

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Nina KENDA

**VPLIV DODATKOV OLJČNIH LISTOV, PULPE IN
NJUNIH EKSTRAKTOV NA OKSIDATIVNO
STABILNOST KRME ZA KOKOŠI NESNICE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Nina Kenda

**VPLIV DODATKOV OLJČNIH LISTOV, PULPE IN NJUNIH
EKSTRAKTOV NA OKSIDATIVNO STABILNOST KRME ZA
KOKOŠI NESNICE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**EFFECT OF SUPPLEMENTATION OF OLIVE LEAVES, OLIVE
PULP AND THEIR EXTRACTS ON OXIDATIVE STABILITY OF
MIXED FEED FOR LAYING HENS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2014

Z diplomskim delom končujem univerzitetni študij kmetijstva — zootehniko. Kemijske analize so bile opravljene v laboratoriju Katedre za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Vido Rezar in somentorico asist. dr. Alenko Levart.

Recenzent: prof. dr. Janez SALOBIR

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Članica: asist. dr. Alenka LEVART
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Janez SALOBIR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Nina Kenda

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 636.5.084/.087(043.2)=163.6
- KG kokoši/nesnice/prehrana živali/krma/krmni dodatki/vitamin E/oljčni listi/oljčna pulpa/lipidni peroksidi/TBARS/maščobne kisline/oksidativna stabilnost/shranjevanje
- KK AGRIS L02/6100
- AV KENDA, Nina
- SA REZAR, Vida (mentorica)/LEVART, Alenka (somentorica)
- KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- LI 2014
- IN VPLIV DODATKOV OLJČNIH LISTOV, PULPE TER NJUNIH EKSTRAKTOV NA OKSIDATIVNO STABILNOST KRME ZA KOKOŠI NESNICE
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 60 str., 16 pregl., 12 sl., 65 vir
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Neprimerno skladiščenje krmnih mešanic, še posebej obogatenih z n-3 večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (VNMK), lahko vodi do obsežnega nastanka produktov oksidacije maščob v krmi, kot so lipidni peroksidi (LP), s tiobarbiturno kislino reagirajoče spojine (TBARS) idr., ki so za živali in ljudi toksični. V poskusu smo želeli ugotoviti, ali lahko dodatki antioksidantov SANOX, vitamin E in stranski proizvodi oljčne industrije (oljčni listi, oljčna pulpa ter njuna ekstrakta) z antioksidativnim delovanjem zmanjšajo obseg oksidacijskega kvarjenja lipidov med shranjevanjem krmnih mešanic za kokoši nesnice z dodatkom 6 % lanenega olja. Obseg lipidne oksidacije smo določali z merjenjem LP in TBARS. Določali smo tudi maščobnokislinsko sestavo pred in po shranjevanju. Uvedli smo novo metodo za določanje vsebnosti LP s PeroxiDetect™-testom. Krmne mešanice smo shranjevali tri mesece v plastičnih posodah s priprtimi pokrovi pri sobni temperaturi (20 ± 5 °C). Med poskusom smo vsak teden odvzeli en alikvot vzorca in ga zamrzili pri temperaturi - 70 °C do analize. Osnovna krmna mešanica je bila v vseh skupinah enaka, dodali smo različne sintetične ali naravne antioksidante. V krmno mešanico KONT nismo dodali antioksidantov, v K+VITE smo dodali 150 IU/kg vitamina E, v K+OL 1 % posušenih mletih oljčnih listov, v K+EOL etanolni ekstrakt iz ekvivalentne količine v krmo dodanih (10 g/kg krme) oljčnih listov, v K+PU 1 % dodatek oljčne pulpe in v K+EPU etanolni ekstrakt iz ekvivalentne količine v krmo dodane (10 g/kg krme) oljčne pulpe. Pri dodatkih SANOX, vitamina E in oljčnih listih nismo ugotovili večjih odstopanj v učinkovitosti zaviranja lipidne oksidacije, dodatki ekstrakta oljčnih listov in pulpe ter pulpa so se izkazali za nekoliko učinkovitejše pri zmanjšanju lipidne oksidacije krmnih mešanic v primerjavi s KONT. Pri določanju maščobnokislinske sestave krmnih mešanic smo ugotovili, da je najbolj oksidirala α -linolenska MK. Razlike v lipidni oksidaciji med krmnimi mešanicami z dodatki so bile minimalne, zato smo sklepali, da ni prišlo do bistvenih razlik v obsegu lipidne oksidacije med njimi in da je dobro zaščitena že krmna mešanica KONT.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 636.5.084/.087(043.2)=163.6
- CX laying hens/feed/feed additives/vitamin E/olive leaves/olive pulp/lipid peroxides/TBARS/fatty acids/oxidative stability
- CC AGRIS L02/6100
- AU KENDA, Nina
- AA REZAR, Vida (supervisor)/LEVART, Alenka (co-supervisor)
- PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
- PY 2014
- TI EFFECT OF SUPPLEMENTATION OF OLIVE LEAVES, OLIVE PULP AND THEIR EXTRACTS ON OXIDATIVE STABILITY OF MIXED FEED FOR LAYING HENS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 60 p., 16 tab., 12 fig., 65 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Storage of mixed feed for laying hens enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in inappropriate conditions can lead to oxidative deterioration of lipids in feed, that can cause extended formation of lipid peroxides (LP), thiobarbituric acid reacting substances (TBARS) etc., which are toxic for humans and animals. With this study we tried to determine whether an addition of SANOX, vitamin E and by-products of olive oil industry (olive leaves, olive pulp and their extracts) have an antioxidant capacity to reduce the extent of lipid oxidation during storage of feed, enriched with 6 % of linseed oil. Extent of lipid oxidation in feeds was determined by measuring LP and TBARS. We also determined initial fatty acid composition in feeds before and after 3 months of storage at room temperature. With this study we introduced a new method for determination of LP in feeds with PeroxiDetect™ kit. Feeds were stored for three months at room temperature (20 ± 5 °C) in plastic containers with lids left ajar. Every week during this storage we aliquoted samples of each feed and froze them at the temperature of -70 °C until analysis. Basic feed for each group was identical, and then supplemented with different synthetic and natural antioxidants. Feed KONT was not supplemented with antioxidants, feed K+VITE was supplemented with 150 IU/kg of vitamin E, feed K+OL with 1 % of dried olive leaves, feed K+EOL with ethanol extract of equivalent amount of dried olive leaves (10 g/kg), feed K+PU with 1 % of olive pulp, and feed K+EPU was supplemented with ethanol extract of equivalent amount olive pulp (10 g/kg). In samples supplemented with SANOX, vitamin E and dried olive leaves we observed no differences in efficacy of preventing lipid oxidation, but on the contrary other supplements - olive leaves extract, pulp extract and pulp itself have shown to be somewhat more effective in preventing lipid oxidation compared to KONT. Determination of fatty acid composition in feeds showed that the most oxidized was α -linolenic fatty acid. Differences in extent of lipid oxidation in feeds with supplements were low, therefore we concluded that there were no significant differences in efficacy among added antioxidants and that the feed KONT itself was protected enough.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KRMNE MEŠANICE ZA KOKOŠI NESNICE	3
2.1.1 Osnovna sestava krmnih mešanic	3
2.1.2 Obogatitev krmnih mešanic za kokoši nesnice	4
2.2 OKSIDACIJA LIPIDOV	6
2.2.1 Produkti lipidne avtooksidacije in metode njihovega določanja	7
2.2.1.1 Peroksidi	7
2.2.1.2 Malondialdehid	8
2.2.2 Oksidacijski stres	9
2.3 ANTIOKSIDANTI	10
2.3.1 Delitve antioksidantov	10
2.3.1.1 Princip delovanja primarnih antioksidantov	11
2.3.2 Butil hidroksianisol in butil hidroksitoluen	12
2.3.3 Vitamin E	12
2.3.4 Rastlinski polifenoli	15
2.3.4.1 Oljčni listi	18
2.3.4.2 Oljčna pulpa	20

2.3.4.3	Ekstrakta oljčnih listov in pulpe	21
2.4	STABILNOST KRMNIH MEŠANIC ZA ŽIVALI	23
3	MATERIAL IN METODE	26
3.1	MATERIAL	26
3.2	METODE	28
3.2.1	Določitev lipidnih peroksidov	28
3.2.1.1	Priprava standardnih raztopin za umeritveno premico	30
3.2.1.2	Priprava vzorcev in določitev lipidnih peroksidov	30
3.2.2	Določitev maščobnokislinske sestave krmnih mešanic za kokoši nesnice	31
3.3	ANALIZA PODATKOV	32
4	REZULTATI	33
4.1	SPREMINJANJE VSEBNOSTI LIPIDNIH PEROKSIDOV MED SHRANJEVANJEM KRMNIH MEŠANIC	33
4.2	SPREMINJANJE VSEBNOSTI S TIOBARBITURNO KISLINO REAGIRAJOČIH SPOJIN (TBARS) MED SHRANJEVANJEM KRMNIH MEŠANIC	38
4.3	MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA IN VSEBNOST MAŠČOBNIH KISLIN V KRMNIH MEŠANICAH	42
5	RAZPRAVA	46
6	SKLEPI	54
7	POVZETEK	55
8	VIRI	56
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Vsebnost maščobnih kislin v jedilnem lanenem olju	6
Preglednica 2: Kemijska struktura tokoferolov in tokotrienolov (Shukla in sod., 1997, cit po. Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000: 83)	13
Preglednica 3: Povečanje potreb po vitaminu E kot posledica zauživanja VNМК (mg vitamina E/g VNМК) (Muggli, 1994: 167)	14
Preglednica 4: Kemijska sestava svežih in na zraku posušenih oljčnih listov (Sansoucy, 1985)	19
Preglednica 5: Povprečna koncentracija fenolnih spojin v oljčnih listih (Botsoglou in sod., 2012a: 4)	20
Preglednica 6: Kemijska sestava oljčnih pogač in tropin (Sansoucy, 1985)	21
Preglednica 7: Glavne identificirane fenolne spojine v 80 % etanolnem ekstraktu oljčnih listov (mg/100 g) po Lee in sod. (2009: 6110) in v 50 % metanolnem ekstraktu oljčne pulpe (mg/g) po Cardoso in sod. (2005: 30)	23
Preglednica 8: Sestava krmnih mešanic	27
Preglednica 9: Izračunane prehranske vrednosti krmnih mešanic	27
Preglednica 10: Rezultati Weendske analize svežih krmnih mešanic (g/kg)	28
Preglednica 11: Volumen t-BuOOH in volumen 90 % raztopine za pripravo standardnih raztopin za umerjanje	30
Preglednica 12: Koncentracija lipidnih peroksidov (nmol ekv. t-BuOOH/g) v vzorcih krmnih mešanic za kokoši nesnice brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk	33
Preglednica 13: Koncentracija lipidnih peroksidov (mmol ekv. t-BuOOH/kg maščobe) v svežih in shranjenih vzorcih krmnih mešanic za kokoši nesnice brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk	37

Preglednica 14:	Koncentracija s tiobarbiturno kislino reagirajočih spojin (TBARS, nmol/g vzorca) v vzorcih krmnih mešanic za kokoši nesnice brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk	38
Preglednica 15:	Maščobnokislinska sestava (md, %) svežih in tri mesece shranjenih krmnih mešanic brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk	42
Preglednica 16:	Vsote maščobnih kislin (md, %) v svežih in tri mesece shranjenih krmnih mešanicah brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk	44

