

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Anže BREJC

**VPLIV DODATKA VITAMINA E V KRMO PIŠČANCEV NA
VSEBNOST OKSIDOV HOLESTEROLA PO SKLADIŠČENJU IN
TOPLOTNI OBDELAVI MESA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF ADDED VITAMIN E IN CHICKEN FEED ON CONTENT
OF CHOLESTEROL OXIDES IN MEAT AFTER STORING AND
THERMAL TREATMENT**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Praktični del je bil opravljen na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Leo Gašperlin, za somentorja dr. Tomaža Polaka in za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića

Mentorica: prof. dr. Lea Gašperlin

Somentor: dr. Tomaž Polak

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anže Brejc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 637.54+636.087.3:577.161.3:543.635.3(043)=163.6
- KG perutninsko meso / vitamin E / krma obogatena z vitaminom E / postopki obdelave mesa / holesterol / oksidi holesterola / analizne metode
- AV BREJC, Anže
- SA GAŠPERLIN, Lea (mentorica)/ POLAK, Tomaž (somentor)/CIGIČ, Blaž (recenzent)
- KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2010
- IN VPLIV DODATKA VITAMINA E V KRMO PIŠČANCEV NA VSEBNOST OKSIDOV HOLESTEROLA PO SKLADIŠČENJU IN TOPLOTNI OBDELAVI MESA
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 47 str., 15 pregl., 7 sl., 35 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen diplomskega dela je bilo ugotoviti, kako dodatek različnih količin sintetičnega vitamina E v krmo piščancev vpliva na nastanek produktov oksidacije holesterola (COP) v njihovem presnem, različno obdelanem ter hranjenem mesu. V poskus je bilo vključenih 84 piščancev provenience Ross 308, 21 dni pred zakolom krmljenih s kontrolirano krmo. Poskusne skupine živali so bile oblikovane glede na dodatek vitamina E in nasičenost maščob v krmi (negativna kontrola s pretežno nasičenimi maščobnimi kislinami (MK), pozitivna kontrola s pretežno večkrat nenasičenimi MK ter skupini z večkrat nenasičenimi MK in različnima dodatkom vitamina E) ter glede na postopke obdelave piščančjega mesa (zmrzovanje pri -70 °C, hranjenje v hladilniku pri 6 °C, kuhanje, svež vzorec in kombinacije). Vsebnost holesterola in oksidov holesterola v homogeniziranih in predpripravljenih vzorcih prsne mišice smo določili po ekstrakciji s trdno fazo in LC-MS/MS, v presnih mišicah pa tudi vsebnost vitamina E. Dodatek vitamina E v krmo piščancev poveča njegovo vsebnost v mesu. V piščančjem mesu smo določili največ 5 α holestena (0,50 mg/100 g), 20 α -hidroksi-, 25-hidroksi- in 7 β -hidroksi-holesterol pa so prisotni v manjših koncentracijah (<0,10 mg/100 g). Večji dodatek vitamina E v krmo ne zavira, izbrani pogoji skladiščenja in toplotne obdelave pa ne pospešujejo nastanka oksidov holesterola v mesu piščancev.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 637.54+636.087.3:577.161.3:543.635.3(043)=163.6
CX poultry meat / vitamin E / feed supplemented with vitamin E / meat processing / cholesterol / cholesterol oxides / analytical methods
AU BREJC, Anže
AA GAŠPERLIN, Lea (supervisor)/POLAK, Tomaž (co-advisor)/CIGIĆ, Blaž (reviewer)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2010
TI EFFECT OF ADDED VITAMIN E IN CHICKEN FEED ON CONTENT OF CHOLESTEROL OXIDES IN MEAT AFTER STORING AND THERMAL TREATMENT
DT Graduation thesis (University studies)
NO X, 47 p., 15 tab., 7 fig., 35 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of this study was to investigate the influence of chicken feed enrichment with different concentrations of vitamin E on formation of cholesterol oxides products (COPs) in raw and processed chicken meat. There were 84 chicken of Ross 308 provenience, 21 days before slaughtering fed controlled feed, included in the experiment. The division into the test groups was established according to the vitamin E addition and saturation of fatty acid in feed (negative control with predominant saturated fatty acids (FA), positive control with predominant unsaturated FA, groups with poly unsaturated FA and different vitamin E adding), and according to processing of raw meat samples (freezing at -70 °C, storing in refrigerator at 6 °C, cooking and combinations of these procedures). Content of cholesterol and COPs in homogenized samples of raw and processed chicken meat were determined after solid phase extraction and LC-MS/MS; the content of vitamin E in meat was determined also. Vitamin E supplement in fed increased its content in meat. Of the COPs 5 α -holesten (0.50 mg/100 g) was determined and 7 β -hydroxy-, 20 α -hydroxy- and 25-hydroxy cholesterol in minor share (<0.10 mg/100 g). Higher amount of added vitamin E in feed does not inhibit formation of COPs, and our conditions of storage and heat treatment does not promote the emergence of COPs in meat chickens.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 REJA PIŠČANCEV	3
2.2 SESTAVA PIŠČANČJEGA MESA.....	4
2.3 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA MESA IN VPLIV MAŠČOBE NA ZDRAVJE	5
2.4 MIKROBIOLOGIJA PIŠČANČJEGA MESA.....	7
2.5 HOLESTEROL	7
2.5.1 Fizikalno-kemijske lastnosti	7
2.5.2 Vloga holesterola v organizmu	8
2.5.3 Metabolizem in zdravje.....	8
2.6 OKSIDI HOLESTEROLA	9
2.6.1 Vpliv oksidov holesterola na zdravje.....	10
2.6.2 Oksidi holesterola v prehrani	10
2.6.3 Zmanjševanje nastanka oksidov holesterola v prehrani.....	11
2.7 METODE DOLOČANJA HOLESTEROLA IN OKSIDOV HOLESTEROLA.....	12
3 MATERIAL IN METODE DELA.....	14
3.1 MATERIAL IN NAČRT POSKUSA	14
3.1.1 Način reje piščancev	14
3.1.1.1 Sestava osnovne krme	15
3.1.1.2 Maščobnokislinska sestava krme	16
3.1.2 Vzorčenje in postopki obdelave vzorcev presnega piščančjega mesa	17
3.1.2.1 Homogenizacija	18

3.2	METODE	19
3.2.1	Določanje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola.....	19
3.2.1.1	Saponifikacija	19
3.2.1.2	Ekstrakcija holesterola in oksidov holesterola	19
3.2.1.3	Ekstrakcija s trdno fazo (SPE).....	20
3.2.1.4	Priprava umeritvenih krivulj po metodi standardnega dodatka.....	20
3.2.1.5	Pogoji LC-MS/MS.....	22
3.2.2	Statistična obdelava podatkov	23
4	REZULTATI	25
4.1	REJA PIŠČANCEV	25
4.2	VSEBNOST VITAMINA E V PRESNEM PIŠČANČJEM MESU.....	26
4.3	DOLOČANJE HOLESTEROLA IN OKSIDOV HOLESTEROLA V RAZLIČNO OBDELANIH VZORCIH PIŠČANČJEGA MESA	27
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	33
5.1	RAZPRAVA	33
5.1.1	Vsebnost vitamina E v presnem piščančjem mesu	33
5.1.2	Vsebnost holesterola v piščančjem mesu, glede na krmo piščancev in glede na obdelavo mesa	33
5.1.3	Vsebnost 5α-holestena v piščančjem mesu, glede na krmo piščancev in glede na obdelavo mesa	34
5.1.4	Vsebnost 7β-hidroksi-holesterola v piščančjem mesu, glede na krmo piščancev in glede na obdelavo mesa	35
5.1.5	Vsebnost 20α-hidroksi-holesterola v piščančjem mesu, glede na krmo piščancev in glede na obdelavo mesa	36
5.1.6	Vsebnost 25-hidroksi-holesterola v piščančjem mesu, glede na krmo piščancev in glede na obdelavo mesa	37
5.1.7	Vsebnost skupnih oksidov holesterola v piščančjem mesu, glede na krmo piščancev in glede na obdelavo mesa	37
5.2	SKLEPI.....	40
6	POVZETEK.....	41
7	VIRI	44

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Število pitovnih piščancev, vzrejenih v Sloveniji med letom 2002 in 2008 (SURS, 2009).....	3
Preglednica 2: Povprečna kemijska sestava porabniških kosov piščanca, na 100 g užitnega dela (Golob in sod., 2006).....	5
Preglednica 3: Maščobnokislinska sestava nekaterih živalskih maščob (%) in izračunano razmerje P/S (Plestenjak in Golob, 2000).....	6
Preglednica 4: Pregled poskusnih skupin živali in njihovih posebnosti krme.....	14
Preglednica 5: Količine dodanega vitamina E/kg krmne mešanice za štiri poskusne skupine piščancev, krmljene z različnimi maščobami in količinami vitamina E.....	15
Preglednica 6: Sestava štirih različnih poskusnih krmnih mešanic za piščance.....	15
Preglednica 7: Vsebnost posameznih maščobnih kislin v vsaki krmni mešanici, prikazana v obliki masnega deleža, glede na 100 g maščobe in vsebnosti v 100 g krme.....	16
Preglednica 8: Postopki obdelave posameznih podskupin vzorcev piščančjega mesa.....	17
Preglednica 9: Razlike v dnevem in skupnem prirastu mase ter porabi krme in konverziji krme med poskusnimi skupinami piščancev (n = 6), krmljenimi z različnimi maščobami in količinami vitamina E (model 1).....	25
Preglednica 10: Vpliv dodatka vitamina E v krmo na vsebnost njegovih treh oblik (α -, β - in γ -tokoferola, v mg/100 g mesa in nmol/g mesa) v presnem mesu piščancev (model 1, n = 6).....	26
Preglednica 11: Izračunani osnovni statistični parametri, za rezultate določanja vsebnosti holesterola in oksidov holesterola (mg/100g), skupno za vse vzorce piščančjega mesa.....	27

Preglednica 12: Vpliv dodatka vitamina E v krmo piščancev na vsebnost holesterola in oksidov holesterola (mg/100 g) v mesu, po različnih načinih obdelave (model 2, Duncan test, $\alpha = 0,05$).....	28
Preglednica 13: Vpliv načina obdelave na vsebnost holesterola in oksidov holesterola (mg/100 g) v mesu, pridobljenem po različnem dodatku vitamina E v krmo piščancev (Model 2, Duncan test, $\alpha = 0,05$).....	30
Preglednica 14: Vpliv dodatka vitamina E v krmo piščancev in načina obdelave na delež oksidov holesterola od skupnega holesterola v piščančjem mesu (model 2, Duncan test, $\alpha = 0,05$).....	32
Preglednica 15: Vsebnost vitamina E v krmi štirih skupin piščancev in vsebnost treh oblik vitamina E v presnem piščančjem mesu	33

KAZALO SLIK

Slika 1:	Strukturna formula holesterola (Fisher, 2009).....	8
Slika 2:	Piščanca provenience Ross 308 (Aviagen Group, 2010).....	14
Slika 3:	Umeritvena krivulja za določanje holesterola v vzorcih.....	20
Slika 4:	Umeritvena krivulja za določanje 25-hidroksi-holesterola v vzorcih.....	21
Slika 5:	Umeritvena krivulja za določanje 5 α -holestena v vzorcih.....	21
Slika 6:	Umeritvena krivulja za določanje 7 β -hidroksi-holesterola v vzorcih.....	22
Slika 7:	Umeritvena krivulja za določanje 20 α -hidroksi-holesterola v vzorcih.....	22

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ENMK	enkrat nenasičene maščobne kisline
GC	plinska kromatografija (angl. Gas Chromatography)
GC-MS	plinska kromatografija z masnim spektrometrom
HDL	lipoproteini velike gostote (angl. High Density Lipoproteins)
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
IA	indeks aterogenosti
IU	mednarodna enota (angl. International Units)
K	kuhan vzorec
KH	kuhan vzorec, hranjen v hladilniku
kontN	negativna kontrolna skupina
kontP	pozitivna kontrolna skupina
K3	kuhan vzorec, hranjen tri mesece v zamrzovalniku
LDL	lipoproteini majhne gostote (angl. Low Density Lipoproteins)
MK	maščobne kisline
MRM	način detekcije masnega detektorja (Multi Reaction Monitoring)
NMK	nasičene maščobne kisline
n-3	omega tri maščobne kisline
n-6	omega šest maščobne kisline
P/S	razmerje med vsoto vseh VNMK in vsoto vseh NMK
PVC	poli-vinil-klorid
RI	refrakcijski indeks (lomni količnik)
S	svež vzorec
SH	svež vzorec, hranjen v hladilniku
SPE	ekstrakcija s trdo fazo (angl. Solid Phase Extraction)
S3	svež vzorec, hranjen tri mesece v zamrzovalniku
UV	ultra vijolično sevanje
VLDL	lipoproteini zelo majhne gostote (angl. Very Low Density Lipoproteins)
VNMK	večkrat nenasičene maščobne kisline
vit E-DL	DL- α .tokoferol = vitamin E

1 UVOD

V zadnjih letih se vse več govori o zdravi prehrani in o pravilnem načinu prehranjevanja. Potrošniki so glede tega vse bolj izobraženi in zato tudi vse bolj pozorni na to, kakšne izdelke kupujejo. Pri izbiri mesa in mesnin običajno dajo prednost belemu mesu, predvsem piščančjemu in izdelkom iz piščančjega mesa. Dejstvo je, da se zaužije največ piščančjega mesa in da se njegova prodaja iz leta v leto povečuje. To je na trgu povzročilo pravi razcvet v ponudbi novih izdelkov in polpripravljenega mesa, konkurenca pa tekmuje, kdo bo potrošnikom ponudil bolj zdravju prijazen izdelek.

Piščanče meso je, ob pravilni pripravi, lahko pomembna sestavina uravnotežene prehrane, saj vsebuje veliko beljakovin in malo maščob. Kot vse ostale vrste mesa pa vsebuje določeno količino holesterola. Res je, da v prehrani človeka holesterol v celoti izvira iz hrane živalskega izvora, to je meso vseh vrst, mleko, jajca in njihovi izdelki. Vendar pa sta vsebnost maščob in njihova sestava v prehrani tista ključna dejavnika, ki vplivata na vsebnost serumskega holesterola pri človeku in tako na nevarnost pojava bolezni srca in ožilja. Prehranski vnos holesterola ima na splošno vse manjši pomen, vse več pozornosti se posveča oksidacijskim produktom holesterola – oksisterolom. Tako v Skandinavskih deželah nimajo nič več omejitev v dnevno zaužiti količini holesterola, temveč so zmanjšali vnos nasičenih maščobnih kislin, ki posredno zmanjšajo tudi vnos holesterola (Piironen in sod., 2002). Vsa živila, ki vsebujejo holesterol, so tudi občutljiva za oksidacijo, še posebej tista, ki so dehidrirana, sevana ali toplotno obdelana v prisotnosti kisika. Ne samo predelava, tudi daljše shranjevanje omenjenih živil, ki niso vakuumsko pakirana, poveča kopičenje oksidov holesterola. Najnovejše raziskave se ukvarjajo s potencialno toksičnostjo oksidov holesterola (Leonarduzzi in sod., 2002), pogoji za njihov nastanek, možnostmi zmanjševanja v prehrani in vplivom na zdravje.

S to nalogo smo želeli ugotoviti kako dodatek različnih količin sintetičnega vitamina E v kontrolirano krmo piščancev vpliva na nastanek oksidov holesterola v njihovem mesu. Namen tega dela je bilo ugotoviti tudi smiselnost in morebitni pozitivni učinek dodatka vitamina E v krmo piščancev na znižanje ravni oksidov holesterola po določenih postopkih z mesom, kot so shranjevanje, kuhanje in zmrzovanje. Ugodnejša sestava piščančjega mesa

obogatena z vitaminom E, z vidika oksidov holesterola, bi temu živilu dala še dodatno vrednost, saj gredo trendi zdrave prehrane prav v tej smeri.

