} Các số trung bình cùng hàng mang chữ số mũ khác nhau sai khác có ý nghĩa ($p<0,05$)

3.5 Ảnh hưởng các tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần lên biểu hiện gene FADS1 và FADS2 của gan

Các tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần ăn của gà đã ảnh hưởng lên sự biểu hiện gen FADS1 và FADS2 ở gan có ý nghĩa ($p < 0,01$; Bảng 8). Sự biểu hiện gen FADS1 của các khẩu phần thí nghiệm thấp hơn so với KPCS và mức độ giảm tỉ lệ thuận với tỉ lệ dầu cá giảm. Ngược lại, gen FADS2 tăng theo tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 trong khẩu phần. Cả hai gen này tham gia vào quá trình chuyển hóa các acid béo omega 6 (acid linoleic) và omega 3 (acid linolenic) được hấp thu thành acid arachidonic (C20:4) và DHA (C22:6), sau đó gà bài thải theo con đường là quả trứng để chuẩn bị cho một thời kỳ ấp nở. Qua kết quả phân tích hồi qui đã chỉ ra một quan hệ phi tuyến tính rất cao giữa 2 gen FADS1 và FADS2 với hàm lượng DHA trong lòng đỏ trứng (xem Hình 1 và Hình 2) được thể hiện qua hai phương trình như sau:

$$(1) \text{DHA, \%} = -32,52 + 197,7 \text{ FADS1} - 360,8 \text{ FADS1}^2 + 216,2 \text{ FADS1}^3$$

$$\text{RSD} = 0,29 \quad \text{R}^2 = 98,5\%$$

$$(2) \text{DHA, \%} = 34,80 - 68,62 \text{ FADS2} + 49,22 \text{ FADS2}^2 - 11,78 \text{ FADS2}^3$$

$$\text{RSD} = 0,22 \quad \text{R}^2 = 99,2\%$$

Như vậy, mức độ tổng hợp DHA trong lòng đỏ trứng gà có liên quan tới sự biểu hiện của gen FADS1 và FADS2 ở gan gà mái đẻ. Kết quả thí nghiệm phù hợp với kết luận của Khang *et al.* (2007) rằng gen FADS2 có liên quan gần với C20:4 (ω -6), C22:6 (ω -3) và tỉ lệ ω -6/ ω -3, trong khi FADS1 liên quan không đáng kể với C18: 2 (ω -6). Tuy nhiên, thí nghiệm của chúng tôi chỉ rằng cả 2 gen đều có quan hệ cao với hàm lượng DHA và cả AA trong lòng đỏ trứng. Kết quả này tương

tự số liệu thu thập được trong một thí nghiệm khác nhóm nghiên cứu (Lê Thanh Phương *et al.*, 2014b).

Các nghiên cứu về ảnh hưởng của tỉ lệ acid béo omega lên sự biểu hiện gen của gà mái không nhiều, các số liệu trình bày chỉ là nghiên cứu bước đầu, cần có nhiều nghiên cứu hơn nữa để khẳng định quan hệ giữa sự tổng hợp DHA lòng đỏ trứng với các gen kiểm soát sự chuyển hóa chất béo.

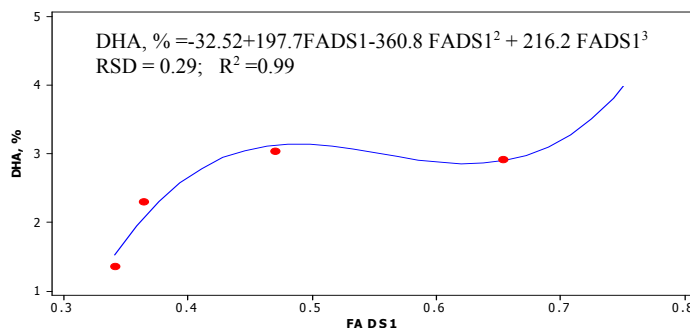
Bảng 8: Ảnh hưởng các tỉ lệ omega 6/omega 3 trong khẩu phần lên sự biểu hiện gene FADS1 và FADS2 của gan

Lần thay đổi tương đối so với KPCS(KPCS =1)		
	FADS1	FADS2
KPCS	1	1
TLO2	0,78 ^a	0,87 ^c
TLO3	0,65 ^{bc}	1,16 ^{bc}
TLO4	0,47 ^{cd}	1,34 ^b
TLO5	0,37 ^d	1,74 ^a
TLO6	0,34 ^d	1,90 ^a
SEM	0,06	0,08
P	<0,01	<0,01