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Spreminjanje koncentracije nekaterih produktov oksidacijskega kvarjenja maščob (Kircheggner, 2004, cit. po Frankič in Salobir, 2007: 3)	9
Slika 2: Kemijska struktura BHA in BHT (Wanasundara in Shahidi, 2005: 440)	12
Slika 3: Kemijske strukture fenolnih spojin (Manach in sod., 2004: 728)	16
Slika 4 : Kemijska struktura olevropeina — $C_{25}H_{32}O_{13}$ (Soni in sod., 2006: 905)	17
Slika 5: Kemijska struktura hidroksitirozola — $C_8H_{10}O_3$ (Soni in sod., 2006: 905)	18
Slika 6: Prerez ploda oljke (Nefzaoui, 1983 cit. po Sansoucy, 1985)	20
Slika 7: Spreminjanje vsebnosti lipidnih peroksidov (nmol ekv. t-BuOOH/g vzorca) med shranjevanjem krmnih mešanic za kokoši nesnice pri sobni temperaturi brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk	34
Slika 8: Spreminjanje koncentracije lipidnih peroksidov (mesečne povprečne vrednosti, nmol ekv. t-BuOOH/g vzorca) v svežih in shranjenih krmnih mešanicah za kokoši nesnice pri sobni temperaturi brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk	35
Slika 9: Spreminjanje vsebnosti TBARS (nmol/g vzorca) v svežih in shranjenih krmnih mešanicah za kokoši nesnice pri sobni temperaturi brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk	39
Slika 10: Spreminjanje vsebnosti TBARS (mesečne povprečne vrednosti, nmol/g vzorca) v svežih in shranjevanih krmnih mešanicah za kokoši nesnice pri sobni temperaturi brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk	40
Slika 11: Razlika (mg/100 g) v vsebnosti posameznih maščobnih kislin svežih in tri mesece pri sobni temperaturi shranjenih krmnih mešanic za kokoši nesnice brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk	43

Slika 12: Razlika (mg/100 g) v vsebnosti vsot maščobnih kislin svežih in tri mesece pri sobni temperaturi shranjenih krmnih mešanic za kokoši nesnice brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk

45

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A \cdot	radikal antioksidanta
AA	arahidonska maščobna kislina
AH	antioksidant
BHA	butiliran hidroksianizol
BHT	butiliran hidroksitoluen
DHK	dokozaheksaenojska maščobna kislina
EPK	eikozapentaenojska kislina
MDA	malondialdehid
MK	maščobna kislina
LP	lipidni peroksidi, koncentracija lipidnih peroksidov
PŠ	peroksidno število
R \cdot	prosti radikal
RH	maščobna kislina
ROO \cdot	peroksidni radikal
ROOH	lipidni hidroperoksid
VNMK	večkrat nenasičene maščobne kisline
TBA	tiobarbiturna kislina
TBARS	s tiobarbiturno kislino reagirajoče spojine
TBHQ	terc-butil hidrokinon
n-3 VNMK	n-3 večkrat nenasičene maščobne kisline

1 UVOD

V krmo za živali zaradi povečanja energetske vrednosti krmnih mešanic dodajamo maščobe, predvsem rastlinska olja, ki so bogata tudi z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (VNMK). Še posebej veliko VNMK je v krmnih mešanicah kokoši, ki nesejo obogatena jajca z n-3 VNMK.

Neprimerno skladiščenje z n-3 VNMK obogatenih krmnih mešanic lahko vodi do nastanka produktov oksidacije maščob v krmi kot so lipidni peroksidi, malondialdehid, idr., ki pa so za živali in ljudi toksični. Ker so toksične doze za živali presenetljivo velike (medtem ko človek zavrača hrano že z veliko manjšo stopnjo pokvarjenosti), je potreben reden monitoring takih krmnih mešanic med skladiščenjem s čim bolj preprostimi metodami določevanja oksidacijskih produktov (Frankič in Salobir, 2007).

Lipidno oksidacijo in kvarjenje v krmnih mešanicah lahko vsaj začasno zavremo z dodajanjem antioksidantov. Po priporočilih za rejo kokoši morajo biti maščobe, dodane v krmo, zaščitene z antioksidanti (Nutrient Requirements of Poultry, 1994; Leeson in Summers, 2008). Antioksidanti ščitijo biološko pomembne molekule, ki so tarče prostih radikalov, ki nastajajo v celicah, pred poškodbami. Takšne pojave antioksidanti preprečujejo, ko zadržujejo vstop nastalih prostih radikalov v verižne reakcije, ter tako zavirajo oksidacijo biološko pomembnih molekul (Frankič in Salobir, 2007). Z dodajanjem antioksidantov zato upočasnimo kvarjenje in podaljšamo obstojnost krmnih mešanic, pri tem pa ostaja hranilna vrednost krmnih mešanic velika, ohranijo se barva, vonj in okus (Frankič in Salobir, 2007).

V krmne mešanice že leta dodajamo sintetične antioksidante, kot so BHA, BHT, propilgalat, TBHQ idr., kot tudi sintetične izomere vitaminov, npr. α -tokoferol (biološko najaktivnejša izomera vitamina E), katerih uporaba je zelo razširjena. Zadnja leta se še posebej povečuje interes potrošnikov in posledično prehranske industrije za uporabo fenolnih antioksidantov iz naravnih (rastlinskih) virov, saj naj bi le-ti delovali bolj učinkovito pri oksidativni zaščiti krmnih mešanic z večjo vsebnostjo VNMK in naj bili varnejši za uporabo kot sintetični antioksidanti (Shi in sod., 2001), ki naj bi bili potencialno rakotvorni (Prior, 2004, cit. po Bouaziz in sod., 2008). Zato je dodajanje fenolnih spojin z antioksidativno aktivnostjo krmnim mešanicam za kokoši zelo pomembno.

Zanimiv vir rastlinskih polifenolov so stranski produkti oljčne industrije, ki zajemajo tokoferole, fenolne kisline, flavonoide, stilbene, lignane in sekoiridoidne spojine, ki lahko

delujejo z različnimi mehanizmi proti prostim radikalom in lahko vsaj začasno zadržijo avtooksidacijo skladiščenih krmnih mešanic. Oljčni listi so stranski produkt oljčne industrije, saj zajemajo tudi do 10 % mase strojno nabranega pridelka (Bouaziz in sod., 2008; Soni in sod, 2006). Drugi stranski produkt je oljčna pulpa, ki je mešanica oljčnih tropin in koščic po ekstrakciji oljčnega olja. Oba vira lahko uporabljamo kot dodatka h krmnim mešanicam za kokoši. V zadnjem času sta zanimiva metanolni (mešanica metanola in vode (80:20)) in etanolni (mešanica etanola in vode (80:20)) ekstrakt oljčnih listov in pulpe, ki lahko zelo uspešno zavirata lipidno oksidacijo (Bouaziz in sod., 2008; Lee in sod., 2009).

Prvi namen diplomske naloge je bil ugotoviti potek lipidne oksidacije med shranjevanjem z n-3 VNMK obogatene krme za kokoši nesnice. Drugi namen je bil ugotoviti, kateri od krmnih dodatkov (vitamin E, sintetični antioksidant SANOX, zmleti oljčni listi, oljčna pulpa ter njuna ekstrakta) najučinkoviteje ščiti krmo med shranjevanjem in ugotoviti, ali je po treh mesecih skladiščenja krma še ustrezne kakovosti za prehrano kokoši nesnic. Tretji namen je bil vpeljati in uporabiti enostavnejši metodi za določevanje primarnih in sekundarnih produktov oksidacije krmil, ki nastanejo pri dodajanju lanenega olja.

Delovni hipotezi diplomskega dela sta bili:

- Z dodajanjem različnih krmnih dodatkov z antioksidativnim delovanjem lahko začasno zavremo ali preprečimo oksidativno kvarjenje krmnih mešanic.
- Z dodajanjem oljčnih listov, oljčne pulpe in njunih ekstraktov lahko začasno zavremo oksidativno kvarjenje krmnih mešanic enako učinkovito kot z dodajanjem vitamina E in sintetičnih antioksidantov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KRMNE MEŠANICE ZA KOKOŠI NESNICE

Prehrana ima pri reji kokoši precejšen vpliv na razvoj, zdravstveno stanje, donosnost, proizvodnost in dolgoživost (Salobir, 2004). Zato je pomembno, da poznamo potrebe kokoši po hranilih, ki se skozi celotno obdobje reje spreminjajo. Odvisne so predvsem od starosti, načina reje, temperature okolja in stopnje intenzivnosti nesnosti. Še posebej zaradi slednje imajo kokoši nesnice povečane potrebe po hranilih. Zato jim je treba ponuditi zelo kakovostno krmo, saj se vsaka napaka pri krmljenju odraža v številu znesenih jajc, barvi rumenjaka in kakovosti jajčne lupine (Salobir, 2004).

2.1.1 Osnovna sestava krmnih mešanic

Kokošim nesnicam v času nesnosti (od 18-ega do 80-ega tedna) krmimo popolne krmne mešanice, ki morajo pokriti tako vzdrževalne kot produkcijske potrebe. Običajno so krmne mešanice sestavljene iz (Salobir, 2004):

- 65 - 80 % žit in stranskih proizvodov mlevske industrije (otrobi in krmilne moke),
- 15 - 30 % rastlinskih krmil, bogatih z beljakovinami, predvsem stročnice, ostanki predelave olj (tropine in pogače soje, ogrščice, sončnice, lanu) in škroba (glutenska moka, gluten, krompirjeve beljakovine),
- 1 - 10 % mineralnih krmil (apnenec, fosfati, lupine školjk),
- 0 - 10 % moke iz posušene in zmlete voluminozne krme, npr. lucerne,
- 0 - 8 % rastlinskih olj,
- 0,5 - 2 % premiksov,
- 0 - 5 % ostankov pridelave sladkorja (pesni rezanci, melasa),
- 0 - 5 % krmil živalskega izvora, bogatih z beljakovinami (ribja moka, posneto mleko v prahu),
- 0 - 5 % posebnih krmil, pridobljenih s posebnim tehnološkim procesom (kvas, aminokisliline).

Glede na starost in nesnost moramo ponuditi kokošim ustrezno popolno krmno mešanico. Navadno uporabljamo pri intenzivni reji kokoši trifazni krmni program, ki v posamezni fazi omogoča optimalno preskrbo kokoši s potrebnimi hranili za razvoj in nesnost. Prva faza je v obdobju od 18-ega do 28-ega tedna, kjer se nesnost povečuje (od 2 % naprej) in je količina zauživanja krme manjša, ker kokoši še niso dosegle odrasle telesne mase. Druga faza je v obdobju od 28-ega do 50-ega tedna, ko je nesnost jajc najvišja in je dosežena 90 % nesnost (pri isa brown tudi 95 % nesnost v 28-tem tednu) ter ustrezna masa jajc (60 - 61

g). Tretja faza je od 50-ega tedna naprej pa do konca nesnosti, ko se količina znesenih jajc zmanjšuje in se povečuje dnevna potreba po kalciju (Isa Brown ..., 2011).