1.1 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da bo meso piščancev, krmljenih z več vitamina E, imelo večjo vsebnost tega vitamina. Poglavitna predpostavka pa je bila, da bomo, z dodanim vitaminom E v krmo piščancev, v njihovem mesu pomembno zmanjšali nastanek oksidov holesterola v primerjavi z mesom piščancev, katerim vitamin E v krmo ni bil dodan, ne glede na postopke z mesom med predelavo in hranjenjem. Glede na to, da postopki predelave povečujejo dovzetnost mesa za oksidacijo, smo v kuhanih vzorcih pričakovali največjo vsebnost oksidov holesterola. V mesu med hlajenjem in zmrzovanjem potekajo fizikalni in biokemijski procesi v manjšem obsegu kot pri kuhanju, zato smo pričakovali, da bo v vzorcih, hranjenih v hladilniku ali zamrzovalniku, nastalo bistveno manj oksidov holesterola kot v kuhanih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 REJA PIŠČANCEV

V Sloveniji je reja piščancev dobro razvita. Večje farme lahko najdemo predvsem v Prekmurju, kjer so dobri pogoji za pridelovanje žita oziroma piščančje krme. Kot lahko vidimo iz preglednice 1, je število pitovnih piščancev vseskozi nekje med dvema in tremi milijoni živali na leto. Med letoma 2003 in 2004 je prišlo do precejšnega upada prireje zaradi nevarnosti okužbe s t. i. ptičjo gripo. V tem času so rejci perutnine, zaradi veterinarske prepovedi reje perutnine na prostem, prosto rejo piščancev preoblikovali v zaprto rejo. Zadnja leta trend vzreje nekoliko niha, vendar poraba piščančjega mesa vseskozi narašča.

Preglednica 1: Število pitovnih piščancev, vzrejenih v Sloveniji med letom 2002 in 2008 (SURS, 2009)

leto	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
št. pitovnih piščancev	2.919.809	2.523.801	1.753.584	1.598.478	1.566.749	2.837.377	2.392.661

Glede na način reje pitovnih piščancev imamo v Sloveniji enake predpise kakor drugod po Evropi. Poznamo pet načinov reje. Način reje, ob izpolnitvi določenih pogojev, lahko zapišemo na embalažo in služi potrošniku kot pomembna informacija. Prvi način je ekstenzivna zaprta reja. Pri tej vzreji ne sme biti na m² površine več kot 12 živali oziroma ne več kot 25 kg skupne telesne mase. Ob zakolu piščanci ne smejo biti mlajši od 56 dni. Drugi način je reja v izpustu oziroma prosta reja. Gostota naselitve, je v tem primeru lahko 13 živali na m² oziroma ne več kot 27,5 kg skupne telesne mase, vendar morajo imeti najmanj polovico pitovnega obdobja stalen izpust na zunanje površine, pokrite z vegetacijo. Pri tem mora biti izpust velik najmanj toliko kot meri daljša stranica kurnice, zelena površina pa mora biti velika toliko m² kot je število piščancev. Krma živali mora vsebovati najmanj 70 % žit. Tretji način je tradicionalna reja v izpustih. Na m² površine hleva ne sme biti več kot 12 živali oziroma ne več kot 25 kg skupne telesne mase. Hlev ne sme presegati površine 1600 m², v njem pa je lahko največ 4800 piščancev. Od šestih

tednov starosti dalje morajo imeti preko dneva živali stalen izpust na zelene površine, ki morajo meriti vsaj 2 m² na žival. Ob zakolu pitanci ne smejo biti mlajši od 81 dni. Četrti način je reja z neomejenim izpustom. Za to vzrejo morajo biti izpolnjeni vsi pogoji prejšnje, s to razliko, da se živali tekom dneva gibljejo na neomejenih površinah. Za peti način reje lahko izberemo enega izmed prej naštetih načinov, s tem da živali krmimo s posebno sestavo krme. Cilj te reje je ponuditi potrošniku žival, krmljeno s specifično vrsto žita ali druge hrane, kar tudi napišemo na embalažo. Za npr. piščanca krmljenega s pšenico, mora biti v krmi najmanj 35 % pšenice. Enako velja za vsa ostala žita, razen koruze, katere delež mora biti najmanj 50 %. Če žival krmimo z zeleno zelenjavo ali mlečnimi beljakovinami, mora biti zastopanost v krmi najmanj 5 %. Čeprav imajo kmetje na voljo različne načine vzreje piščancev, se največ poslužujejo zaprte reje v velikih hlevih, saj je veterinarski nadzor tako najlažji in najbolj učinkovit (Commission Regulation, 1991; Holcman, 2001).

2.2 SESTAVA PIŠČANČJEGA MESA

Piščančje meso je v zadnjem času vse bolj zastopano v prehrani. Razlog je v ceni in trendu uživanja belega mesa. Znano je, da je perutninsko meso kot vir t.i. visokovrednih beljakovin živalskega izvora boljše kot meso drugih klavnih živali. Vzrok za to je predvsem manjša količina manjvrednih beljakovin veznega tkiva. Poleg tega je to meso, če odstranimo kožo, kvalitetnejše tudi zaradi malo mišične maščobe. Pravimo, da je meso pusto (Marinšek, 1996). Pri perutnini se maščoba nahaja predvsem kot podkožna in medmišična. To maščobo pa pri pripravi ali pa pri jedi enostavno odstranimo.

Meso vsebuje veliko vode, ne glede katere vrste je. Tako tudi piščančje meso vsebuje od 70-75 % vode. Druga glavna sestavina so beljakovine, ki jih je nekje 20 %. Količinsko se najbolj razlikuje vsebnost maščobe, ki je lahko 1 % v pustem mesu prsi, pa do 13 % v temnejšem mesu beder in peruti. Vsebnost pepela je 1 %, ne glede kateri porabniški kos gledamo. V mesu najdemo tudi druge sestavine v manjših koncentracijah, to so holesterol, ki ga je nekje 60-80 mg/100 g mesa, makroelemente, kot so natrij, kalij, kalcij, fosfor, magnezij, in mikroelemente železo, cink, selen, baker in mangan (Golob in sod., 2006).

Preglednica 2: Povprečna kemijska sestava porabniških kosov piščanca, na 100 g užitnega dela (Golob in sod., 2006)

sestavina	prsa brez kože	prsa s kožo	bedro brez kože	bedro s kožo
voda (g)	74,8	71,3	73,8	69,2
beljakovine (g)	22,8	21,9	18,6	17,0
maščobe (g)	1,5	7,0	6,9	12,6
holesterol (mg)	60,2	76,6	69,7	80,1
pepel (g)	1,19	1,11	1,01	0,94
energija (kJ)	442	632	572	755

2.3 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA MESA IN VPLIV MAŠČOBE NA ZDRAVJE

Za zdravje je pomemben delež maščobe v naši dnevni prehrani. Združenje nemškega, avstrijskega in švicarskega prehranskega društva (Referenčne vrednosti ... , 2004) priporoča dnevni vnos energije, pridobljene iz maščob, okoli 30 %. Od tega naj bi bilo eno tretjino nasičenih, dolgoveržnih maščob, tretjino enkrat nenasičenih in tretjino večkrat nenasičenih maščob, pretežno rastlinskega izvora (Referenčne vrednosti, 2004). Za zdravje pa ni pomembna le količina zaužitih maščob, temveč tudi njena sestava, torej vrste maščobnih kislin zastopane v maščobi. V živilih so najpogostejše tiste s 16, 18, 20 in 22 ogljikovimi atomi. Alkilna veriga kisline je lahko popolnoma nasičena, tj. vsebuje samo enojne vezi ali pa je nenasičena in vsebuje eno ali več dvojnih vezi. V večini nenasičenih kislin je dvojna vez med devetim in desetim ogljikovim atomom. Če pa vsebuje molekula maščobne kisline več dvojnih vezi, potem se te nahajajo med končno metilno skupino in devetim ogljikovim atomom. Nasičene maščobe imajo tališče pri višji temperaturi kot nenasičene z enakim številom ogljikovih atomov v molekuli. To se odraža v različni temperaturi tališča maščob, z različno vsebnostjo enih in drugih maščobnih kislin. Naravne nenasičene maščobne kisline imajo običajno cis konfiguracijo. Izjema je maščoba prežvekovalcev, ki vsebuje približno 1 % trans maščobnih kislin. Te imajo škodljive učinke na naše zdravje, saj je dokazano, da zvišajo plazemski LDL holesterol in znižajo HDL holesterol, kar pa poveča možnost nastanka srčno-žilnih bolezni. Nekatere maščobne kisline so za človeka tudi esencialne, kar pomeni, da jih telo ne more sintetizirati in jih moramo zaužiti s

prehrano. Te kisline so linolna (18:2, n-6), α -linolenska (18:3, n-3) in arahidonska (20:4, n-6).

Piščančje meso vsebuje približno 31 % nasičenih maščobnih kislin, kar je veliko manj kot v govejem ali ovčjem mesu ki jih vsebujeta preko 42 %. Enkrat nenasičenih maščobnih kislin je približno 47 %. Prehransko najbolj zanimivih večkrat nenasičenih kislin je v piščančjem mesu kar 23 %, za razliko od govejega mesa kjer jih je le 5 %. Da si lažje predstavljamo prehransko vrednost mesa, so si zamislili različne koeficiente, ki se jih da izračunati. Najpogostejše in najenostavnejše je razmerje P/S. To je razmerje med večkrat nenasičenimi in nasičenimi maščobnimi kislinami. $P/S < 0,5$ pomeni neugodno sestavo maščobe, ki povečuje možnost kardiovaskularnih bolezni. Temu kriteriju zadostuje samo piščančje meso, katerega razmerje P/S je 0,85. Drug koeficient, ki velja kot boljši pokazatelj prehranske vrednosti, pa je indeks aterogenosti ali IA. Ta upošteva specifične vplive posameznih MK na koncentracijo holesterola v krvi, ki so lahko pozitivni ali negativni. S prehranskega vidika so ugodnejše maščobe, ki imajo IA manjši od 0,5. Piščančje meso je tudi s tega vidika zdravju prijazno, saj je njegov IA okoli 0,45 (Plestenjak in Golob, 2000).

Preglednica 3: Maščobnokislinska sestava nekaterih živalskih maščob (%) in izračunano razmerje P/S (Plestenjak in Golob, 2000)

maščobna kislina	piščanec (%)	prašič (%)	govedo (%)	ovca (%)	gos (%)
C14:0	0,5	1,15	2,95	1,9	0,48
C16:0	19,1	23,5	24,7	18,7	20,6
C16:1	3,0	3,4	3,35	7,0	2,65
C18:0	7,5	13,4	15,1	22,2	6,2
C18:1	47,2	41,2	38,8	32,3	54,9
C18:2	21,6	8,6	3,85	3,34	9,35
C18:3	1,5	0,98	0,48	/	1,19
Σ NMK	27,1	38	42,8	42,8	27,3
Σ ENMK	50,2	44,5	42,1	32,3	57,5
Σ VNMK	23,1	9,58	4,33	3,34	10,5
P/S	0,85	0,25	0,10	0,08	0,44

NMK – nasičene maščobne kisline: C14:0, C16:0, C18:0; ENMK – enkrat nenasičene maščobne kisline: C16:1, C18:1; VNMK – večkrat nenasičene maščobne kisline: C18:2, C18:3; P/S – razmerje med VNMK in NMK.

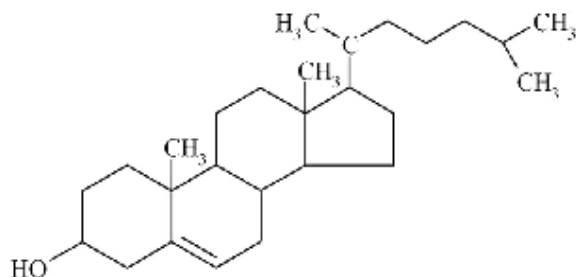
2.4 MIKROBIOLOGIJA PIŠČANČJEGA MESA

Mikrobiološka varnost perutnine se začne že s prvim dnevom vzreje. Zaradi velikih jat – tudi več 1000 živali, je zelo težko preprečevati okužbe z različnimi mikroorganizmi. Že po naravi je perutnina življenjski prostor bakterij rodu *Salmonella* in *Campylobacter*. Nekateri sevi so lahko za ljudi patogeni, zato se izvaja poostren veterinarski nadzor skozi celotno obdobje reje, preko klavne linije, do porabniških kosov ali izdelkov. Kljub nenehnemu nadzoru pa je to meso še vedno pogost vzrok za okužbo s salmonelami ali kampilobakterijami. Redkeje se na perutnini pojavljajo tudi drugi patogeni mikroorganizmi, kot so bakterije rodu *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium avium*, *Staphylococcus aureus* in *Yersinia enterocolitica*. Vsi ti mikroorganizmi se lahko pojavijo tudi na in v perutninskem mesu. Zaradi odstranjevanja perja je po zakolu koža poškodovana in mikroorganizmi se lahko brez težav pritrdijo na površino. Ker je površina v primerjavi z mišično maso velika, aktivnost vode visoka in pH vrednost ugodna, se mikroorganizmi ob ugodni temperaturi, lahko začnejo razmnoževati. Za zmanjšanje njihovega števila na trupih se razvijajo različne kemijske in fizikalne metode, kot so uporaba klora, ozona, kislin (ocetne, mlečne in citronske), ionizirajoče sevanje, UV-sevanje in uporaba vodne pare. V kolikor so nato trupi ustrezno zapakirani, ohlajeni in zamrznjeni, je njihova obstojnost lahko tudi 10 tednov. Za pripravo piščančjega mesa je znano, da moramo uporabiti dovolj visoke središčne temperature. S kvalitetnim veterinarskim nadzorom tekom celotne vzreje in vestni pripravi mesa za končno uživanje, ni nevarnosti za nobeno okužbo (Gašperlin in Bem, 2003).

2.5 HOLESTEROL

2.5.1 Fizikalno-kemijske lastnosti

Holesterol je kemijska spojina, ki jo uvrščamo med sterole, ti pa spadajo v skupino lipidov. Je bela, lesketajoča, kristalinična snov. Empirična formula holesterola je $C_{27}H_{45}OH$, njegova molska masa pa znaša 386,7 g/mol. Tali se pri temperaturi 148,5 °C, vre pa pri 360 °C (Sheppard in sod., 2003).



Slika 1: **Strukturna formula holesterola** (Fisher, 2009)

Holesterol sestavljajo trije šest členski obroči in en pet členski. Označimo jih s črkami A, B, C in D. Na prvem obroču (A) ima hidroksilno skupino, ki predstavlja polarni del molekule. Na drugem (B) se nahaja dvojna vez, na pet členski obroč (D), pa je vezana veriga ogljikovodikov, ki skupaj z obroči predstavlja nepolarni del. Zaradi nepolarnosti holesterol ni topen v vodi. Delno se topi v alkoholu, dobro pa v nepolarnih topilih, kot so benzen, heksan, petroleter, olja ... (Sheppard in sod., 2003).

2.5.2 Vloga holesterola v organizmu

Holesterol so prvič odkrili leta 1769 v žolčnih kamnih. Danes vemo, da se nahaja v vseh celicah živali in ljudi. V telesu je nepogrešljiv, saj skrbi za njegovo nemoteno delovanje. V celičnih membranah je ena pomembnejših komponent, saj skrbi za njihovo prepustnost in fluidnost. Je sestavni del žolčnih kislin, ki vplivajo na razgradnjo in absorpcijo maščob. Telo uporablja holesterol tudi za izdelavo steroidnih in spolnih hormonov ter vitamina D. Je tudi pomemben gradnik mielinske ovojnice, ki obdaja živčna vlakna (Arnold in Kwiterovich, 2003).

2.5.3 Metabolizem in zdravje

V telesu odraslega človeka se nahaja nekje 100 g holesterola. Za organizem je esencialnega pomena, kar pomeni, da je njegovo pomanjkanje ali pa presežek zdravju škodljivo. Telo dobi holesterol iz živil živalskega izvora. Največ ga je v jajcih, drobovini, mesu, mleku ... Absorbira se v intestinalnem traktu. Ob vstopu v telo se najprej zaestri z neko maščobno kislino nato pa se vključi v hilomikrone skupaj z ostalo maščobo. Sprva potuje po limfi kasneje pa po krvi do jeter. Čeprav so vse telesne celice zmožne sintetizirati holesterol, ga

največ nastane v jetrih iz acetil CoA. V jetrih se holesterol iz hilomikronov vključi v lipoproteine zelo nizke gostote ali VLDL. VLDL prenašajo holesterol in maščobne kisline po telesu. Z razpadom VLDL nastanejo lipoproteini nizke gostote ali LDL, ki prav tako prenašajo holesterol iz jeter do telesnih celic. Poznamo pa tudi lipoproteine visoke gostote ali HDL. Ti lipoproteini prenašajo holesterol iz periferije nazaj v jetra, kjer se pretvori v druge organske molekule. (Arnold in Kwiterovich, 2003).