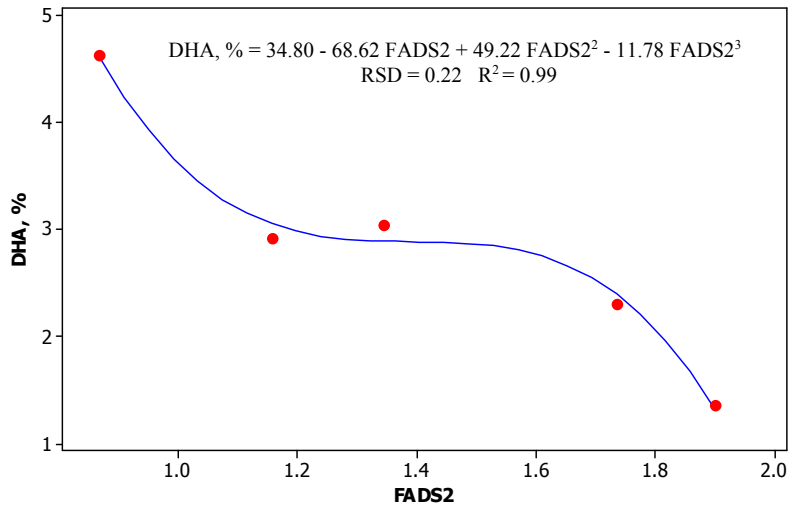
FADS1: fatty acid desaturase 1 encoding Δ -5 desaturase; FADS2: fatty acid desaturase 2 encoding Δ -6 desaturase. ^{a,b} Các số trung bình cùng hàng mang chữ số mũ khác nhau sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$)

4 KẾT LUẬN

Gà nuôi khẩu phần có tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 bằng 2 sản xuất ra quả trứng có hàm lượng DHA cao và có tỉ lệ ω -6/ ω -3 thấp nhất đồng thời làm giảm được hàm lượng cholesterol của lòng đỏ trứng. Sự biểu hiện của gen FADS1 và FADS2 có quan hệ rất cao với hàm lượng DHA lòng đỏ trứng, đây chỉ là các nghiên cứu ban đầu, cần có nhiều thí nghiệm để làm sáng tỏ hơn vai trò của các gen này. Như thế, việc sản xuất ra quả trứng gà được làm giàu DHA có thể là một nguồn thực phẩm tốt cho người tiêu dùng.



Hình 1: Ảnh hưởng các tỉ lệ acid ω -6/ ω -3 lên quan hệ của sự biểu hiện gen FADS1 với hàm lượng DHA (C22:6, %) trong lòng đỏ trứng



Hình 2: Ảnh hưởng các tỉ lệ acid béo ω -6/ ω -3 lên quan hệ của sự biểu hiện gen FADS2 với hàm lượng DHA (C22:6, %) trong lòng đỏ trứng

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AOAC, 1990. Official methods Of analysis (15th edition). Washington, DC, Volume 1: 69-90.
2. Balevi T., and Coşkun, B. 2000. Effects of some dietary oils on performance and fatty acid composition of eggs in layers. *Revue Med. Vet.*, 151: 847-854.
3. Baucells MD, Crespo N, Barroeta AC, López-Ferrer S, Grashorn MA. 2000. Incorporation of different polyunsaturated fatty acids into eggs. *Poultry Science*, Champaign, v.79, p.55-59.
4. Beynen A.C, 2004. Fatty acid composition of eggs produced by hens fed diets containing groundnut, soya bean or linseed. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences* Volume 52, Issue 1, 2004, Pages 3–10.
5. Bourre, J.M., 2005. Where to find omega-3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for human : What is actually useful. *The Journal of Nutrition, Health & Aging* Volume 9, Number 4.
6. Cachaldora P., García-Rebollar P., Alvarez C. De Blas J.C., Mé J. 2008 Effect of type and level of basal fat and level of fish oil supplementation on yolk fat composition and n-3 fatty acids deposition efficiency in laying hens. *Animal Feed Science and Technology* Volume 141, Issues 1–2, 1 March 2008, Pages 104–114.
7. Caston, L. and Leeson, S. 1990. Research Note: Dietary flax and egg composition. *Poultry Sci.*, 69: 1617-1620.
8. Hargis, P. S., M. E. Van Elswyk, and B. M. Hargis. 1991. Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. *Poult. Sci.* 70:874–883.
9. Hendrix Genetics company. 2011. Hisex Product Performance. www.isapoultry.com.
10. Khang NTK, Jennen D, Mennicken L, Tholen E, Tesfaye D, Ponsuksili S, Murani E, Hoelker M, Schellander K, Wimmers K. 2007. Association of the FADS2 gene with ω -6 and ω -3 PUFA concentration in the egg yolk of Japanese quail. *Animal Biotechnology* 18 (3): 189-201.
11. Küçükersan K, Yeşilbağ D, Küçükersan S. 2010. Influence of Different Dietary Oil Sources on Performance and Cholesterol Content of Egg Yolk in Laying Hens. *J. Biol. Environ. SCI.*, 2010, 4(12), 117-122
12. Levinson P.D., Iosiphidis A.H., Saritelli A.L., Herbert P.N., Steiner M. 1990. Effects of n-3 fatty acids in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1990;3(10):754-760.
13. Lê Thanh Phương, Lư Hữu Mãnh, Nguyễn Nhựt Xuân Dung. 2014a. Ảnh hưởng bổ sung dầu cám gạo kết hợp với dầu cá hồi trong khẩu phần lên năng suất sinh sản và