Pri reji kokoši nesnic moramo sestaviti takšne krmne mešanice, ki bodo pokrile potrebe za prirejo 60 g težkih jajc. Na dan naj bi nesnice rjavih jajc povprečno zaužile 110 g krmne mešanice, ki pa jo navadno ponudimo po volji, vendar pa je treba vsebnost energije in aminokislin prilagoditi glede na količino zauživanja krmnih mešanic (Nutrient Requirements of Poultry, 1994). Po normativih za rejo kokoši isa brown je treba v času najvišje nesnosti (v drugi fazi krmnega programa) ponuditi kokošim krmno mešanico z 11,5 - 11,7 MJ ME/kg; 17,7 g SB/kg; 7,4 g preb. lizina; 3,9 g preb. metionina/kg; 6,3 g preb. metionina in cistina/kg; 5,1 g preb. treonina/kg; 1,55 g preb. triptofana/kg; 37 - 39 g Ca/kg; 3,80 g P-izkoristljivega/kg in 1,7 g Na/kg (Isa Brown ..., 2010).

Ko sestavljamo krmno mešanico, moramo biti pozorni tudi na njeno teksturo, ki ima zelo velik vpliv na zauživanje. Kot navaja Salobir (2004), kokoši najraje zauživajo krmno mešanico, ki vsebuje 75 - 80 % delcev velikosti 0,5 - 4,0 mm, največ 15 % delcev manjših od 0,5 mm ter največ 10 % delcev večjih od 4,0 mm. Kljub temu pa je najbolj pomembna homogenost krmnih mešanic, saj lahko le s krmljenjem teh omogočimo celostno preskrbo kokoši s potrebnimi hranili.

2.1.2 Obogatitev krmnih mešanic za kokoši nesnice

Z dodajanjem olj, bogatih z VNMK, v krmne mešanice v času nesnosti, spremenimo sestavo jajc, predvsem sestavo maščobnih kislin (MK) v rumenjaku. S tem dobimo t. i. funkcionalna živila. To so živila, ki ugodno vplivajo na eno ali več ciljnih funkcij v telesu, ki izboljšajo zdravstveno stanje in počutje ter znižajo tveganje za nastanek bolezni (Functional foods, 2010).

V prehrani ljudi se priporoča zauživanje VNMK, torej tistih z dvema ali več dvojnimi vezmi, ki jih telo ne more samo sintetizirati in so za ohranjanje zdravja nujno potrebne (esencialne). Potrebne so za pravilno delovanje celičnih membran in služijo kot predstopnja za izgradnjo tkivnih hormonov eikozanoidov. Iz njih nastali prostaglandini, tromboksani in levkotrieni s svojim delovanjem regulirajo kontraktilnost gladkih mišic, permeabilnost kapilar, krvni tlak, zlepljanje trombocitov, vnetne procese in delovanje imunskega sistema (Nutrient Requirements of Poultry, 1994; Connor, 2000; Salobir, 2001).

Ker v sodobni družbi ljudje zaužijejo več n-6 kot n-3 VNMK, pogosto prihaja do širokega razmerja (> 10:1) med tema skupinama MK. Zdravstvene organizacije priporočajo razmerje 5:1 ali ožje (Opinion ..., 2005; WHO/FAO, 2010). Še posebej je priporočljivo

večje zauživanje n-3 VNMK, kot je α -linolenska MK, ki je prekurzor eikozapentaenojske (EPK, C20:5 n-3), in dokozaheksaenojske MK (DHK, C22:5 n-3). Zauživanje je priporočljivo, saj imata EPK in DHK pozitivne učinke pri preprečevanju nastanka kardiovaskularnih bolezni, vnetih in imunskih sprememb v telesu, diabetesa in rakavih tvorbo (Hall in sod., 2006; Fraeye in sod., 2012). Vladne in zdravstvene organizacije priporočajo dnevno zauživanje n-3 VNMK 1,5 g za moške in 1,0 g za ženske. Priporočljiv je tudi vnos 500 mg n-3 VNMK dnevno pri otrocih, saj ta zelo učinkovito pomaga pri razvoju možganov in oči (Opinion ..., 2005; Hall in sod., 2006; Fraeye in sod., 2012).

Vnose n-3 VNMK lahko povečamo z zauživanjem jajc, obogatenih s temi maščobnimi kislinami. Takšna jajca dobimo, če dodamo v krmno mešanico olja, bogata z α -linolensko MK, kot je npr. laneno olje, ki tako predstavlja v krmni mešanici najpomembnejši vir α -linolenske MK (53 % vseh MK v lanenem olju) za nastanek n-3 VNMK (EPK in DHK) v jajčnem rumenjaku (preglednica 1) (Hall in sod., 2006). Prva »Omega jajca« so pridobili strokovnjaki na univerzi Nebraska, ko so kokoši krmili s krmno mešanico z dodatkom lanenega semena (Scheideler, 1998 in 1999, cit. po Hall in sod., 2006). »Omega jajca« naj bi vsebovala okoli 300 mg n-3 VNMK/100 g jajca (Opinion ..., 2005). Kot so navedli raziskovalci v študiji García-Rebollar in sod. (2008), bi bilo treba v krmne mešanice za kokoši dodati okoli 6 g n-3 VNMK/kg krme, da bi lahko dosegli predlagano vsebnost v rumenjaku.

Preglednica 1: Vsebnost maščobnih kislin v jedilnem lanenem olju (Voljč, 2012)

Maščobna kislina	Masni delež (%)
C14:0, miristinska MK	0,04
C15:0	0,02
C16:0, palmitinska MK	5,45
Σ C16:1, palmitoleinska MK	0,10
C17:0	0,06
C18:0, stearinska MK	4,01
Σ C18:1, oleinska MK	17,64
C18:2 n-6, linolna MK	16,09
C18:3 n-3, α-linolenska MK	56,07
C20:0, arahidinska MK	0,14
C20:1 n-9	0,13
C20:3 n-3	0,05
C22:0, behenska MK	0,12
C24:0	0,08
Vsote maščobnih kislin	
Nasičene MK (NMK)	9,92
Enkrat nenasičene MK (ENMK)	17,87
Večkrat nenasičene MK (VNMK)	72,21
n-3 VNMK	56,12
n-6 VNMK	16,09
Razmerje	
n-6/n-3 VNMK	0,29

2.2 OKSIDACIJA LIPIDOV

Oksidacija lipidov je eden primarnih mehanizmov razgradnje bioloških molekul. Lipidi so podvrženi oksidaciji, še posebej nenasičene vezi dolgoverižnih maščobnih kislin, kot so npr. oleinska, linolna in α-linolenska. Večje kot je število dvojnih vezi, večja je možnost oksidacije. Kot posledica oksidacije se tvorijo prosti radikali, ki v končni fazi privedejo do primarnih produktov (peroksidov) in sekundarnih produktov (aldehidov in ketonov) lipidne oksidacije, ki poslabšajo kakovost in okusnost krmnih mešanic ter proizvodov, poleg tega pa imajo mnogo slabih učinkov za zdravje (Skvarča, 2000a; Belitz in sod., 2004; Laguerre in sod., 2007).

Lipidno oksidacijo v krmnih mešanicah imenujemo avtooksidacija. Avtooksidacija je spontana neencimska oksidacija maščob v krmilih, ki so bila izpostavljeni ali svetlobi (še posebej UV-svetlobi) ali toploti ali atmosferskemu kisiku ali pa so v večji meri prisotne kovine (še posebej železovi in bakrovi ioni) (Korošec, 2000; Skvarča, 2000a). Je ireverzibilna radikalska verižna reakcija, ki poteka v lipidih v treh stopnjah: iniciacija, propagacija in terminacija. Potek lipidne oksidacije je že dolgo znan in ga natančno opisuje precej objav (Abram, 1995; Belitz in sod., 2004; Wanasundara in Shahidi, 2005; Laguerre in sod., 2007).

Avtooksidacije ne moremo v celoti preprečiti, lahko pa jo za določen čas zadržimo. Zadrževanje avtooksidacije v krmnih mešanicah je odvisno od sestave in tehnologije izdelave krmnih mešanic, lahko se izključi kisik z vakuumskim pakiranjem ali dodajanjem glukoza oksidaze ali inertnih plinov (vzpostavi se kontrolirana atmosfera), lahko se krmne mešanice shranjujejo pri nizki temperaturi in v temnih prostorih (hlajenje ali zmrzovanje), potek avtooksidacije je odvisen od prisotnosti kovinskih ionov, kot sta cinkov in železov, ter od dodajanja antioksidantov (Skvarča, 2000a; Belitz in sod., 2004).

2.2.1 Produkti lipidne avtooksidacije in metode njihovega določanja

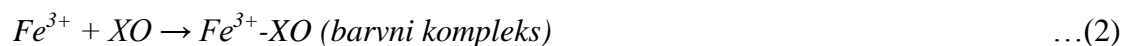
V krmnih mešanicah z dodanimi olji, ki imajo večjo vsebnost VNMK, je nastanek produktov lipidne oksidacije še dodatno pospešen. Krmljenje oksidiranih maščob povzroči spremembe v prebavilih živali. Prihaja do celične proliferacije, razpolovi se življenjska doba enterocitov, opazne so spremembe v mikroflori, slabša je absorpcija hranil in manjša odpornost na patogene mikroorganizme. Posledično prihaja do slabšega prirasta in slabše proizvodnosti, ki vodi do ekonomskih izgub (Dibner in sod., 1996). Zato je pomembno, da določamo količine nastalih oksidativnih produktov že v krmnih mešanicah, saj lahko takoj ocenimo stopnjo pokvarjenosti, zaradi katere se poslabšata okusnost in hranilna vrednost krmnih mešanic ter tako posledično preprečimo njihovo zauživanje.

2.2.1.1 Peroksidi

Peroksidi so primarni produkti oksidacije lipidov. Avtooksidacija VNMK v membranskih fosfolipidih vpliva na nastanek kompleksne mešanice, v kateri so tudi hidroperoksidi, produkti cepljenja vezi in polimeri. Ti vplivajo na razpad celičnih membran. Lipidni hidroperoksidi lahko aktivirajo ali inhibirajo glavne encime (Skvarča, 2000a). Merimo jih s t. i. peroksidnim številom, ki je mera pokvarjenosti oz. ustreznosti (lahko rečemo tudi, da je mera avtooksidacije) krmnih mešanic za zauživanje.

V zadnjih letih se na tem področju uveljavljajo nove tehnike določanja, kot je npr. metoda PeroxiDetect™ kit, ki je izredno hitra metoda v primerjavi z določevanjem peroksidov na klasičen način (modificirano določevanje peroksidnega števila po Wheelerju). Vsebnosti lipidnih peroksidov (LP) navadno podamo glede na standard, s katerim smo instrument kalibrirali, in sicer, če smo kalibrirali s standardno raztopino terc-butil hidroperoksida (t-BuOOH), jih podamo kot ekv. t-BuOOH/g vzorca.

Metoda PeroxiDetect™ kita temelji na dejstvu, da peroksidi oksidirajo Fe^{2+} do Fe^{3+} v kislilnih raztopinah. Potečejo reakcije:



kjer je:

XO = ksilenol rdeče

R = H ali lipidna skupina

Metoda PeroxiDetect™ kit temelji na FOX-metodi (oksidacija Fe^{2+} do Fe^{3+} v kislilnih raztopinah, kjer se tvori barvni kompleks s ksilenom oranžnim) in omogoča hitro analizo vzorcev v razmeroma kratkem času z manjšo porabo reagentov ter posledično manjšo ekološko obremenitvijo (DeLong in sod., 2002; Yildiz in sod., 2003). Poleg tega oprema za določitev koncentracije lipidnih peroksidov (spektrofotometer) ni draga in je dovolj občutljiva za določevanje lipidnih peroksidov pri nizkih koncentracijah, določanje pa lahko poteka ob prisotnosti atmosferskega kisika. Še ena prednost PeroxiDetect™ kita je, da zazna že začetno oksidacijo maščobnih kislin in tako omogoča zaznavanje zgodnje faze oksidacijskega stresa, ki lahko kasneje privede do razvoja bolezni (DeLong in sod., 2002).