V zadnjih petdesetih letih se metabolizem holesterola in predvsem njegovo uravnavanje veliko raziskuje. S sodobnim načinom življenja zaužijemo vse več maščob in holesterola. S tem se podre homeostaza telesa in to se odraža v obolevanju za različnimi boleznimi. Najbolj znane so srčno-žilne bolezni, kot so ateroskleroza, srčna kap, povečan krvni tlak ... Povečanje dnevnega vnosa holesterola je eden izmed pomembnejših dejavnikov za nastanek bolezni. V telesu se poveča predvsem LDL, ki pa velja za škodljivega. Pod določenimi pogoji se začne odlagati v stenah žil in skupaj z levkociti in trombociti začne oblikovati strdek. Če se tak strdek začne premikati po žili naprej, lahko povzroči srčno kap. To pa je razlog, da se v prehrani vse bolj izogibamo holesterolu. Referenčne vrednosti za vnos hranil (2004) predvidevajo, da naj odrasel človek ne bi s prehrano zaužil več kot 300 mg holesterola na dan. Bolj kot sam holesterol pa so nevarni oksidi holesterola (Sheppard in sod., 2003).

2.6 OKSIDI HOLESTEROLA

Oksidi holesterola so produkti oksidacije holesterola, pri čemer oksidirana molekula vsebuje dodatno funkcionalno skupino – hidroksilno ali epoksilno. Oksidacija holesterola poteka podobno kot oksidacija lipidov. Sproži jo prisotnost kisika, visoka temperatura in/ali svetloba, rezultat pa je oksidacija ali fotooksidacija. Prav tako jo sprožijo tudi prosti radikali in hidroksiperoksidi, ki nastanejo med oksidacijo lipidov (Azadmard-Damirchi in Dutta, 2009). Čeprav je holesterol pri visokih temperaturah stabilen, je v kombinaciji s triacilgliceroli podvržen procesom razgradnje. Tako nastajajo oksisteroli, katerih struktura je odvisna od maščobnih kislin v živilu. Vsi običajni oksidi holesterola so produkti holesteril estrske oksidacije, vendar je njihov nastanek bistveno hitrejši ob prisotnosti VNMK (sojino, sončnično, ribje olje) kot ob prisotnosti nasičenih maščob. Holesterol v

ribjem olju se razgradi že po eni uri segrevanja. Holesterol se torej v živilih oksidira v prisotnosti maščob (Toschi in Caboni, 1992; Lercker in Rodriguez-Estrada., 2000).

Oksidi holesterola se v večjih količinah pojavijo v predpripravljenih jedeh, ki so toplotno obdelane ali pa dlje časa čakajo na uporabo. Tvorbo oksidov holesterola v izdelkih živalskega izvora se lahko uspešno zavira z uporabo nizkih temperatur obdelave, oziroma minimalno predelavo, z uporabo embalaranja izdelkov pri majhnih koncentracijah kisika, s temnim delovnim prostorom in tudi z dodatkom antioksidantov v krmo živali ali pa v samo živilo (Hur in sod., 2006).

Poznanih je že okoli 80 različnih oksidov holesterola. Med njimi se v hrani najpogosteje pojavljajo naslednje oblike: 7-ketoholestrol, 6-ketoholesterol, 7 α -hidroksiholesterol, 7 β -hidroksiholesterol, 5,6 α -epoksiholesterol, 5,6 β -epoksiholesterol, 25-hidroksiholesterol, 20-hidroksiholesterol in holestantriol (Boselli in sod., 2001).

2.6.1 Vpliv oksidov holesterola na zdravje

Holesterol je v organizmu škodljiv, kadar ga je več, kot ga telo potrebuje. Oksidi holesterola pa so zdravju škodljivi, toksični produkti že v zelo majhnih koncentracijah in jih v telo lahko vnesemo s hrano ali pa nastajajo *in vivo* s peroksidacijo holesterola (Boselli in sod., 2001). Raziskave so pokazale, da oksisteroli lahko izzovejo različne kronične in degenerativne bolezni (rak, pospešeno staranje, ateroskleroza (Berliner in Heinecke, 1996), so citotoksični in tudi mutageni (Smith, 1996), kar se je pokazalo tako na *in vitro* kot tudi *in vivo* študijah. Ker pa je produktov oksidacije holesterola veliko, so lahko tudi njihovi vplivi na zdravje različni.

2.6.2 Oksidi holesterola v prehrani

Okside holesterola torej v telo vnesemo predvsem z živali, ki vsebujejo holesterol, kot so jajca in jajčne jedi, meso in mesni izdelki, mleko in mlečni izdelki, morska hrana in gotove jedi. Vendar so koncentracije v svežih, toplotno obdelanih živilih zelo majhne. Pri živilih, ki pa so bila izpostavljena visokim temperaturam, pa se vsebnost oksisterolov poveča (Boselli in sod., 2001). Dovzetnost za oksidacijo je odvisna tudi od razmerja nasičenih in

nenasičenih maščobnih kislin v živilu. Tako zaradi velike vsebnosti n-3 maščobnih kislin, najhitreje oksidirajo ribe, sledijo pa jim perutnina, svinjina, govedina in ovčetina (Brown in Jessup, 1999). Znanstveniki ugotavljajo, da se v določenih jedeh holesterol lahko nahaja od 1 do 10 % v obliki oksidov. Zato so današnje smernice v pripravi hrane usmerjene v njihovo zniževanje in s tem potrošnikom ponuditi varnejšo hrano (Hur in sod., 2006).

2.6.3 Zmanjševanje nastanka oksidov holesterola v prehrani

Obseg tvorbe oksidov holesterola v izdelkih lahko zmanjšamo na več načinov. Običajen je način, da se v izdelkih zmanjša vsebnost holesterola ali maščob in s tem posredno zmanjša tudi vsebnost oksidov holesterola. Vendar pa je potrebno poudariti, da je postopek odstranjevanja holesterola izjemno drag, saj zahteva posebne pogoje za ekstrakcijo s CO₂. V praksi se zato pogosteje v izdelku zmanjša vsebnost maščob in s tem posledično zmanjša vsebnost holesterola (Jimenez-Colmenero in sod., 2006). Na zmanjšanje maščobe v mesu ali na spremenjeno maščobnokislinsko sestavo mesa pa lahko vplivamo že pri reji živali. Dokazano je bilo, da se z uravnavanjem prehrane piščancev da spreminjati njihovo sestavo maščobe (Polak, 1999). Dober uspeh so dosegli tudi pri prašičih, pri govedu pa se zaradi drugačne presnove, to ne odraža v dovolj veliki meri (Reig in sod., 2006). Prav tako je dokazano, da se z dodatkom antioksidantov, npr. Vitamina E v krmo živali, njihova vsebnost v telesu poveča, to pa pomeni boljšo antioksidacijsko sposobnost mesa (Eder in sod., 2005).

Namesto da spreminjamo sestavo živila, lahko upočasnimo hitrost oksidacije tako holesterola kot tudi ostalih komponent, ki so podvržene oksidaciji. V presnem in toplotno obdelanem mesu ter mesnih izdelkih to lahko storimo z uporabo antioksidantov, z razsoljevanjem in dodatkom fosfatov in drugih kelatnih snovi, askorbatov in ostalih reducentov, produktov Maillardove reakcije in dimljenjem ... Lahko pa izdelek pred oksidacijo zaščitimo tudi z ustreznim pakiranjem (Žlender, 2000).

2.7 METODE DOLOČANJA HOLESTEROLA IN OKSIDOV HOLESTEROLA

Določanje vsebnosti holesterola z analitskega vidika ni problematično, saj se v živilih nahaja v relativno veliki koncentraciji. Oksidi holesterola pa se nahajajo v zelo majhnih koncentracijah in so velikokrat pod mejo detekcije, zato je njihova analiza težja. Analiza oksidov holesterola je pogojena s strukturo oksidov, saj imajo molekule različne funkcionalne skupine, ki povzročijo različno polarnost in druge kemijske posebnosti. Poznane so tudi različne izomere, ki imajo identično strukturo molekule, spektrofotometrično enakost in razpadejo na enake fragmente. Zaradi nizke koncentracije oksidov in močnega vpliva ostalih podobnih kemičnih spojin, je v vseh postopkih analize prva faza ekstrakcija in čiščenje analita. Torej, kvantitativna analiza oksidov holesterola v glavnem temelji na ekstrakciji lipidov, hladni saponifikaciji, postopku SPE in analizi na plinskem kromatogramu (GC) ali na HPLC. Pri dobljenih rezultatih moramo upoštevati tudi možnost, da je koncentracija lahko višja kot je dejanska vsebnost v živilu, saj lahko oksidi holesterola v manjši meri nastajajo tudi med pripravo vzorca (Boselli in sod., 2001). Rešitev te težave je v visoko zmogljivi tekočinski kromatografiji (HPLC), kjer se uporablja sobna temperatura. Ena od prednosti uporabe HPLC je tudi v izbiri različnih detektorjev. Uporablja se masni spektrometer (MS), UV detektor in detektorji za merjenje refrakcijskega indeksa (RI), merjenje fluorescence, ionizacije in kemiluminiscence. Med seboj se razlikujejo v možnosti detekcij različnih oksidov, v možnosti zaznave majhnih koncentracij ... (Saldanha in sod., 2006). Težavo pri kvantitativni določitvi predstavlja tudi zelo podobna kemijska struktura oksisterolov in bistveno večje vsebnosti drugih lipidov (holesterola, triacilglicerolov, fosfolipidov...) v živilih, zato je njihovo popolno ločitev izredno težko doseči (Azadmard-Damirchi in Dutta, 2009).

V nadaljevanju je zbranih nekaj načinov določanja oksidov holesterola, ki so jih raziskovalci uporabljali pri delu.

Saldanha in sod. (2006) so v morskih ribah določili dvanajst oksidov holesterola. Metoda je temeljila na 22-urni saponifikaciji vzorca s KOH v etanolu. Nato so vzorcu dodali vodo in heksan, s katerim so ekstrahirali holesterol in okside holesterola. Polarno fazo so ločili in posušili v dušiku ter raztopili v mobilni fazi n-heksana in 2-propanola (97:3). Pred

začetkom analize so vzorec še prefiltrirali skozi 22 µm Millipore filter. Za detekcijo so uporabili HPLC z UV in RI detektorjem.

Baggio in Bragagnolo (2006) sta določala holesterol in okside holesterola v piščančjih izdelkih. Njuna metoda je temeljila na hladni saponifikaciji in ekstrakciji z etiletrom. Za mobilno fazo so uporabili n-heksan/2-propanol (96:4), za detekcijo pa HPLC z RI detektorjem.

Ubhayasekera in sod. (2004) so preverili najprimernejši način umiljanja vzorca za nadaljnjo analizo s plinsko kromatografijo. Tako so izbrali hladno umiljanje z 1 M raztopino KOH v 95 % etanolu, hladno umiljanje z raztopino KOH v metanolu, vroče umiljanje z raztopino KOH v 95 % etanolu in transesterifikacijo v raztopini Na-metilata in tetra-butil metil etra (4:6). Za vse načine so nato uporabili koncentriranje oksidov z ekstrakcijo na trdi fazi (SPE), nato pa je sledila derivatizacija oziroma priprava trimetilsilil etrov. Okside holesterola so na koncu določili s plinsko kromatografijo (GC), kjer so uporabili ionizacijski detektor. Prišli so do zaključka, da je najbolj uporabna prva metoda s hladnim umiljenjem in uporabo etanola, predvsem če je v vzorcu malo oksidov. Tudi zadnja metoda transesterifikacije je obetavna, saj je najhitrejša, vendar bi jo bilo potrebno še nekoliko izpopolniti zaradi določenih pomanjkljivosti.

Podobno so raziskovali tudi Mariutti in sod. (2008) ter prišli do podobnih ugotovitev. Ugotovili so, da je za določanje holesterola in njegovih oksidov v piščančjih prsih najboljši naslednji postopek. Hladna saponifikacija enega grama vzorca v 10 mL 20 % raztopine KOH v 90 % etanolu, ki traja 20 ur v temi in s konstantnim mešanjem. Nato so dodali vodo in neumiljive snovi ekstrahirali s heksanom. Heksan so prečistili z raztopino KOH in destilirano vodo, nato pa vse skupaj posušili v dušiku. Dobljeno suho snov so raztopili v mililitru mobilne faze n-heksan/2-propanol (97:3) in prefiltrirali skozi 0,45µm Millipore membrano. Vzorec so analizirali s HPLC z uporabo UV in IR detektorja.

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL IN NAČRT POSKUSA

3.1.1 Način reje piščancev



Slika 2: Piščanca provenience Ross 308 (Aviagen Group, 2010)

Preglednica 4: Pregled poskusnih skupin živali in njihovih posebnosti krme

krmne skupine	posebnost krme	dodatki
negativna kontrola (kontN)	maščoba v krmi pretežno iz nasičenih MK -7,5 %	palmova mast
pozitivna kontrola (kontP)	maščoba v krmi pretežno iz večkrat nenasičenih MK - 7,5 %	laneno olje
vitamin E (vitE-DL)	večkrat nenasičene MK in majhen dodatek vitamina E	laneno olje dl-all-rac- α .tokoferol
vitamin E (vitE-200)	večkrat nenasičene MK in velik dodatek vitamina E	laneno olje dl-all-rac- α .tokoferol

MK – maščobna kislina

V poskus je bilo vključenih 84 piščancev provenience Ross 308, moškega spola. Poskusne živali so bile pri starosti 21 dni uhlevljene individualno v žične kletke, kjer so imele vseskozi dostop do vode in krme. Glede na dodatek vitamina E in nasičenost maščob v prehrani so bile živali razporejene v štiri enako velike skupine: (1) negativno kontrolo (kontN), (2) pozitivno kontrolo (kontP), (3) manjši dodatek vitamina E (vitE-DL) in (4) večji dodatek vitamina E (vitE-200). Prva skupina piščancev kontN je kot dodatek prehrani prejela palmovo mast, ki je bogata z nasičenimi maščobami. Druga skupina kontP je namesto palmove masti prejela laneno olje, bogato z večkrat nenasičenimi maščobnimi kisljinami. Tretja skupina vitE-DL je poleg lanenega olja prejela tudi dodatek vitamina E (dl-all-rac- α tokoferol), ki je obenem tudi antioksidant. Enako kot tretja skupina je vitamin E prejela tudi četrta skupina vitE-200, le da je bilo dodatka veliko več (preglednica 5).

Poskus je trajal od 21. do 46. dne starosti, ko so bili piščanci zaklani in odvzeti vzorci njihovega mesa za analize.

Preglednica 5: Količine dodanega vitamina E/kg krmne mešanice za štiri poskusne skupine piščancev, krmljene z različnimi maščobami in količinami vitamina E

dodatek krmi	krmne skupine			
	kontN	kontP	vitE-DL	vitE-200
DL- α .tokoferol acetat iz olj (IU)	2,21	10,00	10,00	10,00
DL- α .tokoferol sintetični (IU)	/	/	75,0	197,08
Celotna količina (IU)	17,08	17,08	85,00	207,08

kontN – negativna kontrola, palmova mast; kontP – pozitivna kontrola, laneno olje; vitE-DL – laneno olje + vitamin E; vitE-200 – laneno olje + velika količina vitamina E; IU = internacional units = mednarodne enote (1 IU = 0,67 mg naravnega vit. E)

3.1.1.1 Sestava osnovne krme

Osnovna krma je bila zasnovana tako, da je vsebovala vse potrebne hranilne komponente. Prevladovala je pšenica, ki vsebuje škrob, v sojinih tropinah je veliko beljakovin, palmova mast in laneno olje pa sta vir maščob. Ostali dodatki so skrbeli za zadostno vsebnost vitaminov in mineralov. Točna sestava je prikazana v preglednici 6.