- thành phần acid béo, cholesterol của lòng đỏ trứng của gà mái giống hisex brown. Tạp chí Hội Chăn Nuôi, bài đang gửi đăng.
14. Lê Thanh Phương, Lưu Hữu Mạnh, Nguyễn Nhựt Xuân Dung. 2014b. Ảnh hưởng nguồn bổ sung dầu trong khẩu phần lên tương quan giữa biểu hiện FADS1 và FADS2 với hàm lượng acid béo omega 3 của lòng đỏ trứng gà. Bài đang gửi đăng trong “Hội nghị nghiên cứu khoa học”, Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, 2014.
 15. Lin, J.H and Pratt D.E. 1992. Effect of mehaden oil on cholesterol of the egg. Poultry Sci., 71, suppl., 1.
 16. Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods* 25(4): 402-408.
 17. Marshall, A. C., K. S. Kubena, K. R. Hinton, P. S. Hargis and M. E. Van Elswyk, 1994. N-3 Fatty acid enriched table eggs: a survey of consumer acceptability. *Poultry Sci.* 73:1334-1340.
 18. Mazalli M. R., Faria D. E., Salvador D., and Ito D. T. 2004 A Comparison of the Feeding Value of Different Sources of Fats for Laying Hens: 1. Performance Characteristics *J. Appl. Poult. Res.* 13:274–279.
 19. Meluzzi, A., Tallarico, N., Sirri, Cristofori, C. and Giordani, G. 1997. Fortification of hen eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids. In: *Eggs and Egg Products Quality*, Kijowski, J. and Pikul, J. (eds). WPSA, pp. 270-277.
 20. National Research Council. 1994. Nutrient requirements of Poultry. 9th Rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
 21. Neuringer, M.; Anderson, G.J.; Connor, W.E. The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. *Annual Review of Nutrition*, Palo Alto, v.8, p.517-541, 1998.
 22. Oliveira D.D, Baião N. C., Cançado S.V, Grimaldi R., Souza M.R., Lara L.J.C., and Lana A.M.Q. 2010. Effects of lipid sources in the diet of laying hens on the fatty acid profiles of egg yolks. *Poultry Science* 89:2484–2490.
 23. Pappas, A. C., T. Acamovic, N. H. C. Sparks, P. F. Surai and R. M. McDevitt. 2005. Effects of supplementing broiler breeder diets with organic selenium and polyunsaturated fatty acid on egg quality during storage. *Poult. Sci.* 84(6):865-874.
 24. Pasin, G., G.M. Smith and M. O’Mahony, 1998. Rapid determination of total cholesterol in egg yolk using commercial diagnostic cholesterol reagent. *Chem.*, 61: 255-259.
 25. Robertson and Van Soest. 1981. The Analysis of Dietary Fiber. Pages 123-158.
 26. Saleh A.A. 2013. Effects of fish oil on the production performances, polyunsaturated fatty acids and cholesterol levels of yolk in hens. *Emir. J. Food Agric.* 2013. 25 (8): 605-612.
 27. Schreiner M, Hulan HW, Razzazi-Fazeli E, Bohm J, Iben C 2004: Feeding laying hens seal blubber oil: Effects on egg yolk incorporation, stereospecific distribution of omega-3 fatty acids, and sensory aspects. *Poult Sci* 83: 462-473.
 28. Simopoulos, A.P., Leaf A. and Salem Jr. N., 1999. Workshop on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids. *J. Am. Coll. Nutr.*, 18(5): 487-489.
 29. Van Elswyk, M. E., B. M. Hargis, J. D. Williams, and P. S. Hargis, 1994. Dietary menhaden oil contributes to hepatic lipidosis in laying hens. *Poultry Sci.* 73:653–662.
 30. Whitehead, C.C., 1981. The response of egg weight to the inclusion of vegetable oil and linoleic acid in the diet of laying hens. *Br. Poult. Sci.*, 22: 525-532.
 31. Wang PH, Ko YH, Chin HJ, Hsu C, Ding ST, Chen CY, 2009. The effect of feed restriction on expression of hepatic lipogenic genes in broiler chickens and the function of SREBP1. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 153, 327–331.