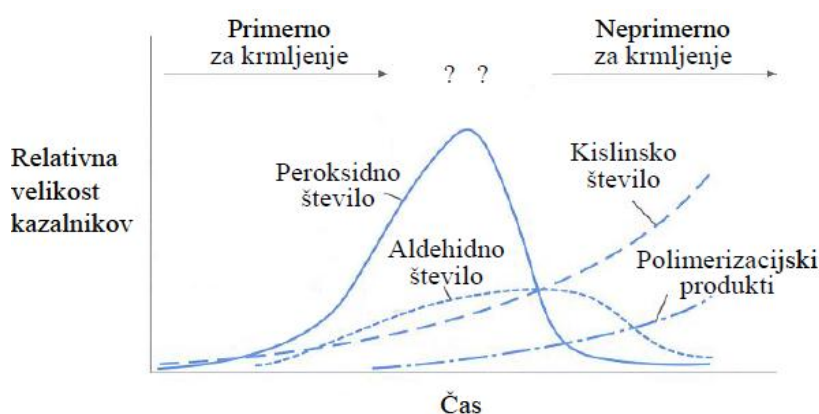
FOX-metoda je bila uspešno vpeljana za določevanje peroksidnega števila jedilnih olj in maščob ter za oceno vsebnosti lipidnih peroksidov v bioloških sistemih (Yildiz in sod., 2003). Poleg tega omogoča določevanje lipidnih peroksidov ne pa tudi proteinskih, saj imajo le-ti kompleksnejšo zgradbo molekul (sekundarno, terciarno ...), ki je za Fe^{2+} ione nedostopna (DeLong in sod., 2002).

2.2.1.2 Malondialdehid

Malondialdehid (MDA) je sekundarni produkt oksidacije VNMK. Uporablja se za ugotavljanje celičnih poškodb (Grotto in sod., 2007). Je toksičen, karcinogen, mutagen, se veže na lipide, beljakovine in nukleinske kisline ter inaktivira ribonukleazo, poleg tega pa

poslabša delovanje imunskega sistema, zato je njegov monitoring v krmi pred krmljenjem živalim ključnega pomena (Frankič in Salobir, 2007). V krvni plazmi je lahko indikator bolezni, kot so ateroskleroza, Alzheimerjeva bolezen in rak (Seljeskog in sod., 2006).

V raziskavah se določa MDA precej pogosteje kot LP in je mera nastalih oksidativnih produktov, saj nastane kot posledica razgradnje lipidnih hidroperoksidov (Esterbauer, 1993) (slika 1). Določamo ga lahko na več načinov, vendar je najpogosteje izbrana spektrofotometrična metoda (TBARS).



Slika 1: Spreminjanje koncentracije nekaterih produktov oksidacijskega kvarjenja maščob (Kirchgessner, 2004, cit. po Frankič in Salobir, 2007: 3)

2.2.2 Oksidacijski stres

Lipidna oksidacija in nastanek kisikovih prostih radikalov sta naravna pojava v bioloških sistemih. Ti so udeleženi pri številnih procesih v telesu. Zelo pomembno je ravnotežje med količino oksidantov in antioksidantov. Neravnotežje med njima v prid oksidantov lahko povzroči bolezni, saj so prosti radikali citotoksični, mutageni, kancerogeni, imajo aterogeni učinek in povzročajo vnetja (Skvarča, 2000a; Laguerre in sod., 2007). Poleg tega imajo pomembno vlogo pri staranju, degenerativnih boleznih, raku, kardiovaskularnih boleznih, aterosklerozi, zmanjšani imunski odzivnosti, Alzheimerjevi, Parkinsonovi in Crohnovi bolezni, sladkorni bolezni, katarakti, bolezni jeter in ledvic, zastrupitvah, fizičnih obremenitvah in v prehrani, v kateri primanjkuje naravnih antioksidantov (vitaminov A, C, E, β -karotena, flavonoidov, itd.), aminokislin (cistina, cisteina, glutationa) ter elementov v sledovih (Se, Zn, Mn, Cu) (Korošec, 2000).

Antioksidanti preprečujejo oksidativni stres z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali s popravilom oksidativno poškodovanih bioloških molekul (Korošec, 2000).

2.3 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so naravne ali sintetične snovi s sposobnostjo preprečevanja in zaviranja nezaželenih oksidativnih sprememb v bioloških molekulah (Salobir, 2000). Njihov namen je preprečevanje oksidacije substratov, pri čemer kot substrate pojmujeemo skoraj vse snovi, ki jih najdemo v hrani in živih tkivih, vključno s proteini, z lipidi, ogljikovi hidrati in DNK (Halliwell in sod., 1995). Te biološko pomembne molekule so tarče prostih radikalov, ki nastajajo v celicah in jih tako poškodujejo. Takšne pojave preprečujejo antioksidanti, ko zadržujejo vstop nastalih prostih radikalov v verižne reakcije, ter tako zavirajo oksidacijo biološko pomembnih molekul (Frankič in Salobir, 2007). Tako se upočasnijo kvarjenje in podaljša obstojnost krmnih mešanic. Pri tem pa ostaja hranilna vrednost krmnih mešanic visoka, ohranijo se barva, vonj in okus (Frankič in Salobir, 2007).

Kot navaja Copen (1994), naj bi bil idealen antioksidant varen za uporabo, ne bi smel imeti neželenega vonja, okusa in barve, delovati bi moral že pri nizkih koncentracijah, njegovo dodajanje h krmnim mešanicam naj bi bilo dokaj enostavno, ostal naj bi stabilen pri toplotni obdelavi in dobavljiv po ugodnih cenah.

2.3.1 Delitve antioksidantov

Antioksidante delimo v tri skupine glede na način delovanja (Madhavi in sod., 1996, cit. po Raspor in sod., 2000):

- **PRIMARNI ANTIOKSIDANTI** – njihova vloga je preprečevanje tvorbe prostih radikalov. Mednje prištevamo snovi, ki lahko reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo avtooksidacije. V to skupino sodijo fenoli (galati in hidrokini), derivati fenolov (BHA, BHT, t-butilhidrokinon, tokoferoli) in drugi primarni antioksidanti (etoksikvin idr.).
- **SEKUNDARNI ANTIOKSIDANTI** – nevtralizirajo novonastale proste radikale in preprečujejo, da bi ti vstopali v verižne reakcije in tvorili nove proste radikale. To so snovi, ki zavirajo avtooksidacijo brez neposrednega vključevanja v verižno reakcijo. Njihova značilnost je, da reagirajo s kovinskimi ioni, so katalizatorji oksidacije, odvzemajo kisik iz medija, razgrajujejo perokside do komponent, ki niso radikali, absorbirajo UV-svetlobo in nenazadnje deaktivirajo aktivni kisik. Ločimo odjemalce kisika (askorbinska kislina, askorbil palmitat, encimi, flavonoidi, izovalerianska kislina, karotenoidi, polifenoli, sulfiti), odjemalce radikalov (flavonoidi, polifenoli, karatenoidi, tokoferoli) in sinergiste (EDTA, estri

citronske kisline, fitinska kislina, citronska kislina, lecitin, polifosfati, vinska kislina).

- **TERCIARNI ANTIOKSIDANTI** – so snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali v strukturi celice (npr. metionin sulfoksid reduktaza).

Antioksidante delimo glede na vir, s katerim pridejo v telo (Papas, 1999, cit. po Salobir, 2000):

- **ENDOGENI ANTIOKSIDANTI** so glutation (GSH) in Se-glutation peroksidaza, Fe-katalaza, NADPH, ubikvinol-10 (reducirani koencim Q₁₀), Mn, Cu, Zn-superoksid dismutaza (SOD), sečna kislina, lipojska kislina, hormoni z antioksidativno aktivnostjo (melatonin, estrogen in drugi), beljakovine, ki vežejo metale, vključno albumin (in na albumin vezani tioli in bilirubin), beljakovine, ki vežejo Fe in Cu (transferin in celuroplazmin).
- **EKSOGENI ANTIOKSIDANTI** so tokoferoli in tokotrienoli (vitamin E), askorbinska kislina (vitamin C), vitamin A in karotenoidi (β -karoten, likopen, lutein idr.), Se in drugi metalni elementi, potrebni za antioksidativne encime, fitokemijske spojine z antioksidacijsko aktivnostjo (flavonoidi, polifenoli), prehranski in drugi dodatki (CoQ₁₀, glutation, lipojska kislina idr.), prehranski antioksidanti (BHA, BHT, propil galat, terciarni butil hidroksi kinon (dovoljen v ZDA), rožmarinov ekstrakt idr.).

Antioksidantom kemijska zgradba nakazuje topnost (Korošec, 2000; Skvarča, 2000b):

- **LIPOFILNI ANTIOKSIDANTI** so umeščeni v celični membrani in preprečujejo lipidno peroksidacijo: koencim Q₁₀, vitamin E (tokoferoli), karotenoidi in retinoidi (prekurzorji vitamina A), kurkumin, lipojska kislina, BHA, BHT, propil galat in TBHQ.
- **HIDROFILNI ANTIOKSIDANTI** so prisotni v krvi in citosolu: vitamin C (askorbinska kislina), glutation in flavonoidi.

2.3.1.1 Princip delovanja primarnih antioksidantov

Fenolni antioksidanti so primarni antioksidanti, ki vstopajo v avtooksidacijo med propagacijsko fazo, ko se njihov vodik veže na reaktivne proste radikale, in tako s

stabilizacijo preprečijo potek verižne reakcije. Fenolni radikal (A^\cdot), ki pri tem nastane, je zelo stabilen in nereaktiven (Belitz in sod., 2004; Wanasundara in Shahidi, 2005).



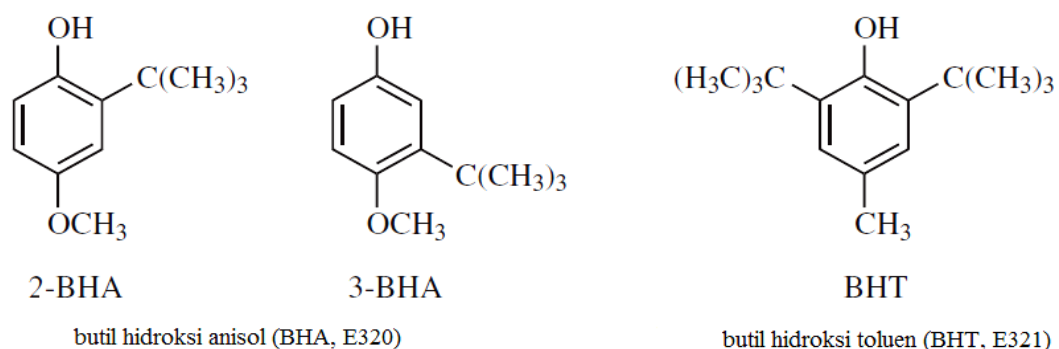
V nadaljevanju radikal antioksidanta donira svoj vodik prostim radikalom (R^\cdot) in peroksilnim radikalom (ROO^\cdot) ter tako tvori relativno stabilne produkte (Belitz in sod., 2004; Wanasundara in Shahidi, 2005).