Preglednica 6: Sestava štirih različnih poskusnih krmnih mešanic za piščance

sestavine (%)	krmne skupine			
	kontN	kontP	vitE-DL	vitE-200
pšenica	61,37	61,37	61,37	61,37
sojine tropine	27,2	27,2	27,2	27,2
laneno olje	-	7,5	7,5	7,5
palmova mast	7,5	-	-	-
sol	0,33	0,33	0,33	0,33
apnenc	1,3	1,3	1,3	1,3
MCaP	1,4	1,4	1,4	1,4
L-lizin 78,8%	0,13	0,13	0,13	0,13
DL-metionin 98 %	0,23	0,23	0,23	0,23
treonin 98%	0,04	0,04	0,04	0,04
premikS-ROSS308	0,5	0,5	0,5	0,5
kokcidostatik	0,05	0,05	0,05	0,05

kontN – negativna kontrola, palmova mast; kontP – pozitivna kontrola, laneno olje; vitE-DL – laneno olje + vitamin E; vitE-200 – laneno olje + velika količina vitamina E

3.1.1.2 Maščobnokislinska sestava krme

Preglednica 7: Vsebnost posameznih maščobnih kislin v vsaki krmni mešanici, prikazana v obliki masnega deleža, glede na 100 g maščobe in vsebnosti v 100 g krme

MK	masni deleži (g MK/100 g maščobe)				mg/100g krme			
	kontN	kontP	vitE-DL	vitE-200	kontN	kontP	vitE-DL	vitE-200
C12:0	0,20	0,00	0,04	0,04	16,0	0,0	3,1	3,7
C14:0	0,91	0,06	0,07	0,07	73,9	5,3	5,5	5,7
C15:0	0,06	0,04	0,04	0,04	4,9	3,3	3,1	3,2
C16:0	38,54	7,73	7,86	7,89	3120,7	695,7	648,9	684,2
C16:1 n-7	0,03	0,08	0,09	0,09	2,6	7,2	7,8	8,0
C17:0	0,13	0,07	0,07	0,07	10,5	6,5	5,9	6,2
C17:1 n-7	0,01	0,04	0,05	0,05	1,0	4,0	3,9	4,1
C18:0	44,65	3,84	3,90	3,89	3615,7	345,8	321,9	337,2
C18:1 n-9	3,25	17,83	18,65	18,69	262,8	1604,3	1540,1	1620,4
C18:2 n-6	10,13	24,44	23,75	23,85	820,3	2198,9	1961,4	2067,7
C18:3 n-3	1,23	45,00	44,58	44,39	99,9	4048,6	3682,1	3849,4
C20:0	0,48	0,16	0,17	0,17	39,0	14,8	14,3	15,0
C20:1 n-9	0,08	0,20	0,21	0,21	6,4	18,0	17,3	18,5
C20:2 n-6	0,02	0,05	0,05	0,05	1,5	4,5	4,0	4,2
C20:3 n-6	/	0,05	0,04	0,04	/	4,2	3,3	3,4
C20:3 n-3	/	0,04	0,04	0,04	/	3,9	3,3	3,4
C22:0	0,13	0,17	0,18	0,19	10,4	15,5	15,2	16,1
C22:1 n-9	0,02	0,04	0,08	0,09	1,6	3,3	6,7	7,6
C24:0	0,11	0,13	0,14	0,14	8,8	12,0	11,3	12,4
NMK	85,21	12,22	12,46	12,50	6899,8	1099,1	1029,3	1084,0
ENMK	3,39	18,19	19,08	19,13	274,4	1636,8	1575,9	1658,7
VNMK	11,40	69,59	68,46	68,37	923,1	6260,1	5654,1	5928,2
n-3	1,24	45,05	44,62	44,43	100,0	4052,5	3685,4	3852,8
n-6	10,16	24,54	23,84	23,93	823,1	2207,6	1968,7	2075,4
n-6/n-3	8,23	0,54	0,53	0,54	8,23	0,54	0,53	0,54

kontN – negativna kontrola, palmova mast; kontP – pozitivna kontrola, laneno olje; vitE-DL – laneno olje + vitamin E; vitE-200 – laneno olje + velika količina vitamina E; nasičene maščobne kisline – NMK: C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0; enkrat nenasičene maščobne kisline – ENMK: C16:1 n-7, C17:1 n-7, C18:1 n-9, C20:1 n-9, C22:1 n-9; večkrat nenasičene maščobne kisline – VNMK: C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:2 n-6, C20:3 n-3; n-3 – omega tri maščobne kisline; n-6 – omega šest maščobne kisline

Krma piščancev je bila pri skupini kontN pretežno sestavljena iz nasičenih maščobnih kislin. Pri ostalih treh skupinah pa je bila vsebnost nenasičenih maščobnih kislin višja. Skupine so se razlikovale tudi po vsebnosti vitamina E v prehrani. Zaradi narave poskusa, smo želeli vedeti, kakšna je maščobnokislinska sestava krme vseh skupin. Rezultati so vidni iz preglednice 7.

3.1.2 Vzorčenje in postopki obdelave vzorcev presnega piščančjega mesa

Takoj po zakolu piščancev smo iz trupov odvzeli leve in desne površinske prsne mišice (*pectoralis superficialis*), brez kosti in kože. Hladili smo jih 24 ur v hladilnici pri temperaturi 4 °C. Naslednji dan, smo mišici vsake živali razrezali na deset delov in jih označili. Krajna kosa smo shranili za morebitne ponovitve, z ostalimi šestimi, pa smo nadaljevali delo. En kos smo takoj dali v skrinjo na -20 °C, po treh mesecih pa smo temperaturo znižali na -70 °C. To je bila naša skupina S3. Vse ostale dele pa smo takoj zamrznili na -70 °C in jih kasneje obravnavali kot sveže (preglednica 8).

Preglednica 8: Postopki obdelave posameznih podskupin vzorcev piščančjega mesa

podskupina piščančjega mesa	postopki obdelave
S	zamrznjen na -70 °C, homogeniziran, hranjen pri temperaturi -70 °C
SH	zamrznjen na -70 °C, odtajan vzorec hranjen 6 dni pri temperaturi 4 °C, homogeniziran, nato hranjen pri temperaturi -70 °C
K	zamrznjen na -70 °C, kuhan, homogeniziran in nato hranjen pri temperaturi -70 °C
KH	zamrznjen na -70 °C, kuhan, 6 dni pri temperaturi 4 °C, homogeniziran in nato hranjen pri temperaturi -70 °C
S3	3 mesece pri temperaturi -20 °C, homogeniziran in nato hranjen pri temperaturi -70 °C
K3	3 mesece pri temperaturi -20 °C, kuhan, homogeniziran in nato hranjen pri temperaturi -70 °C

Skupino S smo homogenizirali in takoj zamrznili nazaj na -70 °C in jo tako ohranili nespremenjenega do analize. Skupino vzorcev SH smo odtalili in hranili šest dni v hladilniku pri temperaturi 4 °C, jih homogenizirali, nato pa zamrznili na -70 °C. V hladilniku je bilo meso na ekspanziranih plastičnih pladnjih z absorbenti vlage, kot jih uporablja perutninska industrija, in zavito v plastično folijo, ki je preprečevala izhlapevanje vode (PE). Skupino K smo pred homogenizacijo in zamrznitvijo najprej

skuhali. Vzorce smo dali v plastične centrifugirke s pokrovčkom, da nismo izgubili izcejene tekočine. Vzorce smo eno uro kuhali v 80 °C vroči vodni kopeli. S skupino HK smo ravnali enako kot s skupino K, le da smo jo po kuhanju še šest dni hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C in jo šele nato homogenizirali in zamrznili. Zadnjo skupino K3 smo tri mesece hranili v skrinji pri -20 °C, po tem pa jo pred končnim zamrzovanjem še skuhalo po prej opisanem postopku in homogenizirali. Vzorce smo pripravili za vsako žival posebej, saj zaradi genetskih dejavnikov vzorce istih skupin nismo smeli združiti. Vsi postopki so predstavljeni tudi v preglednici 8.

3.1.2.1 Homogenizacija

Homogenizacija vzorca je zelo pomemben del vsake analize. Zaradi kemijske in fizikalne raznolikosti sestavin v živilih je namreč zelo težko zagotoviti, da je nek vzorec res homogen. Homogen vzorec v teoriji pomeni to, da ni važno kateri in kako velik del vzamemo za analizo, bo sestavina, ki jo iščemo, vedno prisotna in to v enaki koncentraciji. V našem primeru smo se problema lotili na naslednji način.

Pred začetkom homogenizacije, smo vzorce najprej zamrznili na -70 °C. Nato smo jih nekoliko odtajali, da se jih je dalo razrezati na zelo tanke rezine, vendar pri tem niso smele popolnoma odmrzniti. Rezine smo dali v plastično posodico in jih prelili s tekočim dušikom. S posebnim terilnikom smo jih razbili na drobne koščke in jih prestavili v Grindomix napravo (GM 200), ki je podobna kuhinjskemu sekljalniku. S posebnim rezilom in s pomočjo plastičnega bata, ki je omejil volumen sekljalne posode, smo vzorec pri 6000 obratih na minuto (rpm) v 10 sekundah spremenili v droben zmrznjen prah. Vzorec je bil tako homogeniziran. Zapakirali smo ga v PE vrečke in ga shranili pri temperaturi -70 °C do začetka analiz.

3.2 METODE

3.2.1 Določanje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola

Za določanje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola smo uporabili metodo, sestavljeno iz hladne saponifikacije, ekstrakcije, postopka SPE ter določanja vsebnosti holesterola in oksidov holesterola z LC-MS/MS.

3.2.1.1 Saponifikacija

V erlenmajerico s teflonskim pokrovčkom (Lenz, 3.0251.37) smo odtehtali 4 g ($\pm 0,001$ g) vzorca. Dodali smo 3 ml metilen klorida (CH_2Cl_2) (Merck, 1.06044) in 7 ml 2 M raztopine KOH (Merck, 1.05033) v 96 % etanolu (Merck, 1.00971). Erlenmajerice z vzorcem smo postavili na magnetno mešalo in mešali 18-20 ur, pri sobni temperaturi.

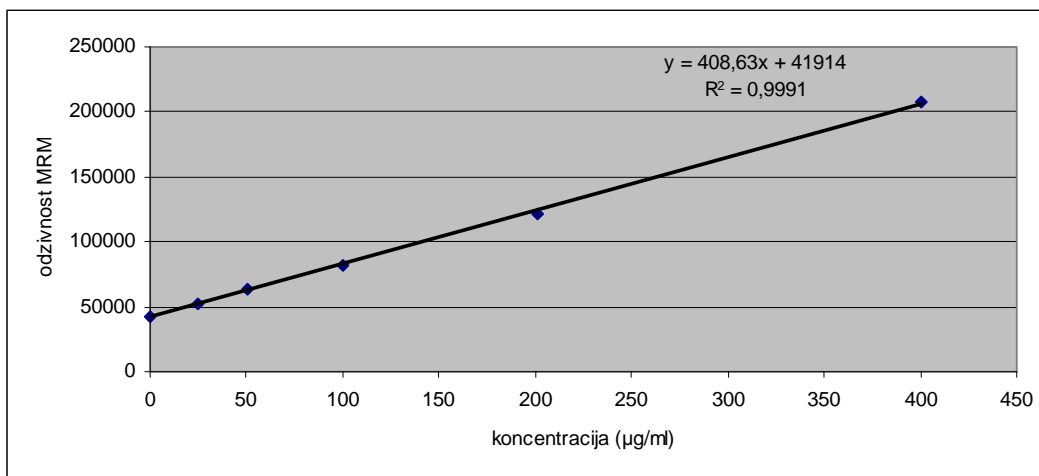
3.2.1.2 Ekstrakcija holesterola in oksidov holesterola

Vzorec smo kvantitativno prenesli v 50 ml centrifugirke (Sarstedt, 62.548), dodali 10 ml dietiletra (Merck, 1.00921) in 10 ml 10 % NaCl (Merck, 1.06404) v destilirani vodi. Vsebino smo intenzivno ročno stresali in jo nato še za 15 minut postavili na ultrazvočno kopel (Bransonic 3510E-DTH, Branson, Nemčija). Nato je sledilo 15-minutno centrifugiranje vzorcev pri $1750 \times g$ (Eppendorf, centrifuge 5810), pri čemer je prišlo do ločitve polarne in nepolarne faze. Spodnjo polarno fazo smo v večji meri (10 ml) odstranili. V organsko fazo, ki je ostala v centrifugirki, smo dodali 5 ml raztopine 0,5 M KOH (Merck, 1.05033) v destilirani vodi, intenzivno ročno stresali in postavili na ultrazvočno kopel ter centrifugirali pri enakih pogojih. Ob ločitvi obeh faz smo ponovno odstranili spodnjo, polarno fazo. V ostanek smo dodali 5 ml destilirane vode. Vzorec smo ponovno intenzivno ročno stresali, postavili na ultrazvočno kopel in centrifugirali pri že omenjenih pogojih. Po končani ekstrakciji smo s stekleno pipeto natančno odpipetirali 5 ml zgornje organske faze v temne vial. Vsebino vial smo prepihal z dušikom, da smo odparili topilo. Suh preostanek smo raztopili v 1 ml raztopine heksana (Merck, 1.04367) in dietiletra (Merck, 1.00921) (90:10) in tako smo vzorec pripravili za ločevanje s postopkom SPE.

3.2.1.3 Ekstrakcija s trdno fazo (SPE)

Za ekstrakcijo smo uporabili kolono Strata SI-1 (Phenomenex, 500 mg/3 mL), ki smo jo predhodno kondicionirali s 4 ml heksana (Merck, 1.04371) (eluat zavržemo), nato smo na kolono uvajali 1 ml predhodno pripravljenega vzorca in pazili, da je zaradi boljše vezave holesterola in oksidov holesterola počasi potoval skozi kolono (eluat zavržemo). Po tem smo kolono izpirali z 4 ml heksana (Merck, 1.04367) in 4 ml raztopine heksana (Merck, 1.04367) in dietiletra (Merck, 1.00921) (90:10), da smo izprali neželene komponente (eluat zavržemo). Na koncu smo na kolono nanesti 4 ml raztopine heksana (Merck, 1.04367) in dietiletra (Merck, 1.00921) (60:40) ter eluat zbirali. Topilo smo odparili v dušikovi atmosferi, nato pa suh preostanek raztopili v 1 ml raztopine acetonitrila (Sigma-Aldrich, 34851) in 2-propanola (Merck, 1.09634) v razmerju (55:45). Vzorec smo prenesli v vialo in jih shranili pri temperaturi $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analiz na LC-MS/MS.

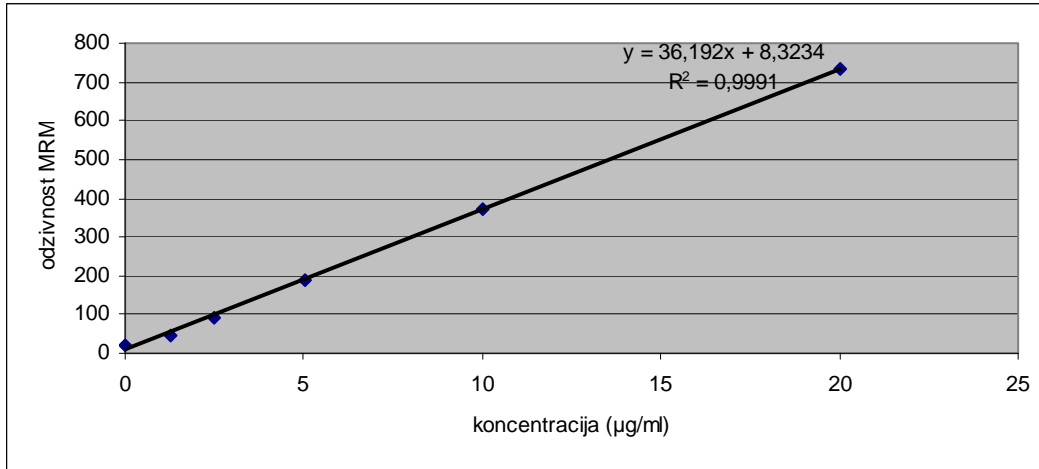
3.2.1.4 Priprava umeritvenih krivulj po metodi standardnega dodatka



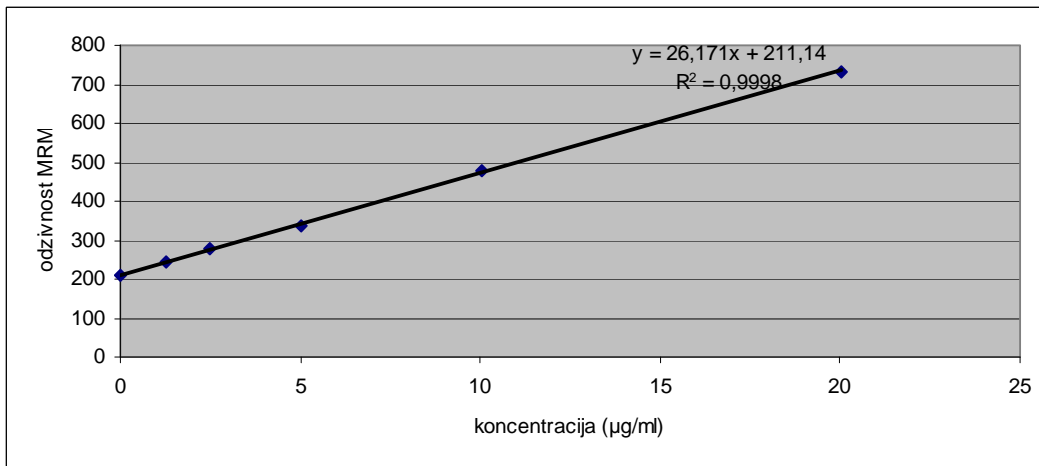
Slika 3: Umeritvena krivulja za določanje holesterola v vzorcih

Za kvantitativno določanje oksisterolov z LC-MS/MS postopkom, smo uporabili posamezne standardne raztopine standardov oksidov holesterola, ki smo jih pripravili po naslednjem postopku. V 10 ml bučke smo odtehtali 5 mg ($\pm 0,01$ mg) posameznega standarda oksisterola in dopolnili s heksanom (Merck, 1.04371). V vzorce smo odpipetirali različne volumne (0, 50, 100, 200, 400, 800 µl) standardnih raztopin oksisterolov in naprej

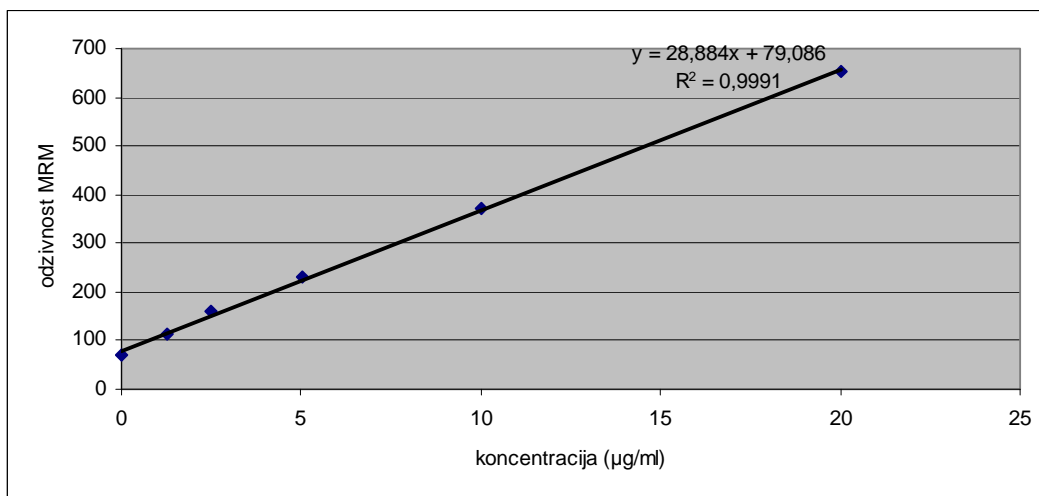
postopali enako kot z vzorci. S pomočjo dobljenih rezultatov smo narisali umeritvene krivulje, ki smo jih uporabili za korekcijo končnih rezultatov.