Molekula antioksidanta lahko tako stabilizira kar dva prosta radikala ter s tem podaljša iniciacijsko fazo lipidne oksidacije (Belitz in sod., 2004; Wanasundara in Shahidi, 2005; Laguerre in sod., 2007), kar je izjemnega pomena za oksidacijsko kvarjenje. Lahko bi tudi rekli, da se antioksidanti tako »žrtvujejo« in s tem podaljšajo obstojnost živil (Salobir, 2000).

2.3.2 Butil hidroksianisol in butil hidroksitoluen

Sintetične antioksidante, kot sta BHA (E320) in BHT (E321), v krmne mešanice navadno dodajamo v količinah od 100 do 200 ppm, če želimo oksidativno stabilizirati olja (Skvarča, 2000b). Sinergistično delovanje BHA in BHT poveča antioksidativno kapaciteto krmnih mešanic, zato jih že nekaj časa dodajamo za stabilizacijo maščob.



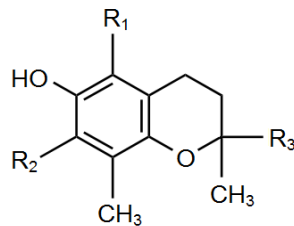
Slika 2: Kemijska struktura BHA in BHT (Wanasundara in Shahidi, 2005: 440)

2.3.3 Vitamin E

Antioksidativna funkcija vitamina E je odvisna tudi od pristnosti drugih molekul (kot sta reducirana glutation in askorbinska kislina) in tudi nekaterih encimov (kot so glutation

peroksidaza, superoksid dismutaza in katalaza), ki pripomorejo k zaščiti celic pred reaktivnimi kisikovimi spojinami. S to funkcijo pomaga vitamin E telesu pri vzpostavitvi ravnotežja med prooksidanti in antioksidanti in tako ščiti organizem pred nastankom bolezni. V primeru pomanjkanja tega vitamina se pojavijo razne degenerativne bolezni, kot so nerazviti embriji, degeneracija mišic in encefalomalacija pri kokoših, pri ljudeh pa rak, katarakta in Parkinsonova bolezen. Zaradi tega spada vitamin E med esencialne vitamine, ki se mu zaradi pozitivnih učinkov na zdravje ljudi in živali posveča posebno pozornost (Machlin, 1991). Veliko vitamina E vsebujejo rastlinska olja, sojine tropine, koruza, bombažno seme, žitni kalčki in oreščki (Machlin, 1991; Rudan-Tasič, 2000; Rezar, 2010).

Preglednica 2: Kemijska struktura tokoferolov in tokotrienolov (Shukla in sod., 1997, cit po. Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000: 83)

	TOKOFEROLI	R ₁	R ₂	R ₃
	α - tokoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₂ [CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂] ₃ H
	β -tokoferol	CH ₃	H	CH ₂ [CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂] ₃ H
	γ -tokoferol	H	CH ₃	CH ₂ [CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂] ₃ H
	σ -tokoferol	H	H	CH ₂ [CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂] ₃ H
	TOKOTRIENOLI	R ₁	R ₂	R ₃
	α -tokotrienol	CH ₃	CH ₃	CH ₂ [CH ₂ CH=C(CH ₃)CH ₂] ₃ H
	β -tokotrienol	CH ₃	H	CH ₂ [CH ₂ CH=C(CH ₃)CH ₂] ₃ H
	γ -tokotrienol	H	CH ₃	CH ₂ [CH ₂ CH=C(CH ₃)CH ₂] ₃ H
	σ -tokotrienol	H	H	CH ₂ [CH ₂ CH=C(CH ₃)CH ₂] ₃ H

Poznamo osem izomer, izoliranih iz rastlinskih virov, ki jih generično imenujemo vitamin E (Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000). Ločimo spojine z nasičeno C₁₆ izopropenoidno verigo (α -, β -, γ - in σ -tokoferoli) ter njim ustrezne spojine z dvojnimi vezmi v stranski verigi (α -, β -, γ - in σ -tokotrienoli) (preglednica 2) (Rudan-Tasič, 2000). Vse omenjene spojine so biološko aktivne in izkazujejo lastnosti antioksidantov (*in vivo* in *in vitro*), ki ščitijo nenasičene maščobne kisline pred oksidacijo. α -tokoferol je biološko najbolj aktivna oblika vitamina E (in zato pogosto kar sinonim za vitamin E) ter v naravi tudi najbolj razširjena. Naravne stereioizomere imenujemo RRR- α -tokoferol, sintetično pridobljene oblike označujemo kot *all-rac*- α -tokoferole (Machlin, 1991; Rudan-Tasič, 2000).

α -tokoferol je zgrajen iz kromanolnega heterocikličnega obroča in fitinske stranske verige. V celični membrani je kromanolni obroč umeščen na polarni površini membrane, medtem ko je fitinska stranska veriga usmerjena v nepolaro sredino membrane, kjer reagira z VNМК membranskih fosfolipidov, kar je osnova antioksidativnega delovanja α -tokoferola

(Machlin, 1991). Posebnost α -tokoferola je v tem, da deluje kot antioksidant šele v *in vivo* sistemih, kjer deluje proti prostim radikalom in se veže s superoksidnim radikalom in kisikom ter tako onemogoča verižno reakcijo (propagacijo) nastajanja prostih radikalov in posledično zavira lipidno peroksidacijo v gastrointestinalnem traktu (Machlin, 1991; Muggli, 1994). Poleg tega se lahko v večjih količinah nalaga v jajcih (Botsoglou in sod., 2012b) ter tako preprečuje lipidno peroksidacijo v živalskih proizvodih in podaljša njihovo obstojnost pri shranjevanju.

Kokošim nesnicam dodajamo v krmne mešanice s premiksom najmanj 10 IU vitamina E/kg, da zadostimo njihovim osnovnim potrebam (Nutrient Requirements of Poultry, 1994). Po novejših priporočilih za rejo kokoši nesnic (Isa Brown ..., 2011) se priporoča večja vsebnost, in sicer naj bi krmni mešanici dodali 25 IU vitamina E/kg krmne mešanice.

Dodajanje naravnih ali sintetičnih oblik antioksidantov v krmne mešanice z veliko vsebnostjo VNMK je nujno potrebno, saj le dovolj velika količina antioksidantov preprečuje lipidno peroksidacijo. Če se vsebnost VNMK povečuje, se mora povečati tudi dodatek antioksidantov v krmni mešanici. Tako se potrebe po vitaminu E zaradi dodatka rastlinskih olj, bogatih z VNMK, povečujejo v odvisnosti od vsebnosti MK z večjim številom dvojnih vezi (preglednica 3) (Muggli, 1994).

Preglednica 3: Povečanje potreb po vitaminu E, kot posledica zauživanja VNMK (mg vitamina E/g VNMK) (Muggli, 1994: 167)

Število dvojnih vezi	Maščobna kislina	Oznaka	Potrebe po vitaminu E (mg dl- α -tokoferol acetata/g VNMK)
1	Oleinska kislina	C18:1 n-9	0,13
2	Linolna kislina	C18:2 n-6	0,89
3	γ -linolenska kislina	C18:3 n-6	1,34
3	α -linolenska kislina	C18:3 n-3	1,34
4	Arahidonska kislina	C20:4 n-6	1,79
5	Eikozapentaenojska (EPK)	C20:5 n-3	2,24
6	Dokozaheksaenojska (DHK)	C22:6 n-3	2,68

V krmne mešanice ni treba vključevati vitamina C, ki ima prav tako visoko antioksidativno aktivnost, saj so kokoši same sposobne v zadostnih količinah sintetizirati askorbinsko kislino v sredici nadledvične žleze (Korošec, 2000; Yegani in sod., 2001). Askorbinska kislina deluje kot sekundarni antioksidant v ekstracelularnih tekočinah. Ima veliko sposobnost nevtralizacije singletnega kisika, hidroksilnih in superoksidnih anionskih

radikalov ter lahko deluje sinergistično s primarnimi antioksidanti in jih regenerira v aktivno obliko (kot npr. tokoferol) (Wanasundara in Shahidi, 2005).

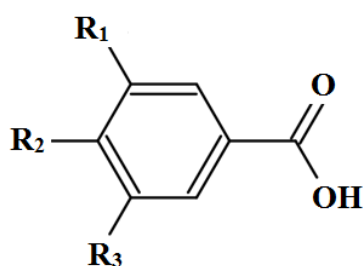
2.3.4 Rastlinski polifenoli

Polifenoli obsegajo zelo veliko skupino (več tisoč) rastlinskih sekundarnih metabolitov, ki v višjih rastlinah tvorijo obrambo pred UV-sevanjem in patogenimi mikroorganizmi. V literaturi lahko pogosto najdemo tudi izraze, kot so fenolne spojine, rastlinski fenoli ali biofenoli. Kot fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več OH-skupin, vezanih neposredno na aromatski obroč (Abram, 2000). Glede na funkcijo aromatskih obročev in njihovo število ter strukturo elementov vezanih nanje poznamo fenolne kisline, flavonoide, stilbene in lignane (slika 3) (Manach in sod., 2004).

Fenolne kisline delimo na hidroksibenzojske in hidroksicimetne kisline. Galna in protokatehulna kislina spadata med hidroksibenzojske kisline. *p*-kumarinska, kavna, vanilinska, ferulna, sinapinska kislina in verbaskozid spadajo med hidroksicimetne kisline (Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000; Manach in sod., 2004).

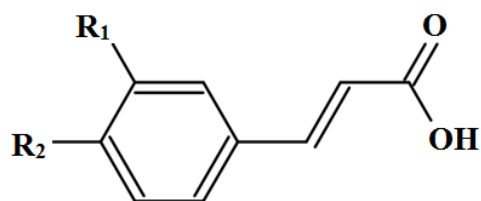
Flavonoidi so največja skupina polifenolov. Poznamo več kot 5000 različnih flavonoidov. Sestavljeni so iz dveh aromatskih obročev, ki sta povezana s tremi C-atomi in tako tvorita oksigenirani heterocikel (Manach in sod., 2004). V naravi so flavonoidi običajno glikozilirani, kar pomeni, da imajo vezane različne monosaharide (glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza) ali pa tudi daljše verige v obroč. Največkrat je sladkor vezan na C₃, lahko tudi na C₅- ali C₇-atom. Nesladkorni del molekule imenujemo aglikon (Abram, 2000). Poznanih je šest podvrst: flavonoli (kempferol, kvercetin, miricetin), flavoni (apigenin, luteolin), flavanoni (narongenin, eriodictol, hesperetin), flavanoli (katehini, galokatehini), antocianidini (pelargonidin, cianidin, definidin, petunidin, malvin) in izoflavoni (diadzein, genistein). Razlike v delovanju so odvisne od kemijske ureditve hidroksilne skupine in njihove alkalilnosti ter glikozilacije. Kvercetin, miricetin in katehini so najbolj pogosti flavonoidi (Manach in sod., 2004).

Stilbeni so sestavljeni iz dveh fenilnih delov, ki sta povezana z ogljikovim mostom iz dveh C-atomov. Najbolj raziskan stilben je resveratrol, ki ima antikancerogeno funkcijo (Manach in sod., 2004).