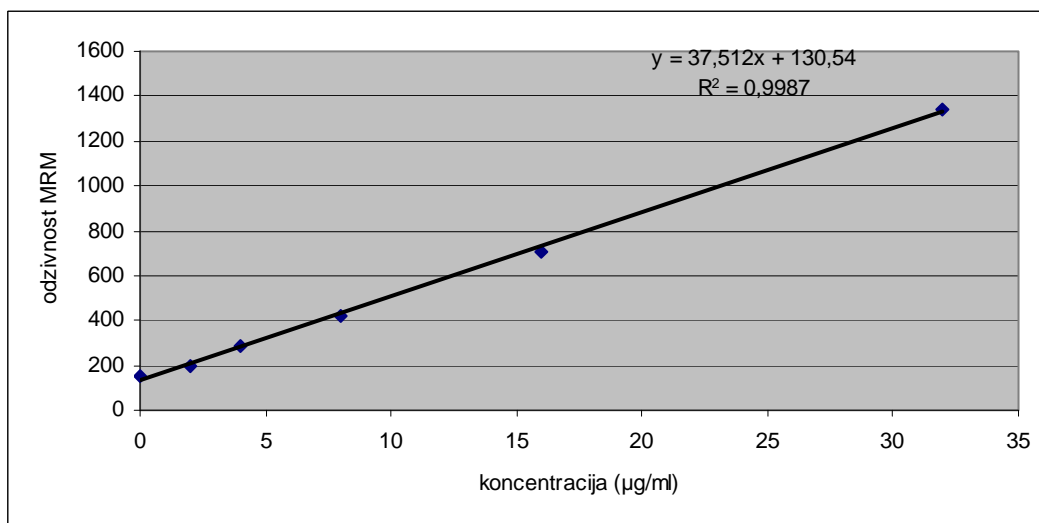
Slika 4: Umeritvena krivulja za določanje 25-hidroksi-holesterola v vzorcih



Slika 5: Umeritvena krivulja za določanje 5α-holestena v vzorcih



Slika 6: Umeritvena krivulja za določanje 7β-hidroksi-holesterola v vzorcih



Slika 7: Umeritvena krivulja za določanje 20α-hidroksi-holesterola v vzorcih

3.2.1.5 Pogoji LC-MS/MS

Vsebnost oksisterolov smo določili s HPLC sistemom Agilent 1100, sestavljenim iz binarne gradientne črpalke (Agilent 1100, G1312A), vakuumskega razplinjevalnika (Agilent 1100, G1379A), avtomatskega podajalnika (Agilent 1100, G1330B) in termostata za kolono (Agilent 1100, G1316A). Uporabili smo kolono Gemini C18 (3 μm, 150 mm × 2 mm i.d.) firme Phenomenex (Torrance, CA, ZDA, 00F-4439-B0). Vsebnost oksisterolov smo določili s primerjavo retenzijskih časov in prehodov posameznih

standardov: holesterol (Merck, C-8667) (16,13 min; 369.18 > 147.22), 25-hidroksiholesterol (Sigma, H-1015) (6,40 min; 367.22 > 147.15), 5 α -holesten (Merck, 8.41513) (19,18 min; 371.27 > 149.26), 7 β -hidroksiholesterol (Sigma, H6891) (9,86 min; 367.22 > 145.15) in 20 α -hidroksiholesterol (Sigma, H6378) (7,76 min; 367.22 > 147.15). Kromatografija je potekala z gradientom pri pretoku 0,25 ml/min. Mobilni fazi sta bili A: 0,05 % TFA (Fluka) in B: acetonitril (Merck, 1.00030) pri linearnem gradientu 0-10 min 80-98 % B; 10-16 min 98 % B; 16-16,1 min 98-80 min; 16,1-20 min 80 % B in stalni temperaturi kolone 45 °C. Volumen injiciranja je bil 10 μ l.

Kot detektor smo uporabili masni spektrometer (Micromass Quattro micro[®] API, Waters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (electrospray ionization – ESI). Deloval je pri naslednjih pogojih: napetost vhodne leče 40 V, temperatura izvora 120 °C in napetost kapilare 3,2 kV v pozitivnem načinu ionizacije (ESI+). Razpršilni plin dušik je imel temperaturo 350 °C in pretok 400 l/h. Plin vhodne leče (dušik) je imel pretok 50 l/h. Detekcija na masnem detektorju je potekala v MRM (Multi Reaction Monitoring) načinu pri napetosti trkalne celice 30 V in tlaku argona 3×10^{-3} mbar.

3.2.2 Statistična obdelava podatkov

V poizkusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Tako urejene podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS (SAS Software. Version 8.01, 1999) z multiplo analizo variance – postopkom GLM (General Linear Models).

Statistični model za testiranje razlik v dnevnem in skupnem prirastu mase ter porabi krme in konverziji krme med poskusnimi skupinami piščancev in testiranje vpliva dodatka treh oblik vitamina E (α -, β - in γ -tokoferola) v krmo piščancev na njegovo vsebnost v presnem mesu piščancev smo uporabili naslednji model 1:

$$Y_{ij} = \mu + N_j + e_{ij} \quad (2)$$

kjer je: y_{ij} = i jk-to opazovanje; μ = povprečna vrednost; D_i = vpliv dodatka vitamina E (pozitivna in negativna kontrola, vitamin E-200 in vitamin E-DL); e_{ij} = ostanek.

Statistični model 2 za določanje holesterola in oksidov holesterola v piščančjem mesu je vključeval vpliv različnega dodatka vitamina E, načina skladiščenja in toplotne obdelave vzorcev ter njune interakcije:

$$Y_{ijk} = \mu + N_j + D \times N_{ij} + e_{ijk} \quad (3)$$

kjer je: y_{ijk} = ijk-to opazovanje; μ = povprečna vrednost; D_i = vpliv dodatka vitamina E (pozitivna in negativna kontrola, vitamin E-200 in vitamin E-DL); N_j = vpliv načina skladiščenja in toplotne obdelave mesa (S – sveže (-70 °C); S3 – 3 mesece pri -20 °C, nato pri -70 °C; SH – 6 dni (4 °C), nato pri -70 °C; K – sveže + kuhanje, nato pri -70 °C; K3 – 3 mesece pri -20 °C, kuhan, nato pri -70 °C; KH – kuhan + 6 dni pri 4 °C, nato pri -70 °C); $D \times N_{ij}$ – interakcija i-tega načina dodatka vitamina E (D) in j-tega načina skladiščenja ter toplotne obdelave mesa (N); e_{ijk} = ostanek.

Povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in primerjane pri 5 % tveganju. Pearsonovi korelacijski koeficienti med merjenimi parametri so bili izračunani s postopkom PROC CORR (SAS Software, 1999).

4 REZULTATI

4.1 REJA PIŠČANCEV

Piščance smo spremljali tekom celotne reje. Od 21-tega dne smo dnevno tehtali krmo, ostanke krme in živali ter izračunali dnevni in skupni prirast ter izkoriščanje krme. Na 46 dan (± 1 dan) starosti smo piščance zaklali in merili telesno maso. Konverzija nam pove, koliko kilogramov krme je bilo potrebnih za pridobitev enega kilograma mesa. Podatki so zbrani v preglednici 9.

Preglednica 9: Razlike v dnevem in skupnem prirastu mase ter porabi krme in konverziji krme med poskusnimi skupinami piščancev ($n = 6$), krmljenimi z različnimi maščobami in količinami vitamina E (model 1)

parametri	krmne skupine				znač.
	kontN	kontP	vitE-DL	vitE-200	
začetna telesna masa (g)	1106 \pm 54	1119 \pm 25	1096 \pm 89	1080 \pm 45	nz
končna telesna masa (g)	3214 \pm 292 ^b	3717 \pm 114 ^a	3540 \pm 150 ^a	3636 \pm 130 ^a	***
skupen prirast (g)	2108 \pm 261 ^b	2599 \pm 99 ^a	2444 \pm 198 ^a	2557 \pm 91 ^a	***
poraba krme (g)	4520 \pm 494	4775 \pm 303	4539 \pm 316	4774 \pm 266	nz
konverzija	2,15 \pm 0,17 ^a	1,84 \pm 0,09 ^b	1,86 \pm 0,10 ^b	1,87 \pm 0,09 ^b	***
dnevni prirast (g/dan)	82,44 \pm 10,19 ^b	101,92 \pm 3,66 ^a	95,93 \pm 8,44 ^a	100,31 \pm 4,17 ^a	***
dni v poskusu	26 \pm 1	26 \pm 1	26 \pm 1	26 \pm 1	nz

n – število piščancev v skupini; kontN – negativna kontrola, palmova mast; kontP – pozitivna kontrola, laneno olje; vitE-DL – laneno olje + vitamin E; vitE-200 – laneno olje + velika količina vitamina E; znač. – značilnost: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b} skupine z različno nadpisano črko se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$).

Iz preglednice 9 je razvidno, da je bila začetna masa piščancev, vključenih v poskus, med 1080 in 1120 g, razlike med skupinami so bile naključne. Med 21. in 47. dnem reje so piščanci različnih skupin porabili približno 4650 g krme (razlike med skupinami niso značilne), vendar pa so skupine piščancev dosegle različno povprečno končno telesno maso, posledično je bil med skupinami tudi različen dnevni in skupni prirast ter konverzija. Tako so piščanci skupine kontN dosegli značilno nižjo končno telesno maso, ter slabši prirast in konverzijo, kot ostale tri eksperimentalne skupine, kontP, vitE-DL in vitE-200.

4.2 VSEBNOST VITAMINA E V PRESNEM PIŠČANČJEM MESU

Ena od hipotez naše raziskave je bila, da bi lahko povečana količina vitamina E v mesu piščancev zmanjšala oksidacijo holesterola. Zato smo skupinama vitE-DL in vitE-200 v krmo dodajali sintetičen vitamin E. Dodatek vitamina E še ni zagotovilo, da bo njegova vsebnost v mesu res večja. Absorpcija vitamina je namreč pogojena z različnimi dejavniki in predvidevamo, da variira med posameznimi piščanci. Vsebnost različnih oblik vitamina E smo v mesu določili z namenom, da bi preverili zgoraj omenjeno hipotezo. Rezultati vrednotenja vpliva dodatka vitamina E v krmo na vsebnost njegovih treh oblik (α -, β - in γ -tokoferola) v presnem mesu piščancev so prikazani v preglednici 10. Razvidno je, da dodatek vitamina E v krmo značilno ($p \leq 0,001$) vpliva na njegovo vsebnost v mesu. Skupinama kontN in kontP vitamin E v krmo ni bil dodan, zato je tudi vsebnost α -tokoferola v mesu teh dveh skupin (0,27 mg/100 g oz. 0,18 mg/100 g) značilno manjši kot v skupinah vitE-DL (0,50 mg/100 g) in vitE-200 (1,07 mg/100 g), kjer ga je bilo značilno največ.

Preglednica 10: Vpliv dodatka vitamina E v krmo na vsebnost njegovih treh oblik (α -, β - in γ -tokoferola, v mg/100 g mesa in nmol/g mesa) v presnem mesu piščancev (model 1, n = 6)

vitamin E v svežem mesu	enota	krmne skupine				znač.
		kontN	kontP	vitE-DL	vitE-200	
α -tokoferol	mg/100 g mesa	0,265 ± 0,041 ^c	0,179 ± 0,055 ^c	0,502 ± 0,117 ^b	1,067 ± 0,163 ^a	***
	nmol/g mesa	6,151 ± 0,953 ^c	4,160 ± 1,288 ^c	11,655 ± 2,725 ^b	24,773 ± 3,777 ^a	***
β + γ -tokoferol	mg/100 g mesa	0,032 ± 0,007 ^c	0,071 ± 0,015 ^a	0,050 ± 0,014 ^b	0,058 ± 0,015 ^{ab}	***
	nmol/g mesa	0,768 ± 0,158 ^c	1,710 ± 0,370 ^a	1,188 ± 0,330 ^b	1,384 ± 0,354 ^{ab}	***

n – število piščancev v skupini; kontN – negativna kontrola, palmova mast; kontP – pozitivna kontrola, laneno olje; vitE-DL – laneno olje + vitamin E; vitE-200 – laneno olje + velika količina vitamina E; znač. – značilnost: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; ^{a,b,c} skupine z različno nadpisano črko se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$).

Vsebnost β - in γ -tokoferola je v poskusu variirala, njuna vsebnost je največja v skupinah kontP in vitE-200 (0,07 mg/100 g oz. 0,06 mg/100 g), manj ju je v skupini vitE-DL (0,05 mg/100 g) in najmanj v kontN (0,03 mg/100 g). Ti dve obliki vitamina E nista bili

dodani v krmo piščancev, zato predvidevamo, da je njuna vsebnost bolj pogojena z variabilnostjo med piščanci kot pa med skupinami.

4.3 DOLOČANJE HOLESTEROLA IN OKSIDOV HOLESTEROLA V RAZLIČNO OBDELANIH VZORCIH PIŠČANČJEGA MESA

Rezultati določanja vsebnosti holesterola in oksidov holesterola v različno obdelanem mesu piščancev, krmljenih z različno količino dodanega vitamina E, so prikazani v preglednici 11. Iz teh rezultatov lahko ugotovimo, da so vzorci dokaj nehomogeni, saj so koeficienti variabilnosti od 14 % pri določanju holesterola pa do 27 % pri skupnih oksidih holesterola. Seveda pa je pri nekaterih oksidih holesterola koeficient variabilnosti zelo velik (20α -hidroksi-holesterol – 100 % oz. 25-hidroksi-holesterol – 193 %), predvsem na račun odsotnosti oz. zelo majhnih vsebnosti nekaterih oblik oksidov holesterola. Tako je piščančje meso v povprečju na 100 g vsebovalo 86,5 mg holesterola in 0,72 mg oksidov holesterola, od tega 0,03 mg 25-hidroksi-holesterola, 0,50 mg 5α -holestena, 0,10 mg 7β -hidroksi-holesterola in 20α -hidroksi-holesterola.