Hidroksibenzojske kisline

$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$: Protokatehulna kislina

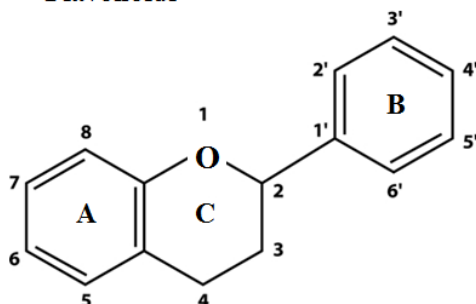
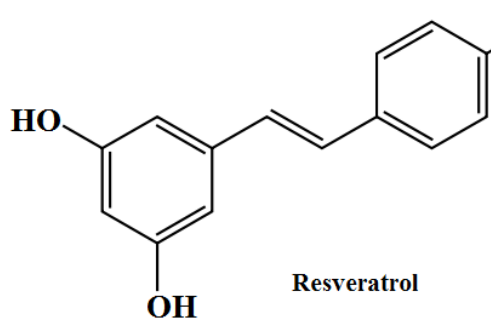
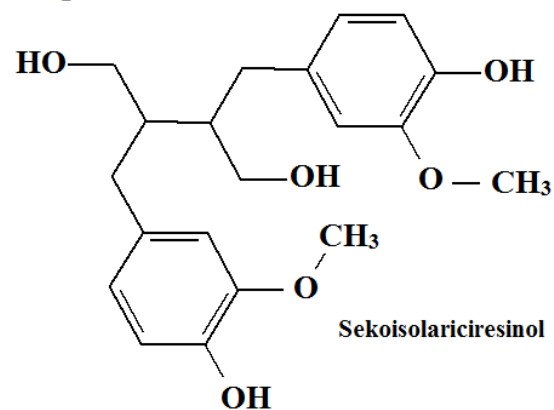
$R_1 = R_2 = R_3$: Galna kislina

Hidroksicimetne kisline

$R_1 = \text{OH}$: Kumarična kislina

$R_1 = R_2 = \text{OH}$: Kavna kislina

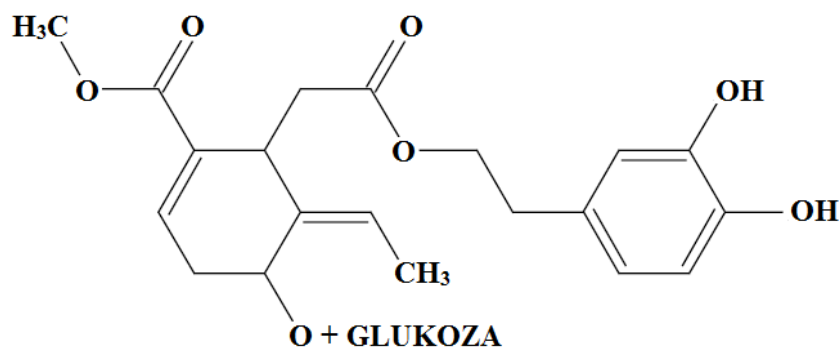
$R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$: Ferulna kislina

Flavonoidi**Stilbeni****Lignani**

Slika 3: Kemijske strukture fenolnih spojin (Manach in sod., 2004: 728)

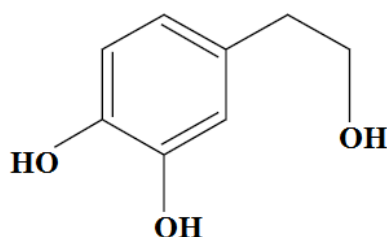
Polifenoli so polarne sestavine oljčnega olja v nizkih koncentracijah in so »dodana vrednost«, ki oljčnemu olju prispeva žlahtnost in okus. K tem uvrščamo lignane (pinorenizol), flavonoide (luteolin in apigenin) ter sekoiridoide (oleuropein in listrozid). Vendar pa je njihov nastanek preko biosintetskih reakcij odvisen od več dejavnikov: klime, padavin, prsti, zrelosti plodov in vrste (Vesel in sod., 2009).

V oljki lahko rastlinske fenole najdemo v vseh delih drevesa (oljčni brstiči, listje in plodovi), vendar pa njihova vsebnost variira med različnimi tkivi. Najštevilčnejši in najznačilnejši polifenoli v vrsti *Olea europaea L.* so polifenoli izoprenoidnega tipa - sekoiridoidi (Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000; Vesel in sod., 2009). Pogosto jih najdemo tudi v družinah *Gentianaceae* in *Cornaleae*. Iridoidi in sekoiridoidi so pogosto glikozidno vezani in nastanejo iz sekundarnega metabolizma terpenov (sestavina eteričnih olj in smol) kot prekurzorja indol alkaloidov (metabolitov s heterociklično strukturo in z grenkim okusom, so strupeni). Sicer pa sekoiridoidi družine *Oleaceae* spadajo v skupino fenolnih oleozidov, ki imajo značilno eksociklično dvojno vez na položaju 8 in 9. Predstavniki so olevropein, dimetilolevropein, ligstrozid in oleozid (Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000; Syed Haris, 2010).



Slika 4: Kemijska struktura olevropeina – $C_{25}H_{32}O_{13}$ (Soni in sod., 2006: 905)

Olevropein je glikozid, spojina hidroksitirozolnega estra elenolne kisline z β -D-glukopiranozo (slika 4) (Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000). Najdemo ga v lubju, listih in sadežih oljk družine *Oleaceae* (Soni in sod, 2006). Odkrila sta ga Bourquelot in Vintilesco že leta 1908. Znan je po tem, da ima antimikrobno aktivnost proti virusom, retrovirusom, bakterijam, plesnim, kvasovkam in drugim parazitom (Benavente-García in sod., 2000). V telesu ima vlogo antioksidanta, deluje protivnetno, antiaterogeno (znižuje holesterol), antikancerogeno in antimikrobno (Cardoso in sod., 2005; Syed Haris, 2010). Njegova antioksidativna funkcija je posledica hidroksitirozola kot sestavnega dela njegove molekule (Benavente-García in sod., 2000). Koncentracija olevropeina niha skozi letni čas in je v plodovih najvišja na prehodu pomladi v poletje. Z zorenjem in kasneje s skladiščenjem plodov oljk koncentracija olevropeina upada zaradi razgradnje, pri kateri nastaneta elenolna kislina in hidroksitirozol. Podobno je pri ligstrozidu, kjer namesto hidroksitirozola nastane tirozol (Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000; Vesel in sod., 2009).



Slika 5: Kemijska struktura hidroksitirozola – $C_8H_{10}O_3$ (Soni in sod., 2006: 905)

Hidroksitirozol (3,4-dihidroksitirozol) je glavna komponenta oljčnega ekstrakta in oljčnega olja. Čisti hidroksitirozol je brezbarvna tekočina brez okusa, ki je topna v vodi in maščobi (slika 5) (Soni in sod., 2006). Iz hidroksitirozola se lahko ob prisotnosti elenojske kisline tvori olevopein in obratno (Soni in sod., 2006). Njegova absorpcija v tankem črevesju naj bi bila zelo visoka (celo popolna), kot so dokazali z jemanjem krvi in urina ljudem in podganam po zaužitju te substance z oljčnim oljem (Caruso in sod., 2001, cit. po Soni in sod., 2006). Poleg tega ima veliko pozitivnih učinkov na zdravje ljudi, saj preprečuje in vitro oksidacijo LDL-holesterola (Grignaffini in sod., 1994, cit. po Soni in sod., 2006), zlepljanje trombocitov (Petroni in sod., 1995, cit. po Soni in sod., 2006), deluje protivnetno (Kohyama in sod., 1997, cit. po Soni in sod., 2006) in učinkovito zavira verižne reakcije prostih radikalov (Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000).

Zaradi ugodnih učinkov na zdravje, kot je zaščita LDL-holesterola pred oksidacijskimi poškodbami, EFSA (European Food Safety Authority) priporoča dnevno zauživanje 5 mg hidroksitirozola in njegovih derivatov z oljčnim oljem. To količino lahko zaužijemo dnevno z uravnoteženo prehrano (EFSA, 2011). Fenolne spojine lahko najdemo tudi v stanskih produktih oljčne industrije kot npr. v odpadni vodi (voda, ki nastane pri predelavi oljk, tj. voda, ki se izcedi iz plodov in voda, ki se dodaja v različnih fazah predelave za doseganje boljšega izločanja olja), v listih, v oljčni pulpi in nujnih ekstraktih (Bandelj Mavsar in sod., 2008).

Sestava ekstraktov oljčnih listov in pulpe je odvisna od kultivarja oljk, vremenskih pogojev pri katerih so bile gojene, od topila za ekstrakcijo in načina določanja posameznih fenolnih spojin. Pri ekstraktu oljčne pulpe je pomemben dejavnik tudi stopnja predhodne maceracije oljčnih tropin (Cardoso in sod., 2005).

2.3.4.1 Oljčni listi

Oljčni listi so bili že v zgodovini več tisočletij zelo pogosto uporabljani v ljudski medicini, in sicer kot sredstvo za preprečevanje visoke telesne temperature in celo malarije ter

mnogih drugih boleznih. Oljčni proizvodi (predvsem oljčno olje) so primarni vir fenolnih snovi v mediteranski prehrani (Lee in sod., 2009). Najpogosteje uporabljani so listi vrste *Olea europaea L.*, ki so podolgovati, srebrne barve in merijo 4-10 cm v dolžino ter 1-3 cm v širino. Oljčni listi v oljčni industriji veljajo kot stranski produkt, ki ga odstranijo z rešetko ali vpihavanjem zraka (Bandelj Mavsar in sod., 2008). Kot navajajo Bouaziz in sod. (2008) zajema količina oljčnih listov kar 10 % celotne mase strojno nabranih pridelkov v nasadih. Oljčne liste včasih naberejo v velikih količinah, tudi do 25 kg na drevo (Sansoucy, 1985).

Preglednica 4: Kemijska sestava svežih in na zraku posušenih oljčnih listov (Sansoucy, 1985)

	Sveži listi	Na zraku posušeni listi
Suha snov (%)	50-58	95
Organska snov (% SS)	95	95
Surove beljakovine (% SS)	11-13	7-11
Surove maščobe (% SS)	7	5
Surova vlaknina (% SS)	15-18	13-23
NDV (% SS)	47	40-45
KDV (% SS)	28	28-35
KDV (% SS)	18	18

NDV - v nevtralnem detergentu netopna vlaknina, KDV - v kislem detergentu netopna vlaknina, KDL - v kislem detergentu netopen lignin

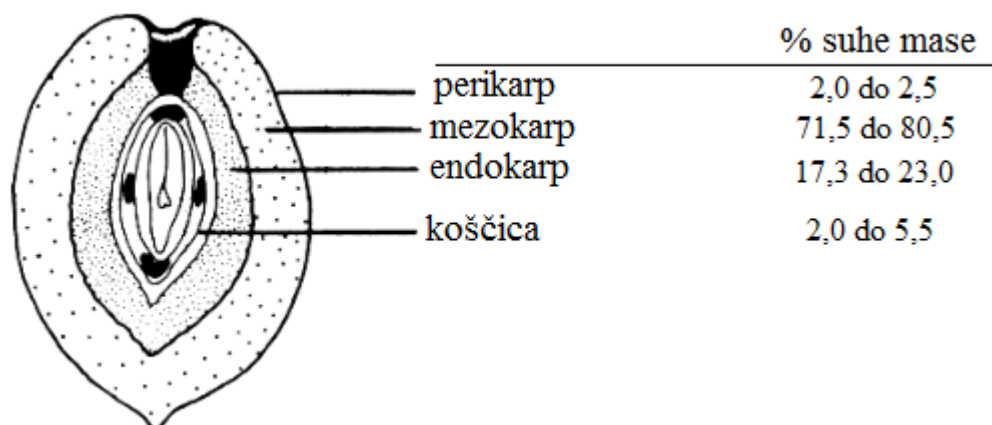
Oljčni listi so učinkoviti pri preprečevanju nekaterih tumorskih tvorb kot na primer v jetrih, na prostati, na kolonu, na koži in pri raku na dojkah. Več študij je dokazalo, da imajo oljčni listi sposobnost nižanja krvnega pritiska, povečanja pretoka krvi v koronarnih arterijah in delujejo antioksidativno, antimikrobno, fungicidno ter preprečujejo nastanek mikoplazme (Lee in sod., 2009; Botsoglou in sod., 2012b). Poleg sekoiridoidov (oleuropeina, hidroksitirozola in tirozola) so v oljčnih listih prisotni tudi tokoferoli, karotenoidi, flavonoidi (rutin, luteolin, apigenin) in fenolne kisline (verbaskozid, *p*-kumarinska, kavna, vanilinska kislina) (preglednica 5) (Bouaziz in sod., 2008; Lee in sod., 2009; Botsoglou in sod., 2012a).