Preglednica 11: Izračunani osnovni statistični parametri, za rezultate določanja vsebnosti holesterola in oksidov holesterola (mg/100g), skupno za vse vzorce piščančjega mesa.

parameter (mg/100 g)	n	\bar{x}	min	max	so	KV (%)
holesterol	266	86,46	59,51	147,67	12,4	14
5α -holesten	266	0,50	0,02	1,07	0,2	30
7β -hidroksi-holesterol	266	0,10	0	0,29	0,1	73
20α -hidroksi-holesterol	266	0,10	0	0,42	0,1	100
25-hidroksi-holesterol	266	0,03	0	0,37	0,1	193
oksidi holesterola skupaj	266	0,72	0,03	1,27	0,2	27

n – število določanj v poskusu, \bar{x} – povprečna vrednost, min – minimalna vrednost, max – maksimalna vrednost, so – standardni odklon, KV (%) – koeficient variabilnosti

V preglednici 12 so prikazani rezultati testiranja vpliva dodatka vitamina E v krmo piščancev na vsebnost holesterola in oksidov holesterola v meso po različnih načinih obdelave. Povzamemo lahko, da dodatek vitamina E v krmo ne vpliva na vsebnost

holesterola v mesu piščancev po različnih načinih obdelave. Izjema je meso, ki je bilo hranjeno 6 dni pri temperaturi hladilnika (4 °C) ter nato zmrznjeno in hranjeno pri temperaturi -70 °C (podskupina SH). Pri tako tretiranih vzorcih smo določili značilno manjšo vsebnost holesterola v mesu piščancev, krmljenih z dodanim vitaminom E (vitE-DL in vitE-200) in pozitivno kontrolo (kontP), v primerjavi s skupino kontN.

Preglednica 12: Vpliv dodatka vitamina E v krmo piščancev na vsebnost holesterola in oksidov holesterola (mg/100 g) v mesu, po različnih načinih obdelave (model 2, Duncan test, $\alpha = 0,05$)

način obdelave	parameter (mg/100 g)	piščančje meso posameznih krmnih skupin				znač.
		kontN	kontP	vitE-DL	vitE-200	
S	holesterol	86,53 ± 9,45	82,82 ± 8,62	79,30 ± 8,40	79,40 ± 8,02	nz
	5 α -holesten	0,54 ± 0,11 ^a	0,44 ± 0,08 ^{ab}	0,44 ± 0,10 ^{ab}	0,39 ± 0,17 ^b	*
	7 β -hidroksi-holesterol	0,07 ± 0,08	0,10 ± 0,07	0,11 ± 0,05	0,09 ± 0,08	nz
	20 α -hidroksi-holesterol	0,09 ± 0,06	0,08 ± 0,08	0,11 ± 0,12	0,15 ± 0,12	nz
	25-hidroksi-holesterol	0,05 ± 0,06	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,04	nz
	oksidi holesterola skupaj	0,74 ± 0,12	0,64 ± 0,12	0,68 ± 0,14	0,65 ± 0,28	nz
S3	holesterol	96,45 ± 18,37	91,15 ± 26,56	96,71 ± 22,62	91,23 ± 25,95	nz
	5 α -holesten	0,61 ± 0,13 ^a	0,45 ± 0,12 ^b	0,51 ± 0,09 ^b	0,45 ± 0,16 ^b	***
	7 β -hidroksi-holesterol	0,14 ± 0,06	0,10 ± 0,09	0,09 ± 0,07	0,09 ± 0,08	nz
	20 α -hidroksi-holesterol	0,12 ± 0,12	0,12 ± 0,13	0,07 ± 0,08	0,07 ± 0,10	nz
	25-hidroksi-holesterol	0,02 ± 0,05	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,04	0,02 ± 0,03	nz
	oksidi holesterola skupaj	0,89 ± 0,19 ^a	0,68 ± 0,22 ^b	0,69 ± 0,16 ^b	0,63 ± 0,19 ^b	***
SH	holesterol	96,22 ± 9,26 ^a	84,29 ± 9,23 ^b	88,67 ± 5,86 ^{ab}	86,13 ± 10,79 ^b	*
	5 α -holesten	0,70 ± 0,18 ^a	0,42 ± 0,17 ^b	0,50 ± 0,11 ^b	0,46 ± 0,10 ^b	***
	7 β -hidroksi-holesterol	0,08 ± 0,07	0,12 ± 0,06	0,10 ± 0,07	0,10 ± 0,07	nz
	20 α -hidroksi-holesterol	0,06 ± 0,08	0,10 ± 0,09	0,13 ± 0,06	0,08 ± 0,07	nz
	25-hidroksi-holesterol	0,03 ± 0,09	0,04 ± 0,08	0,10 ± 0,13	0,06 ± 0,09	nz
	oksidi holesterola skupaj	0,87 ± 0,21	0,68 ± 0,21	0,82 ± 0,17	0,70 ± 0,20	nz
K	holesterol	87,10 ± 7,13	81,94 ± 8,55	82,40 ± 4,21	79,93 ± 5,88	nz
	5 α -holesten	0,65 ± 0,22 ^a	0,45 ± 0,12 ^b	0,48 ± 0,10 ^b	0,42 ± 0,15 ^b	**
	7 β -hidroksi-holesterol	0,11 ± 0,07	0,11 ± 0,08	0,12 ± 0,06	0,13 ± 0,08	nz
	20 α -hidroksi-holesterol	0,05 ± 0,06 ^{ab}	0,03 ± 0,04 ^b	0,10 ± 0,11 ^{ab}	0,13 ± 0,11 ^a	*
	25-hidroksi-holesterol	0,03 ± 0,05	0,04 ± 0,06	0,03 ± 0,08	0,03 ± 0,06	nz
	oksidi holesterola skupaj	0,85 ± 0,22 ^a	0,63 ± 0,17 ^b	0,74 ± 0,16 ^{ab}	0,72 ± 0,22 ^{ab}	*

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 12: Vpliv dodatka vitamina E v krmo piščancev na vsebnost holesterola in oksidov holesterola (mg/100 g) v mesu po različnih načinih obdelave (model 2, Duncan test, $\alpha = 0,05$)

način obdelave	parameter (mg/100 g)	piščančje meso posameznih krmnih skupin				znač.
		kontN	kontP	vitE-DL	vitE-200	
K3	holesterol	88,61 ± 6,73	83,83 ± 5,91	83,30 ± 5,77	83,68 ± 9,55	nz
	5 α -holesten	0,53 ± 0,17	0,45 ± 0,08	0,42 ± 0,08	0,50 ± 0,14	nz
	7 β -hidroksi-holesterol	0,08 ± 0,06	0,13 ± 0,07	0,06 ± 0,06	0,13 ± 0,05	nz
	20 α -hidroksi-holesterol	0,17 ± 0,14	0,10 ± 0,11	0,10 ± 0,08	0,10 ± 0,08	nz
	25-hidroksi-holesterol	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02	nz
	oksidi holesterola skupaj	0,78 ± 0,22	0,67 ± 0,19	0,59 ± 0,13	0,74 ± 0,20	nz
KH	holesterol	84,67 ± 4,56	87,22 ± 7,55	85,39 ± 8,78	86,02 ± 7,35	nz
	5 α -holesten	0,48 ± 0,13	0,58 ± 0,13	0,45 ± 0,10	0,53 ± 0,13	nz
	7 β -hidroksi-holesterol	0,11 ± 0,08	0,07 ± 0,11	0,08 ± 0,07	0,11 ± 0,08	nz
	20 α -hidroksi-holesterol	0,08 ± 0,09	0,12 ± 0,12	0,07 ± 0,08	0,11 ± 0,11	nz
	25-hidroksi-holesterol	0,03 ± 0,05	0,04 ± 0,05	0,04 ± 0,05	0,03 ± 0,05	nz
	oksidi holesterola skupaj	0,70 ± 0,16	0,81 ± 0,25	0,65 ± 0,15	0,78 ± 0,16	nz

kontN – negativna kontrola, palmova mast, kontP – pozitivna kontrola, laneno olje, vitE-DL – laneno olje + vitamin E, vitE-200 – laneno olje + velika količina vitamina E; S – sveže (-70 °C); S3 – 3 mesece pri -20 °C, nato pri -70 °C; SH – 6 dni (4 °C), nato pri -70 °C; K – sveže + kuhanje, nato pri -70 °C; K3 – 3 mesece pri -20 °C, kuhan, nato pri -70 °C; KH – kuhan + 6 dni pri 4 °C, nato pri -70 °C; znač. – značilnost: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b,c} vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (skupin z dodanim vitaminom E) se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p > 0,05$).

Iz preglednice 12 lahko povzamemo tudi, da dodatek vitamina E v krmo vpliva na vsebnost oksidov holesterola v mesu piščancev, obdelanih na dva načina – S3 – hranjeno 3 mesece pri -20 °C in nato hranjeno pri -70 °C, ter K – sveže meso skuhan in nato hranjeno pri -70 °C. Pri S3 tretiranih vzorcih smo določili značilno manjšo vsebnost oksidov holesterola v mesu piščancev, krmljenih z dodatkom vitamina E (vitE-DL in vitE-200) in pozitivno kontrolo (kontP), v primerjavi s skupino kontN. Pri K tretiranih vzorcih pa smo določili značilno manjšo vsebnost oksidov holesterola v mesu piščancev, krmljenih le z lanenim oljem – kontP.

V preglednici 13 so prikazani rezultati testiranja vpliva načina obdelave vzorcev na vsebnost holesterola in oksidov holesterola v mesu, pridobljenem po različnem dodatku vitamina E v krmo piščancev. Povzamemo lahko, da način obdelave vpliva na vsebnost

holesterola v mesu piščancev skupin kontN in vitE-DL. Pri obeh skupinah smo opazili značilno največjo vsebnost holesterola v vzorcih S3 in SH, v primeru skupine kontN pa še pri podskupini K3. Opaženo je nekoliko v nasprotju z našimi pričakovanji, da bo vsebnost holesterola večja pri vseh kuhanih vzorcih, vendar je očitno med toplotno obdelavo prišlo do delne izgube vode v vzorcih (čeprav smo bili pozorni na to). Na splošno način obdelave vpliva na skupno vsebnost oksidov holesterola le v mesu piščancev skupine vitE-DL. Najbolj pa se s toplotno obdelavo v mesu spreminja vsebnost 5α -holestena, vendar značilno le pri kontrolnih skupinah.

Preglednica 13: Vpliv načina obdelave na vsebnost holesterola in oksidov holesterola (mg/100 g) v mesu, pridobljenem po različnem dodatku vitamina E v krmo piščancev (Model 2, Duncan test, $\alpha = 0,05$)

parameter (mg/100 g)	način obdelave	piščančje meso posameznih krmnih skupin			
		kontN	kontP	vitE-DL	vitE-200
holesterol	S	86,53 ± 9,45 ^b	82,82 ± 8,62	79,30 ± 8,40 ^b	79,40 ± 8,02
	S3	96,45 ± 18,37 ^a	91,15 ± 26,56	96,71 ± 22,62 ^a	91,23 ± 25,95
	SH	96,22 ± 9,26 ^a	84,29 ± 9,23	88,67 ± 5,86 ^{ab}	86,13 ± 10,79
	K	87,10 ± 7,13 ^b	81,94 ± 8,55	82,40 ± 4,21 ^b	79,93 ± 5,88
	K3	88,61 ± 6,73 ^{ab}	83,83 ± 5,91	83,30 ± 5,77 ^b	83,68 ± 9,55
	KH	84,67 ± 4,56 ^b	87,22 ± 7,55	85,39 ± 8,78 ^b	86,02 ± 7,35
	značilnost	**	nz	**	nz
5α -holesten	S	0,54 ± 0,11 ^{bc}	0,44 ± 0,08 ^b	0,44 ± 0,10	0,39 ± 0,17
	S3	0,61 ± 0,13 ^{ab}	0,45 ± 0,12 ^b	0,51 ± 0,09	0,45 ± 0,16
	SH	0,70 ± 0,18 ^a	0,42 ± 0,17 ^b	0,50 ± 0,11	0,46 ± 0,10
	K	0,65 ± 0,22 ^{ab}	0,45 ± 0,12 ^b	0,48 ± 0,10	0,42 ± 0,15
	K3	0,53 ± 0,17 ^{bc}	0,45 ± 0,08 ^b	0,42 ± 0,08	0,50 ± 0,14
	KH	0,48 ± 0,13 ^c	0,58 ± 0,13 ^a	0,45 ± 0,10	0,53 ± 0,13
	značilnost	**	*	nz	nz
7β -hidroksi-holesterol	S	0,07 ± 0,08	0,10 ± 0,07	0,11 ± 0,05	0,09 ± 0,08
	S3	0,14 ± 0,06	0,10 ± 0,09	0,09 ± 0,07	0,09 ± 0,08
	SH	0,08 ± 0,07	0,12 ± 0,06	0,10 ± 0,07	0,10 ± 0,07
	K	0,11 ± 0,07	0,11 ± 0,08	0,12 ± 0,06	0,13 ± 0,08
	K3	0,08 ± 0,06	0,13 ± 0,07	0,06 ± 0,06	0,13 ± 0,05
	KH	0,11 ± 0,08	0,07 ± 0,11	0,08 ± 0,07	0,11 ± 0,08
	značilnost	nz	nz	nz	nz

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 13: Vpliv načina obdelave na vsebnost holesterola in oksidov holesterola (mg/100 g) v mesu, pridobljenem po različnem dodatku vitamina E v krmo piščancev (Model 2, Duncan test, $\alpha = 0,05$)

parameter (mg/100 g)	način obdelave	Piščančje meso posameznih krmnih skupin			
		kontN	kontP	vitE-DL	vitE-200
20 α -hidroksi-holesterol	S	0,09 ± 0,06	0,08 ± 0,08	0,11 ± 0,12	0,15 ± 0,12
	S3	0,12 ± 0,12	0,12 ± 0,13	0,07 ± 0,08	0,07 ± 0,10
	SH	0,06 ± 0,08	0,10 ± 0,09	0,13 ± 0,06	0,08 ± 0,07
	K	0,05 ± 0,06	0,03 ± 0,04	0,10 ± 0,11	0,13 ± 0,11
	K3	0,17 ± 0,14	0,10 ± 0,11	0,10 ± 0,08	0,10 ± 0,08
	KH	0,08 ± 0,09	0,12 ± 0,12	0,07 ± 0,08	0,11 ± 0,11
	značilnost	nz	nz	nz	nz
25-hidroksi-holesterol	S	0,05 ± 0,06	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,04
	S3	0,02 ± 0,05	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,04	0,02 ± 0,03
	SH	0,03 ± 0,09	0,04 ± 0,08	0,10 ± 0,13	0,06 ± 0,09
	K	0,03 ± 0,05	0,04 ± 0,06	0,03 ± 0,08	0,03 ± 0,06
	K3	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,02
	KH	0,03 ± 0,05	0,04 ± 0,05	0,04 ± 0,05	0,03 ± 0,05
	značilnost	nz	nz	nz	nz
oksidi holesterola skupaj	S	0,74 ± 0,12	0,64 ± 0,12	0,68 ± 0,14 ^{abc}	0,65 ± 0,28
	S3	0,89 ± 0,19	0,68 ± 0,22	0,69 ± 0,16 ^{abc}	0,63 ± 0,19
	SH	0,87 ± 0,21	0,68 ± 0,21	0,82 ± 0,17 ^a	0,70 ± 0,20
	K	0,85 ± 0,22	0,63 ± 0,17	0,74 ± 0,16 ^{ab}	0,72 ± 0,22
	K3	0,78 ± 0,22	0,67 ± 0,19	0,59 ± 0,13 ^c	0,74 ± 0,20
	KH	0,70 ± 0,16	0,81 ± 0,25	0,65 ± 0,15 ^{bc}	0,78 ± 0,16
	značilnost	nz	nz	*	nz

kontN – negativna kontrola, palmova mast, kontP – pozitivna kontrola, laneno olje, vitE-DL – laneno olje + vitamin E, vitE-200 – laneno olje + velika količina vitamina E; S – sveže (-70 °C); S3 – 3 mesece pri -20 °C, nato pri -70 °C; SH – 6 dni (4 °C), nato pri -70 °C; K – sveže + kuhanje, nato pri -70 °C; K3 – 3 mesece pri -20 °C, kuhan, nato pri -70 °C; KH – kuhan + 6 dni pri 4 °C, nato pri -70 °C; znač. – značilnost: ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b,c} vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (različno obdelanih podskupin) se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p > 0,05$).

Nenazadnje je vsebnost oksidov holesterola v vzorcih odvisna od vsebnosti holesterola v neobdelanih vzorcih, zato smo v preglednici 14 testirali, kako se spreminja delež oksidov

holesterola od skupnega holesterola v različno obdelanih vzorcih, vendar so ugotovitve podobne kot v preglednicah 12 in 13.

Preglednica 14: Vpliv dodatka vitamina E v krmo piščancev in načina obdelave na delež oksidov holesterola od skupnega holesterola[#] v piščančjem mesu (model 2, Duncan test, $\alpha = 0,05$)

način obdelave	piščančje meso posameznih krmnih skupin				značilnost
	kontN	kontP	vitE-DL	vitE-200	
S	0,85 ± 0,13	0,77 ± 0,17	0,85 ± 0,14 ^{abc}	0,81 ± 0,34	nz
S3	0,92 ± 0,18 ^x	0,76 ± 0,23 ^y	0,73 ± 0,20 ^{cy}	0,72 ± 0,25 ^y	*
SH	0,89 ± 0,17	0,80 ± 0,22	0,92 ± 0,15 ^a	0,81 ± 0,21	nz
K	0,96 ± 0,20	0,76 ± 0,16	0,89 ± 0,19 ^{ab}	0,88 ± 0,23	nz
K3	0,88 ± 0,25	0,79 ± 0,19	0,70 ± 0,17 ^c	0,88 ± 0,22	nz
KH	0,82 ± 0,18	0,91 ± 0,26	0,75 ± 0,16 ^{bc}	0,90 ± 0,16	nz
značilnost	nz	nz	**	nz	

[#] – skupni holesterol = holesterol in oksidi holesterola; kontN – negativna kontrola, palmova mast, kontP – pozitivna kontrola, laneno olje, vitE-DL – laneno olje + vitamin E, vitE-200 – laneno olje + velika količina vitamina E; S – sveže (-70 °C); S3 – 3 mesece pri -20 °C, nato pri -70 °C; SH – 6 dni (4 °C), nato pri -70 °C; K – sveže + kuhanje, nato pri -70 °C; K3 – 3 mesece pri -20 °C, kuhan, nato pri -70 °C; KH – kuhan + 6 dni pri 4 °C, nato pri -70 °C; znač. – značilnost: ** $p \leq 0,05$ statistično visoko značilen vpliv, * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv, nz – $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; ^{a,b,c} vrednosti z različno nadpisano črko znotraj stolpca (različno obdelanih podskupin) se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p > 0,05$); ^{x,y} vrednosti z različno nadpisano črko znotraj vrstice (skupin z dodanim vitaminom E) se med seboj statistično značilno razlikujejo ($p > 0,05$).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vsebnost vitamina E v presnem piščančjem mesu

Preglednica 15: Vsebnost vitamina E v krmi štirih skupin piščancev in vsebnost treh oblik vitamina E v presnem piščančjem mesu

krmne skupine	vsebnost skupnega α -tokoferola v krmi (mg/kg krme)	vsebnost α -tokoferola v svežem vzorcu (mg/100g vzorca)	vsebnost β in γ -tokoferola v svežem vzorcu (mg/100g vzorca)
kontN	15,5	0,265	0,032
kontP	15,5	0,179	0,071
vitE-DL	77,3	0,502	0,050
vitE-200	188,2	1,067	0,058

kontN – negativna kontrola, palmova mast, kontP – pozitivna kontrola, laneno olje, vitE-DL – laneno olje + vitamin E, vitE-200 – laneno olje + velika količina vitamina E.

Iz preglednic 10 in 14, v katerih so zbrani podatki o vsebnosti vitamina E v krmi in v presnem mesu, lahko vidimo, da se vsebnost oblik β - in γ -tokoferola v mesu različnih skupin razlikuje v manjši meri. Vsebnost α -tokoferola med skupinami močno variira, vsebnost te oblike pri skupinah vitE-DL in vitE-200 je bistveno povečana, kar pomeni, da so bila naša predvidevanja uspešna in cilj dosežen. Opazna je precejšnja razlika (30 %) v vsebnosti α -tokoferola med skupinama kontN in kontP (enaka količina vitamina E v krmi, a različna maščoba), vendar je statistično neznačilna (preglednica 10). Podoben rezultat je dobil tudi Eder in sod. (2005). Tudi v njegovem poskusu so vzorci s pretežno nasičenimi maščobnimi kislinami vsebovali več vitamina E, kot tisti z nenasičenimi maščobnimi kislinami. Torej lahko zaključimo, da maščobnokislinska sestava krme vpliva na koncentracijo vitamina E v mesu.

5.1.2 Vsebnost holesterola v piščančjem mesu, glede na krmo piščancev in glede na obdelavo mesa

Določanje holesterola v vzorcih je potekalo zadovoljivo. Kljub temu da so rezultati variirali med 59,5 in 147,4 mg/100 g, pa koeficient variabilnosti znaša 14,4 %, kar je v

mejah pričakovanega. Pričakovali smo, da dodan vitamin E v krmo in način toplotne obdelave ne bosta vplivala na vsebnost holesterola v vzorcih. V organizmu je holesterol namreč zastopan v bolj ali manj enaki količini in ni odvisen od količine zaužite hrane ali kakšnega drugega dejavnika. Povprečje holesterola v naših vzorcih je bilo 86,46 mg/100 g mesa, kar je primerljivo z vsebnostjo, ki so jo določili Maraschiello in sodelavci (1998), ne ujema pa se s podatki v preglednici 2. Razlog je v tem, da so podatki v različni literaturi pridobljeni po različnih metodah, odvisni so tudi od kosa mesa, prisotnosti kože in vsebnosti vode v mesu.

Meso piščancev, hranjenih z nasičenimi maščobnimi kislinami, praviloma vsebuje večjo količino holesterola kot meso piščancev, ki so imeli v prehrani povečan delež nenasičenih maščobnih kislin. Razlike v vsebnosti holesterola so statistično neznačilne razen pri svežem vzorcu, hranjenim v hladilniku (podskupina SH), kjer je razlika kar 12 %. Podobno ugotavlja tudi Maraschiello s sodelavci (1998), ki dokazuje povezanost med vsebnostjo holesterola in maščobno kislinsko sestavo. Vendar pa moramo na tem mestu poudariti, da v našem poskusu nismo dokazali, da bi dodatek maščob z nasičenimi maščobnimi kislinami v krmo piščancev značilno vplival na povečano vsebnost holesterola v njihovem mesu.

V nasprotju s hipotezo, da način toplotne obdelave ne bo vplival na vsebnost holesterola v vzorcih, pa smo ugotovili značilne razlike pri kontN in skupini vitE-DL. Pri obeh skupinah smo določili značilno največje vsebnosti holesterola v svežem vzorcu hranjenem v zamrzovalniku in svežem vzorcu hranjenem v hladilniku (S3 in SH). Možen vzrok je ta, da sta ta dva vzorca v zamrzovalniku in hladilniku izgubljala vodo z izhlapevanjem in sublimacijo ledu.

5.1.3 Vsebnost 5 α -holestena v piščančjem mesu, glede na krmo piščancev in glede na obdelavo mesa

5 α -holesten je oksid, ki smo ga v našem poskusu določili v največji količini, v povprečju 0,50 mg/100 g vzorca. Analitika in detekcija te oblike oksidov nista problematična, prav tako je variabilnost med posameznimi določanji pričakovana (KV = 30 %). Statistična

obdelava podatkov je potrdila vpliv dodatka nasičene/ nenasičene maščobe in vpliv načina toplotne obdelave, na vsebnost omenjenega oksida. Če povzamemo, je v skupini kontN (nasičena maščoba) značilno večja vsebnost 5α -holestena kot v ostalih treh poskusnih skupinah z dodanimi nenasičenimi maščobami in vitaminom E (kontP, vitE-DL in vitE-200), razlika je neznatna v podskupinah K3 in KH. Vpliv dodatka vitamina E statistično ni dokazan, vendar se pozna trend njegovega zaviralnega učinka na nastanek oksidov.

Vpliv skladiščenja in toplotne obdelave na nastanek 5α -holestena, je značilen v kontrolnih skupinah z dodano nasičeno (kontN, $p \leq 0,01$) in nenasičeno (kontP, $p \leq 0,05$) maščobo. Pri skupini kontN, svež vzorec vsebuje najmanj 5α -holestena, nekoliko več ga vsebuje vzorec hranjen v zamrzovalniku (S3), največ pa ga je nastalo pri shranjevanju vzorca v hladilniku (SH). Rezultat je bil pričakovan, saj oksidacija pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ poteka bistveno počasneje kot pa v hladilniku pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. V kuhanem vzorcu (K) je 5α -holestena več kot v vzorcu, ki je bil po kuhanju hranjen v zamrzovalniku (K3) in veliko več, kot v tistem hranjenem v hladilniku (KH). Predvidevamo, da se pri kuhanju zaradi denaturacije beljakovin sprosti železov ion, ta med skladiščenjem vpliva na pretvorbo 5α -holestena v neko drugo obliko. Zaradi možnih konverzij oksidov, veliko raziskovalcev analizira skupne okside in ne posameznih oblik. Kemizem nastanka oksidov, prehajanje ene oblike v drugo, interakcije z drugimi spojinami in podobno, je še slabo raziskan. Prav zato je tudi težko predvidevati, zakaj je pri pozitivni kontroli le pri kuhanem vzorcu hranjenem v hladilniku nastalo občutno več 5α -holesten oksida, kot v vseh ostalih načinih obdelave. Verjetno je razlog v nenasičenih maščobnih kislinah, saj je to edina razlika med pozitivno in negativno skupino.

5.1.4 Vsebnost 7β -hidroksi-holesterola v piščančjem mesu, glede na krmo piščancev in glede na obdelavo mesa

7β holesterol ali z drugim imenom 7β -hidroksi-holesterol nastane z oksidacijo B obroča holesterola. Kemijsko je povsem enak 7α -hidroksi-holesterolu. Razlika je samo v tem, kam je obrnjena skupina OH tj. v ravnino ali iz ravnine. Na splošno se v mesu pojavlja nekoliko več α oblike (Hur in sod., 2006). 7β -hidroksi-holesterol je (poleg 20α -hidroksi-holesterola) oksid, ki je v naši raziskavi zastopan v bistveno manjši količini kot 5α -holesten. Nekajkrat smo določili vsebnost 7β -hidroksi-holesterola pod mejo detekcije, največja določena

vsebnost pa je bila 0,29 mg/100 g. Na splošno njegova vsebnost (povprečno v poskusu – 0,10 mg/100 g vzorca) ni odvisna od dodatka vitamina E v krmo in načina toplotne obdelave.

Obe obliki, 7 β - in 7 α -hidroksi-holesterol, je določal tudi Maraschiello s sodelavci (1998) in tudi v njegovi raziskavi ni statistično zaznavnih razlik med posameznimi procesi obdelave vzorca ali pa dodatkom vitamina E. Nekateri raziskovalci domnevajo, da med obdelavo vzorca obliki lahko prehajata iz ene v drugo in je zato bolje prikazati obe skupaj kot en rezultat. V našem primeru to ni bilo mogoče, saj nismo imeli standarda za 7 α -hidroksi holestrol in ga zato nismo določali.

5.1.5 Vsebnost 20 α -hidroksi-holesterola v piščančjem mesu, glede na krmo piščancev in glede na obdelavo mesa

Tudi 20 α -hidroksi-holesterol nastane z oksidacijo stranske verige holesterola. V povprečju smo ga v vzorcih določili 0,10 mg/100 g; zastopan je v podobni količini kot 7 β -hidroksi-holesterol in v veliko večji količini kot 25-hidroksi-holesterol. Ugotovili smo, da skladiščenje in toplotna obdelava ne vplivata značilno na povečanje njegove vsebnosti v vzorcih. Na splošno njegova vsebnost tudi ni odvisna od dodatka vitamina E v krmo piščancev, izjema so le vzorci podskupine K, kjer je ta vpliv značilen. Statistično značilno največjo vsebnost 20 α -hidroksi-holesterola smo določili v vzorcu z najvišjim dodatkom vitamina E (0,13 mg/100 g) in najmanjšo pri pozitivni kontroli (0,03 mg/100 g). V vzorcu z večjo vsebnostjo vitamina E, je med kuhanjem nastalo skoraj štirikrat več tega oksida, kot pri pozitivni kontroli. Če upoštevamo, da kuhanje poveča koncentracijo oksidov in da dodatek vitamina E zavira njihovo nastajanje, je rezultat v nasprotju s pričakovanji. Toda enak rezultat so dobili tudi Marciello in sodelavci (1998). Predvidevamo, da je za nastanek 20 α -hidroksi-holesterola potrebna visoka temperatura, saj se samo pri kuhanju nekoliko poveča njegova vsebnost. Možna razlaga našega rezultata, pa bi lahko bila, da večja vsebnost vitamina E pred oksidacijo ščiti predvsem maščobne kisline (Žlender, 2000). Če predpostavimo, da se pri enako dolgem času kuhanja, sprosti enaka količina prostih radikalov, ti pri pozitivni kontroli oksidirajo predvsem nenasičene maščobne kisline, ki jih

vitamin E ne ščiti, hkrati pa imajo te prioriteto za oksidacijo pred holesterolom (Hur in sod., 2006).

5.1.6 Vsebnost 25-hidroksi-holesterola v piščančjem mesu, glede na krmo piščancev in glede na obdelavo mesa

V vzorcih smo določili tudi 25-hidroksi-holesterol, ki nastane z oksidacijo stranske verige holesterola. Spada med tiste okside, ki se v hrani redko pojavljajo. V našem poskusu smo ga določili v zelo majhnih koncentracijah. Razlike med skupinami in načini obdelave vzorcev niso statistično značilne, najbrž zaradi velike variabilnosti med vzorci, saj je bila vsebnost tega oksida v veliko vzorcih pod mejo detekcije. Naš rezultat se povsem sklada z ugotovitvami ostalih raziskav, v katerih je bila vsebnost 25-hidroksi-holesterola v večini primerov pod mejo detekcije (Hur in sod., 2006).

5.1.7 Vsebnost skupnih oksidov holesterola v piščančjem mesu, glede na krmo piščancev in glede na obdelavo mesa

S statistično obdelavo podatkov smo potrdili nekatere povezave med različno količino dodanega vitamina E in različno maščobnokislinsko sestavo. Tako smo pri svežem vzorcu hranjenem v zamrzovalniku (S3) ugotovili, da je vseh oksidov bistveno več v negativni kontrolni skupini kot pa v ostalih treh. Predvidevamo, da je razlog v tem, da se nenasičene maščobne kisline oksidirajo pred holesterolom. Tako v vzorcu, kjer prevladujejo nasičene maščobne kisline, ni dovolj nenasičenih kislin, ki bi se oksidirale in se zato oksidira več holesterola. Enako ugotavljamo tudi za kuhane vzorce, pri ostalih načinih skladiščenja in toplotne obdelave pa razlik statistično ne moremo potrditi.

Na splošno skladiščenje in toplotna obdelava ne vplivata na nastanek oksidov, izjema je le meso piščancev skupine vitE-DL, ki so bili krmljeni z dodatnimi 60 mg vitamina E na kilogram krme. Kuhani vzorci te skupine (K)vsebujejo več oksidov holesterola kot vzorci, hranjeni v zamrzovalniku in nato skuhan (K3). Rezultat ni bil pričakovan.

Čeprav statistično ni bilo značilnih razlik, lahko v splošnem glede nastanka oksidov opazimo podoben rezultat, kot so ga opazili ostali avtorji (Maraschiello, 1998; Eder, 2004). Praviloma več oksidov holesterola nastane v mesu piščancev z večjo vsebnostjo NMK. Že pri posameznih oksidih holesterola smo pojav razložili z večjo afiniteto nenasičenih maščobnih kislin, da se oksidirajo pred holesterolom (Hur in sod., 2006). Ker se skupini vitE-DL in vitE-200 razlikujeta le v dodani koncentraciji vitamina E, lahko ugotovimo, kako ta vpliva na nastanek oksidov. Predhodne raziskave so pokazale, da več kot dodamo vitamina E v prehrano, manj oksidov holesterola nastane. Te ugotovitve v našem poskusu nismo uspeli potrditi.