Preglednica 5: Povprečna koncentracija fenolnih spojin v oljčnih listih (Botsoglou in sod., 2012a: 4)

Fenolna spojina	Povprečna koncentracija (mg/g suhih listov)
Rutin	0,18 ± 0,04
Verbaskozid	0,32 ± 0,06
Luteolin-7-glukozid	0,98 ± 0,11
Apigenin-7-glukozid	0,29 ± 0,11
Luteolin-4-glukozid	0,66 ± 0,08
Olevropein	13,43 ± 0,24
Luteolin	0,41 ± 0,07

2.3.4.2 Oljčna pulpa

Pridobivanje oljčnega olja se prične s pripravo oljčne drozge. To pridobimo z mletjem, drobljenjem in mesenjem plodov. Iz oljčne drozge s stiskanjem nastanejo oljčni mošt in oljčna pulpa (tropine). Iz prvega nastane oljčno olje, ki je primarni produkt stiskanja plodov, in odpadna voda. Oljčna pulpa (tropine) je sestavljena iz zmletih koščic (endokarpa), mesa ali pulpe (mezokarpa) in kože (perikarpa) plodov (Sansoucy, 1985; Bandelj Mavsar in sod., 2008) (slika 6). Količina vlage in olja v oljčni pulpi je odvisna od načina stiskanja plodov. Ločimo tradicionalni, dvo-, dvoinpol- in trifazni sistem predelave. Pri tradicionalni in trifazni predelavi dobimo suhe tropine z nizko vsebnostjo vlage (27,29 %) in malo večjim deležem olja (10,52 %), medtem ko dobimo pri dvo- in dvoinpol fazni predelavi zelo vlažne tropine (do 65,03 %) z nizko vsebnostjo olja (okoli 5 %) (preglednica 6) (Bandelj Mavsar in sod., 2008).



Slika 6: Prerez ploda oljke (Nefzaoui, 1983, cit. po Sansoucy, 1985)

Preglednica 6: Kemijska sestava oljčnih pogač in tropin (Sansoucy, 1985)

	Oljčne pogače	Oljčne tropine
Suha snov (%)	75-80	85-90
Surovi pepel (% SS)	3-5	7-10
Surove beljakovine (% SS)	5-10	8-10
Surove maščobe (% SS)	8-15	4-6
Surova vlaknina (% SS)	35-50	35-40

2.3.4.3 Ekstrakta oljčnih listov in pulpe

Pridobivanje uporabnih biološko aktivnih fenolnih spojin iz rastlinskih materialov poteka preko ekstrakcije. Lahko jih ekstrahiramo iz svežih, zamrznjenih ali posušenih rastlin. Zaradi večje učinkovitosti pri ekstrahiranju rastline navadno najprej posušimo ali liofiliziramo, nato pa zmeljemo ali kako drugače homogeniziramo. Splošno znano je, da je učinkovitost ekstrakcije odvisna od vrste topila in njegove polarnosti, časa in temperature ekstrakcije. Prav tako pa je odvisna tudi od kemijskih in fizikalnih lastnosti rastlinskih polifenolov, ki jih želimo ekstrahirati. Ker se fenoli v bioloških sistemih radi povezujejo tudi z drugimi molekulami (kot so ogljikovi hidrati, amini, lipidi in tudi drugi fenoli), za njihovo ekstrakcijo ni določenega univerzalnega ekstrakcijskega postopka (Manach in sod., 2004; Dai in sod., 2010).

Za določanje fenolnih spojin v rastlinah se uporablja več znanih metod, kot so Folin-Denisova metoda, Folin-Ciocalteau metoda, permanganatna titracija, kolorimetrija z železovimi solmi in metoda merjenja UV-absorbance (Dai in sod., 2010).

Oljčne liste lahko ekstrahiramo z različnimi topili. Tako so Lee in sod. (2009) primerjali antioksidativno aktivnost 80 % etanolega ekstrakta oljčnih listov in njegovih različnih frakcij (heksanske, kloroformske, etilacetatne, butanolne in vodne). Največjo antioksidativno aktivnost so določili v osnovnem, 80 % etanolnem ekstraktu. Glavna fenolna spojina vseh ekstraktov oljčnih listov je olevropein (preglednica 7) (Benavente-García in sod., 2000).

Benavente-García in sod. (2000) so pri analizi ekstrakta oljčnih listov s HPLC odkrili prisotne:

- olevropeozidne spojine, kot sta olevropein in verbaskozidi,
- flavonoidne spojine, kot so luteolin, luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin, diosmetin-7-glukozid in rutin,
- flavanolne spojine, kot so katehini,
- substituirane fenolne spojine, kot so tirozol, hidroksitirozol, vanilin, vanilinska in kavna kislina.

Vse zgoraj naštetje fenolne spojine delujejo sinergistično pri odstranjevanju prostih radikalov. Kljub temu so nekatere bolj učinkovite kot druge. Od najbolj do najmanj učinkovite si sledijo v naslednjem zaporedju: rutin > katehin in luteolin > hidroksitirozol > diosmetin > kavna kislina > verbaskozidi > olevropein > luteolin-7-glikozid, vanilinska kislina in diosmetin-7-glukoza > apigenin-7-glukozid > tirozol > vanilin. Skupno imajo te spojine v oljčnih listih večjo antioksidativno aktivnost kot vitamina E in C, zaradi sinergističnega delovanja polifenolov (Benavente-García in sod., 2000).

Cardoso in sod. (2005) so analizirali 50 % metanolni ekstrakt liofilizirane oljčne pulpe, ki je vsebovala tudi zmlete koščice. Glavne fenolne spojine, ki so jih določili v oljčni pulpi, razen tirozola, hidroksitirozola in vanilne kisline, ki jih ni bilo mogoče zaznati, in so navadno tudi prisotne v oljčni pulpi, so navedene v spodnji preglednici (preglednica 7). Za oljčno pulpo je značilna velika vsebnost oleozida, ki je prekurzor sekoiridoidnih glikozidov, kot je olevropein (Syed Haris, 2010).

Preglednica 7: Glavne identificirane fenolne spojine v 80 % etanolnem ekstraktu oljčnih listov (mg/100 g) po Lee in sod. (2009: 6110) in v 50 % metanolnem ekstraktu oljčne pulpe (mg/100 g) po Cardoso in sod. (2005: 30)

Fenolna spojina	Ekstrakt oljčnih listov po	Ekstrakt oljčne pulpe po
	Lee in sod. (2009) (mg/100 g)	Cardoso in sod. (2005) (mg/100 g)
Hidroksitirozol-1- β -glukozid		640 \pm 40
Kavna kislina	0,31 \pm 0,01	10 \pm 1
Vanilin	0,66 \pm 0,05	
Oleozid		3160 \pm 790
Rutin	1,38 \pm 0,01	73 \pm 3
Luteolin-7-rutinozid		100 \pm 1
Luteolin-glukozid + verbaskozid		200 \pm 10
Luteolin-7-rutinozid (izomera)		41 \pm 3
Luteolin-4-glukozid		37 \pm 3
6- β -glukopiranozidni oleozid		660 \pm 20
Olevropein	102,11 \pm 0,02	270 \pm 14
6- β -rahmnopiranozidni oleozid		380 \pm 20

Ekstrakt oljčnih listov ima pozitiven učinek na zmanjšanje možnosti za infarkt, pojavitev možganskega edema, izboljša prekrvavljenost možganske opne ter preprečuje pojavitev kapi. Pri živalih pa lahko dodatek ekstrakta oljčnih listov zmanjša krvni pritisk (Samuelsson, 1991, cit. po Benavente-García in sod., 2000), poveča pretok arterijske krvi (Zaruelo, 1991, cit. po Benavente-García in sod., 2000), lajša aritmijo in preprečuje nastanek trebušnih krčev (Benavente-García in sod., 2000).

2.4 STABILNOST KRMNIH MEŠANIC ZA ŽIVALI

Do sedaj ni bilo narejenih veliko raziskav o stabilnosti krmnih mešanic za živali. V literaturi nismo zasledili nobene raziskave, ki bi opisovala učinke stranskih produktov oljčne industrije na stabilnost krmnih mešanic. Bilo pa je narejenih kar nekaj raziskav vpliva teh dodatkov na oksidativno stabilnost živalskih proizvodov pri shranjevanju. Tako so najpogosteje proučevali oksidativno stabilnost VNМК in antioksidativno aktivnost fenolnih spojin v živalskih proizvodih (meso, jajca, mleko).

Bautista-Teruel in Subosa (1999) sta proučevali stabilnost krme za kozice *Penaeus modnon*, ki je bila bogata z VNМК. V krmo sta dodali 0,5 g BHT/kg krme. Krmo z in brez dodatka BHT sta shranili pri temperaturi 10 °C, 20 °C, 28 °C, - 30 °C, 40 °C 10 tednov.

Največ prostih MK, ki nastanejo kot posledica slabe zaščite olja z antioksidanti in posledično njegove slabše stabilnosti, je nastalo pri krmi brez BHT pri 40 °C (8,4 mg prostih maščobnih kislin/kg maščobe). Koncentracija peroksidov je nihala med 2,2 in 7,4 mmol/kg maščobe (znotraj dovoljenih mej) ne glede na dodatek BHT. Koncentracija MDA je bila najmanjša v krmi, ki je bila shranjena pri 10 °C z dodatkom BHT. Pri 60-dnevem krmljenju te krme se je v primerjavi s krmo, shranjeno pri 40 °C brez dodatka BHT, povečala povprečna masa kozic za 32,4 %, hkrati pa se je statistično značilno povečala tudi njihova preživitvena sposobnost.

Njobeh in sod. (2006) so proučevali stabilnost krme za pitovne piščance pri različnih temperaturah in zračni vlažnosti (pri 15 °C in 50 % vlažnosti, pri 15 °C in 80 % vlažnosti, pri 30 °C in 50 % vlažnosti in pri 30 °C in 80 % vlažnosti). Shranili so dve krmni mešanici, in sicer prvo z manjšo (3,4 % maščobe) in drugo z večjo vsebnostjo maščobe (4,9 % maščobe). Obema krmnima mešanicama so dodali inhibitor plesni in antioksidant Banox E (mešanica BHA, BHT, propil galata, etoksikvina in citronske kisline) v razmerju 1:3 in jo shranili za 60 dni v 50 kg vreče pri različnih pogojih. Vsebnost prostih MK se je statistično značilno povečala v obeh krmnih mešanicah, pri čemer se je najbolj povečala pri shranjevanju pri 30 °C in 80 % vlažnosti, torej pri višji temperaturi in vlažnosti. Vsebnost peroksidov je bila statistično značilno večja v krmnih mešanicah brez dodanega inhibitorja plesni in antioksidanta Banox E, manjša pa v krmnih mešanicah z dodatkom, ne glede na temperaturo in vlažnost.