Namesto zaključka naj poudarimo, da bo v prihodnje potrebno dopolniti poskus vsaj še s skupino piščancev, krmljeno z nasičeno maščobo in dodatkom vitamina E. V poskusu smo tudi testirali vplive različnih načinov toplotne obdelav in hrambe vzorca na tvorbo oksidov holesterola. Ugotovili smo, da izbrani načini, ki posnemajo primere iz vsakdanjega življenja (kot npr.: meso v trgovini je prav tako 6 dni pri 4 °C, doma največkrat hranimo meso v skrinji pri -20 °C nato pa ga skuhamo, včasih pa ga skuhamo in nato damo v hladilnik do naslednjega dne ali nekoliko več) ne vplivajo na tvorbo oksidov holesterola v večjem obsegu. Seveda, bi v primeru, če bi uporabili namesto kuhanja pečenje, kjer so prisotne veliko višje temperature, ali pa bi meso hranili v skrinji vsaj pol leta, najbrž v teh vzorcih ugotovili bistveno večje količine oksidov holesterola, vendar s tem ne bi mogli oceniti realne nevarnosti toplotne obdelave in skladiščenja piščančjega mesa za zdravje človeka. Res je, da so Hur in sodelavci (2006) večjo tvorbo oksidov opazili pri vzorcih, ki so bili hranjeni v hladilniku pri 5 °C 15 dni, ali pa so vzorce pekli pri 155 °C kar 376 ur, vendar pa iz njihovih zaključkov ne moremo posplošiti, kaj se dogaja med manj ostrimi pogoji skladiščenja in obdelave. Predhodne raziskave sicer kažejo, da se oksidi holesterola tvorijo med izdelavo mesnih izdelkov, t.j. toplotno obdelavo, vendar njihovi rezultati niso direktno primerljivi z našimi predvsem zaradi uporabe določenih aditivov. Tudi material naše raziskave so bila piščančja prsa brez kože, ki po ugotovitvah Golobove in sodelavcev (2006) vsebujejo manj maščob in holesterola kot bedra ali prsa s kožo. Tak material naj bi bil po naših predvidevanjih zato manj podvržen oksidaciji tako maščob kot holesterola, vse to pa vpliva na iz vrednotene razmeroma majhne koncentracije oksidov holesterola. V poskusu smo bili omejeni tudi z izbiro standardov oksidov holesterola, saj je težko dobiti

dovolj čist standard za primerno ceno. Tako smo določili le štiri okside holesterola, od katerih se 20α -hidroksi-holesterol in 25 -hidroksi-holesterol nahajata v zelo majhnih koncentracijah, največkrat sta pod mejo detekcije. V večji koncentraciji je bil v našem poskusu določen le 5α -holesten. Tako se moramo verjetno vprašati ali so določeni oksidi reprezentativen del celotnih oksidov holesterola v vzorcu ali so le nek manjši del.

5.2 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- **Dodatek vitamina E** v krmo piščancev **poveča njegovo vsebnost v mesu.**
- **Maščobnokislinska sestava krme vpliva na koncentracijo vitamina E v mesu:** meso piščancev, krmljenih z maščobo, ki vsebuje pretežno nasičene maščobne kisline, ima večjo ($p > 0,05$) vsebnost α -tokoferola kot meso živali, krmljenih pretežno z nenasičeno maščobo.
- V našem poskusu **nismo** dokazali, da bi dodatek maščob z **nasičenimi maščobnimi kislinami v krmo** piščancev značilno **povečal** vsebnost **holesterola** v njihovem mesu.
- **Skladiščenje in način toplotne obdelave vplivata na vsebnost holesterola** (kontN in vitE-DL); največja vsebnost holesterola je bila v svežih vzorcih, hranjenih v zamrzovalniku in hladilniku.
- V piščančjem mesu po hranjenju in toplotni obdelavi smo določili **največ 5 α holestena** (0,50 mg/100 g), 20 α -hidroksi-holesterol, 25-hidroksi-holesterol in 7 β -hidroksi-holesterol so prisotni v manjših koncentracijah ($< 0,10$ mg/100 g).
- Praviloma **več oksidov holesterola** nastane v mesu piščancev, krmljenih s pretežno **nasičenimi** maščobnimi kislinami, kot v mesu piščancev, krmljenimi s pretežno nenasičenimi maščobnimi kislinami.
- **Večji dodatek vitamina E** v krmo piščancev **ne zavira** nastanka oksidov v mesu.
- **Skladiščenje in toplotna obdelava ne vplivata na nastanek oksidov holesterola**, izjema je le meso piščancev, krmljenih z dodatnimi 60 mg vitamina E/kg krme. Kuhani vzorci te skupine vsebujejo več oksidov holesterola kot vzorci, hranjeni v zamrzovalniku in nato skuhani.
- Za podrobnejše razumevanje problematike tvorbe oksidov holesterola med različnimi procesi predelave in skladiščenja mesa so potrebne nadaljnje raziskave.

6 POVZETEK

Piščančje meso je, ob pravilni pripravi, lahko pomembna sestavina uravnotežene prehrane, saj vsebuje veliko beljakovin in malo maščob. Kot vse ostale vrste mesa pa vsebuje določeno količino holesterola. Res je, da v prehrani človeka holesterol v celoti izvira iz hrane živalskega izvora, to so meso vseh vrst, mleko, jajca in njihovi izdelki. Vendar pa so vsebnost maščob in njihova sestava v prehrani tisti ključni dejavniki, ki vplivajo na vsebnost serumskega holesterola pri človeku in tako na nevarnost pojava bolezni srca in ožilja. Prehranski vnos holesterola ima na splošno vse manjši pomen, vse več pozornosti se posveča oksidacijskim produktom holesterola – oksisterolom. Najnovejše raziskave se ukvarjajo s potencialno toksičnostjo oksidov holesterola, pogoji za njihov nastanek, možnostmi zmanjševanja v prehrani in vplivom na zdravje.

S to raziskavo smo želeli ugotoviti, kako dodatek različnih količin sintetičnega vitamina E v kontrolirano krmo piščancev vpliva na nastanek oksidov holesterola v njihovem mesu. Namen tega dela je bil ugotoviti ne le smiselnost ampak tudi morebitni pozitivni učinek dodatka vitamina E v krmo piščancev na znižanje ravni oksidov holesterola v mesu po določenih postopkih priprave, kot so shranjevanje, kuhanje in zmrzovanje. Ugodnejša sestava piščančjega mesa obogatenega z vitaminom E, z vidika oksidov holesterola, bi temu živilu dala še dodatno vrednost, saj gredo trendi zdrave prehrane prav v tej smeri.

Predpostavili smo, da bo meso piščancev, krmljenih z več vitamina E, imelo večjo vsebnost tega vitamina. Poglavitna predpostavka pa je bila, da bomo z dodanim vitaminom E v krmo piščancev v njihovem mesu pomembno zmanjšali nastanek oksidov holesterola v primerjavi z mesom piščancev, katerim vitamin E v krmo ni bil dodan, ne glede na postopke z mesom med predelavo in hranjenjem. Glede na to, da postopki predelave povečujejo dovzetnost mesa za oksidacijo, smo v kuhanih vzorcih pričakovali večjo vsebnost holesterol oksidov kot v vzorcih, hranjenih v hladilniku ali zamrzovalniku.

V poskus je bilo vključenih 84 piščancev provenience Ross 308, moškega spola. Živali so bile pri starosti 21 dni uhlevljene individualno v žične kletke, kjer so imele vseskozi dostop do vode in krme. Glede na dodatek vitamina E in nasičenost maščob v prehrani so bile

živali razporejene v štiri enako velike skupine: negativno kontrolo (kontN), pozitivno kontrolo (kontP), vitamin E (vitE-DL) in vitamin E (vitE-200). Skupina piščancev kontN je kot dodatek prehrani prejela palmovo mast, ki je bogata z nasičenimi maščobami. Skupina kontP je namesto palmove masti prejela laneno olje, bogato z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami. Skupina vitE-DL je poleg lanenega olja prejela tudi dodatek vitamina E (dl-all-rac- α tokoferol), ki je ob enem tudi antioksidant. Enako kot ta skupina je vitamin E prejela tudi skupina vitE-200, le da je bilo dodatka veliko več. Poskus je trajal od 21. do 46. dne starosti, ko so bili piščanci zaklani in odvzeti vzorci njihovega mesa za analize.

Takoj po zakolu piščancev smo iz trupov odvzeli leve in desne površinske prsne mišice (*pectoralis superficialis*), brez kosti in kože. Mišice vsake živali smo razrezali na deset približno enakih delov. En kos smo takoj dali v skrinjo na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, po treh mesecih pa smo temperaturo znižali na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. To je bila naša skupina S3. Vse ostale dele pa smo takoj zamrznili pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in jih kasneje obravnavali kot sveže. Skupino S smo homogenizirali in takoj zamrznili nazaj na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in jo tako ohranili nespremenjenega do analize. Skupino vzorcev SH smo odtalili in hranili šest dni v hladilniku pri temperaturi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, jih homogenizirali, nato pa zamrznili na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skupino K smo pred homogenizacijo in zamrznitvijo najprej skuhalo. Vzorce smo dali v plastične centrifugirke s pokrovčkom, da nismo izgubili izcejene tekočine. Vzorce smo eno uro kuhali v vroči vodni kopeli s temperaturo $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. S skupino HK smo ravnali enako kot s skupino K, le da smo jo po kuhanju še šest dni hranili v hladilniku pri temperaturi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in jo šele nato homogenizirali in zamrznili. Zadnjo skupino K3 smo tri mesece hranili v skrinji pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, po tem pa jo pred končnim zamrzovanjem še skuhalo po prej opisanem postopku in homogenizirali.

Za določanje vsebnosti holesterola in oksidov holesterola v različno skladiščenih in toplotno obdelanih vzorcih smo uporabili metodo, sestavljeno iz hladne saponifikacije, ekstrakcije, postopka SPE ter določanja vsebnosti holesterola in oksidov holesterola z LC-MS/MS. Po končani analizi smo pridobljene rezultate statistično obdelali.

Ugotovili smo, da dodatek vitamina E v krmo piščancev poveča njegovo vsebnost v mesu. Maščobnokislinska sestava krme vpliva na koncentracijo vitamina E v mesu: meso

piščancev, krmljenih z maščobo, ki vsebuje pretežno nasičene maščobne kisline, ima večjo ($p > 0,05$) vsebnost α -tokoferola kot meso živali, krmljenih pretežno z nenasičeno maščobo. V našem poskusu nismo dokazali, da bi dodatek maščob z nasičenimi maščobnimi kislinami v krmo piščancev značilno povečal vsebnost holesterola v njihovem mesu. Skladiščenje in način toplotne obdelave vplivata na vsebnost holesterola (kontN in vitE-DL); največja vsebnost holesterola je bila v svežih vzorcih, hranjenih v zamrzovalniku in hladilniku. V piščančjem mesu smo od oksidov holesterola določili največ 5α -holestena (0,50 mg/100 g), 20α -hidroksi-holesterol, 25 -hidroksi-holesterol in 7β -hidroksi-holesterol so prisotni v manjših koncentracijah ($< 0,10$ mg/100 g). Praviloma več oksidov holesterola nastane v mesu piščancev, krmljenih s pretežno nasičenimi maščobnimi kislinami, kot v mesu piščancev, krmljenimi z pretežno nenasičenimi maščobnimi kislinami. Večji dodatek vitamina E v krmo piščancev ne zavira nastanka oksidov v mesu. Skladiščenje in toplotna obdelava ne vplivata na nastanek oksidov holesterola, izjema je le meso piščancev, krmljenih z dodatnimi 60 mg vitamina E/kg krme. Kuhani vzorci te skupine vsebujejo več oksidov holesterola kot vzorci, hranjeni v zamrzovalniku in nato skuhani.

7 VIRI

- Arnold D.R., Kwiterovich P.O. 2003. Cholesterol – absorption, function and metabolism. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 2. 2nd ed. Caballero B., Trugo C.L., Finglas M.P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1226-1236
- Aviagen Group. 1998-2010. Aviagen broiler breeders. Huntsville, Aviagen Group: 1 str.
<http://www.aviagen.com/output.aspx?sec=2721&con=2725&sitId=2> (marec 2010)
- Azadmard-Damirchi S., Dutta P.C. 2009. A single step solid-phase extraction method for complete separation of sterol oxidation products in food lipids. *Journal of Chromatography A*, 1216, 1: 36-42
- Baggio S.R., Bragagnolo N. 2006. Fatty acid, cholesterol oxides and cholesterol in brazilian processed chicken products. *Italian Journal of Food Science*, 18, 2: 199-207
- Berliner J.A., Heinecke J.W. 1996. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 5: 707-727
- Boselli E., Valazco V., Caboni M. F., Ledcker G. 2001. Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food. *Journal of Chromatography A*, 917: 239-244
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 219-221
- Brown A.J., Jessup W. 1999. Oxysterols and atherosclerosis – review article. *Atherosclerosis*, 142: 1-28
- Commission Regulation (ECC) No 1538/91 of 5 June 1991 introducing detailed rules for implementing Regulation (ECC) No 1906/90 on certain marketing standards for poultry. 1991. *Official Journal of the European Union*, 34, L143: 11-22
- Eder K., Grünthal G., Kluge H., Hirche F., Spilke J., Brandsch C. 2005. Concentrations of cholesterol oxidation products in raw, heat-processed and frozen-stored meat of broiler chickens fed diets differing in the type of fat and vitamin E concentrations. *British Journal of Nutrition*, 93: 633-643

- Gašperlin L., Bem Z. 2003. Mikrobiologija perutninskega mesa in jajc. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 423-446
- Golob T., Stibilj V., Žlender B., Doberšek U., Jamnik M., Polak T., Salobir J., Čandek-Potokar M. 2006. Slovenske prehranske tabele – meso in mesni izdelki. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 148-155
- Grau A., Guardiola F., Grimpa S., Barroeta A. C., Codony R. 2001. Oxidative stability of dark chicken meat through frozen storage: Influence of dietary fat and α -tocopherol and ascorbic acid supplementation. *Poultry Science*, 80: 1630-1642
- Gray J.I., Goma E. A., Buckley D.J. 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, 43, Suppl. 1: S111-S123
- Holeman A. 2001. Študijsko gradivo iz ciklusa perutninarstvo pri predmetu živinoreja. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 61-64
- Hur S.J., Park G.B., Joo S.T. 2006. Formation of cholesterol oxidation products in animal products. *Food Control*, 18: 939-947
- Jimenez-Colmenero F., Reig M., Toldra F. 2006. New approaches for the development of functional meat products. V: *Advanced technologies for meat processing*. Nollet L.M.L., Toldra F. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 276-299
- Fisher K. M. 2009. *Biology lessons for prospective and practicing teachers*. San Diego, San Diego State University, College of Sciences: 1 str.
<http://www.biologylessons.sdsu.edu/ta/toc.html> (marec 2010)
- Leonarduzzi G., Sottero B., Poli G. 2002. Oxidized products of cholesterol: Dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 12: 700-710
- Lercker G., Rodriguez-Estrada M.T. 2000. Cholesterol oxidation: Presence of 7-ketocholesterol in different food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 4: 625-631

- Maraschiello C., Esteve E., Garcia Regueiro J.A. 1998. Cholesterol oxidation in meat from chicken fed α -tocopherol- and β -carotene-supplemented diets with different unsaturation grades. *Lipids*, 33, 7: 705-713
- Marinšek J. 1996. Kvaliteta perutninskega mesa in izdelkov. V: Seminar perutninsko meso in izdelki v prehrani. Ljubljana, 17. april 1996. Pokorn D. (ur.). Ptuj, Perutnina Ptuj: 33-37
- Mariutti L.R.B., Nogueira C.G., Bragagnolo N. 2008. Optimization and validation of analytical conditions for cholesterol and cholesterol oxides extraction in chicken meat using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9: 2913-2918
- Piironen V., Toivo J., Lampi A.M. 2002. New data for cholesterol contents in meat, fish, milk, eggs and their products consumed in Finland. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15: 705-713
- Plestenjak A., Golob T. 2000. Sestava in prehranska kakovost animalnih maščob. V: Meso in mesnine za kakovostno prehrano. 2. posvet o vlogi in pomenu mesa v normalni-zdravi in dietni prehrani. Portorož, 10. in 11. februar 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 40-48
- Polak T. 1999. Vpliv reje na maščobnokislinsko sestavo mesa pitovnih piščancev. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 112 str.
- Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. 1. izd. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 50 str.
- Saldanha T., Franklind Aaway A.C.H., Eberlin M.N., Bragagnolo N. 2006. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: Comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4107-4113
- SAS Software. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc.: software
- Sheppard A.J., O'Dell R.G., Pennington J.A.T. 2003. Cholesterol – properties and determination. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 2. 2nd ed.

Caballero B., Trugo C.L., Finglas M.P. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1220-1221

Smith L.L. 1996. Review of progress in sterol oxidation: 1987-1995. *Lipids*, 31: 453-487

SURS. 2009. Število perutnine, Slovenija, letno. Ljubljana, SURS- Statistični urad Republike Slovenije: 1 str.

<http://www.stat.si/> (22. 12. 2009)

Toschi T.G., Caboni M.F. 1992. Cholesterol oxides: Biological behaviour and analytical determination. *Italian Journal of Food Science*, 4: 223-228

Ubhayasekera S.J.K.A., Verleyen T., Dutta P.C. 2004. Evaluation of GC and GC-MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. *Food Chemistry*, 84: 149-157

Žlender B. 2000. Postopki za zmanjšanje oksidativnega kvara maščob v mesu in mesnih izdelkih. V: Meso in mesnine za kakovostno prehrano. 2. posvet o vlogi in pomenu mesa v normalni - zdravi in dietni prehrani. Portorož, 10. in 11. februar 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 153-159