Botsoglou in sod. (2012b) so proučevali vpliv dodatka oljčnih listov (10 g/kg krme) in α -tokoferil acetata (200 mg/kg krme) na potek lipidne peroksidacije v jajcih pri shranjevanju 60 dni v hladilniku pri 4 °C. 72 lohmann brown kokoši so 33 dni krmili po volji s krmno mešanico z dodatkom 3 % ribjega olja. Jajca so pobirali po 28-ih dneh krmljenja s poskusno krmo. Dodatek oljčnih listov in α -tokoferil acetata v krmne mešanice nista imela vpliva na maščobnokislinsko sestavo rumenjaka in vsebnost MDA v svežih jajcih, sta pa statistično značilno zavrta nastanek lipidnih peroksidov (LP), katerih manjša vsebnost je bila najbrž posledica pretvorbe primarnih oksidacijskih produktov v sekundarne. Po 60-dnevem shranjevanju se je maščobnokislinska sestava najbolj spremenila pri kontrolni skupini, kjer so izmerili do 8,9 % manjšo koncentracijo VNMK predvsem na račun zmanjšanja vsebnosti linolne in DHK ter povečanja ENMK in NMK na račun povečanja oleinske MK. Medtem pri 60 dni shranjenih jajcih kokoši, ki so dobivale v krmne mešanice dodatek oljčnih listov in α -tokoferil acetata, ni prišlo do statistično značilnih sprememb v maščobnokislinski sestavi, se pa je pri dodatku α -tokoferil acetata povečala vsebnost n-6 VNMK na račun DHK in zmanjšala vsebnost oleinske MK. Vsebnost LP in MDA je bila

pri 60 dni shranjenih jajcih kokoši, krmljenih z dodatkom oljčnih listov in α -tokoferil acetata, statistično značilno manjša. Vsebnost MDA je bila proti 60-em dnevom shranjevanja statistično značilno manjša pri dodatku α -tokoferil acetata v primerjavi z dodatkom oljčnih listov. Dokazali so, da so n-3 VNMK v jajcih delno zaščitene pred oksidativnim kvarjenjem z dodatkom oljčnih listov in v celoti z dodatkom α -tokoferil acetata. Poleg tega so ugotovili tudi, da 28 tedensko shranjevanje posušenih oljčnih listov pri 20 °C le malo zmanjša vsebnost fenolov v primerjavi s shranjevanjem pri drugih temperaturah in časovnih obdobjih.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Poskus ugotavljanja oksidativne stabilnosti z n-3 obogatenih krmnih mešanic za kokoši nesnice s šestimi različnimi dodatki (sintetični antioksidant SANOX, vitamin E, zmleti oljčni listi, oljčna pulpa in njuna ekstrakta) smo opravili na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete. Poskus smo pričeli 9. 3. 2012 in ga končali 15. 6. 2012.

Na začetku poskusa smo odvzeli vzorec krmne mešanice vsake skupine in ga, dobro zaprtega v plastičnih vrečkah, takoj shranili pri temperaturi - 70 °C (sveža krmna mešanica, čas shranjevanja = 0). Vzorce sedmih krmnih mešanic smo shranjevali tri mesece pri sobni temperaturi. Shranjevali smo jih v plastičnih posodah s priprtim pokrovom pri sobni temperaturi (20 ± 5 °C), kjer ni bilo nadzorovane atmosfere in je bil dostop kisika do vzorcev zmeraj omogočen. Vsak teden v času trajanja poskusa smo odvzeli alikvot vsake krmne mešanice. Alikvot smo nato takoj shranili pri temperaturi - 70 °C v zaprte plastične vrečke do analize. Zaradi velikega števila odvzetih alikvotov, smo nato analizirali 11 izbranih serij vsake krme mešanice.

Osnovna krmna mešanica KONT in premiks sta bila sestavljena po normativu za rejo kokoši isa brown (Isa Brown ..., 2011), razen za vitamin E, ki smo ga dodali po priporočilih NRC (Nutrient Requirements of Poultry, 1994) 10 IU. V krmne mešanice smo dodali 6 % lanenega olja, kot vir maščob in n-3 VNMK (preglednica 1). Laneno olje je vsebovalo največji delež α -linolenske MK (56,07 %). Poleg tega smo krmnim mešanicam dodali sintetični antioksidant SANOX, vitamin E, posušene oljčne liste, oljčno pulpo in njuna ekstrakta, kot sledi:

- KONT - kontrolna krmna mešanica,
- K+SAN - kontrolna krmna mešanica z dodatkom 200 mg sintetičnega antioksidanta SANOX/ kg krmne mešanice,
- K+VITE - kontrolna krmna mešanica z dodatkom 150 IU dl- α -tokoferol acetata,
- K+OL - kontrolna krmna mešanica z dodatkom 1 % posušeni zmleti oljčni listov,
- K+EOL - kontrolna krmna mešanica z dodatkom etanolnega ekstrakta iz ekvivalentne količine v krmo dodanih (10 g/kg krme) oljčnih listov,
- K+PU - kontrolna krmna mešanica z dodatkom 1 % liofilizirane oljčne pulpe,
- K+EPU - kontrolna krmna mešanica z dodatkom etanolnega ekstrakta iz ekvivalentne količine v krmo dodane (10 g/kg krme) liofilizirane oljčne pulpe.

Preglednica 8: Sestava krmnih mešanic

	KONT	K+SAN	K+VITE	K+OL	K+EOL	K+PU	K+EPU
Koruza (8 % SB), %	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00
Pšenica, %	25,25	25,25	25,25	25,25	25,25	25,25	25,25
Sončnične tropine (37 % SB), %	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Sojine tropine (45 % SB), %	20,78	20,78	20,78	20,78	20,78	20,78	20,78
Laneno olje, %	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Pšenični škrob, %	1,00	1,00	1,00	-	0,99	-	0,99
Monodikalcijev fosfat, %	1,51	1,51	1,51	1,51	1,51	1,51	1,51
Sol, %	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
Apnenec, %	5,68	5,68	5,68	5,68	5,68	5,68	5,68
Grobi kalcit, %	5,69	5,69	5,69	5,69	5,69	5,69	5,69
Lizin, %	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Metionin, %	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Barvilo Capsantal 30, %	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Premiks *, %	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Vitamin E, IE	10	10	150	10	10	10	10
Oljčni listi, %	-	-	-	1,00	-	-	-
Ekstrakt oljčnih listov, %	-	-	-	-	0,01	-	-
Oljčna pulpa, %	-	-	-	-	-	1,00	-
Ekstrakt oljčne pulpe, %	-	-	-	-	-	-	0,01

Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.

*Premiks je bil sestavljen po normativih za kokoši nesnice isa brown razen za vitamin E, ki smo ga dodali po NRC (Nutrient Requirements of Poultry, 1994) 10 IU/kg. V krmno mešanico K+VITE smo dodali 150 IU/kg.

Preglednica 9: Izračunane prehranske vrednosti krmnih mešanic

	KONT	K+SAN	K+VITE	K+OL	K+EOL	K+PU	K+EPU
ME, MJ ME/kg	11,50	11,50	11,50	11,50	11,50	11,50	11,50
SB, g/kg	174	174	174	174	174	174	174
Preb. lizin, g/kg	7,30	7,30	7,30	7,30	7,30	7,30	7,30
Preb. metionin, g/kg	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Preb metionin in cistein, g/kg	6,43	6,43	6,43	6,43	6,43	6,43	6,43
Preb. treonin, g/kg	5,38	5,38	5,38	5,38	5,38	5,38	5,38
Preb. triptofan, g/kg	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85	1,85
Ca, g/kg	46,94	46,94	46,94	46,94	46,94	46,94	46,94
P-izkoristljivi, g/kg	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80
Na, g/kg	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60	1,60

Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.

Sintetični preparat SANOX (dobavitelja YERI d.o.o.) je bil sestavljen iz sinergistično delujočih antioksidantov in kalcijevega karbonata kot inertnega nosilca, tako da je 1 kg preparata SANOX vseboval 18 g BHA (E320) in 35 g BHT (E321).

Oljčni listi in pulpa so bili pridobljeni iz oljke vrste *Olea europaea L.* in dobavljeni od oljkarja iz slovenske Istre. Oljčne liste smo posušili in jih nato zmleli. Oljčno pulpo smo liofilizirali, delno odstranili koščice ter zmleli.

Ekstrakta oljčnih listov in oljčne pulpe sta bila 80 % etanolna ekstrakta iz enake količine posušenih oljčnih listov in liofilizirane pulpe, kot smo ju dodali v krmne mešanice (10 g/kg krme). Ekstrakciji sta potekali štiri dni na stresalniku. Po obeh končanih ekstrakcijah smo skozi gazo prefiltrirali ekstrakta in iz njihovih tekočih ostankov odparili etanol v peščeni kopeli. Tako pripravljena ostanka smo nato vmešali v laneno olje. Nastalo mešanico lanenega olja in ekstrakta smo vmešali v predmešanico in nato v krmno mešanico.

V laboratoriju Katedre za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete smo naredili tudi Weendsko analizo vseh krmnih mešanic (preglednica 10).

Preglednica 10: Rezultati Weendske analize svežih krmnih mešanic (g/kg).

	KONT (g/kg)	K+VITE (g/kg)	K+OL (g/kg)	K+EOL (g/kg)	K+PU (g/kg)	K+EPU (g/kg)
Suha snov	912,91	912,01	912,88	912,69	910,41	909,52
Surove beljakovine	171,49	169,71	166,02	166,53	170,15	165,96
Surove maščobe	75,85	76,95	89,87	74,62	77,79	76,98
Surova vlaknina	48,98	53,02	52,01	47,21	53,38	51,67
Surovi pepel	133,84	141,95	143,22	157,78	149,30	142,03
Brezdušični izvleček	482,75	470,38	461,76	466,55	459,79	472,88

Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.

3.2 METODE

Ker so bili vzorci shranjeni pri temperaturi - 70 °C, smo jih pustili pred homogeniziranjem nekaj časa na sobni temperaturi, da so se odtalili. Nato pa smo jih zmleli v kavnem mlinčku (Bosch MKM6000), da smo zmanjšali velikost delcev pod 1 mm. Tako zmlete vzorce smo nato uporabili za določitev lipidnih peroksidov (LP), s tiobarbiturno kislino reagirajočih spojin (TBARS) in maščobnokislinske sestave.

3.2.1 Določitev lipidnih peroksidov

Postopek določanja lipidnih peroksidov smo naredili po navodilih PeroxiDetect™ testa podjetja Sigma (FOX-metoda), ki se ga uporablja za določitev v vodi topnih peroksidov in v lipidih topnih peroksidov. Uporabljali smo metodo za merjenje lipidnih peroksidov, ki so

nastali kot posledica oksidacije VNМК lanenega olja. Vse komponente PeroxiDetect™ - testa so stabilne do 24 mesecev pri temperaturi 2-8 °C.

Po navodilih iz zgoraj navedenega vira smo pripravili naslednje reagente:

- Barvni reagent

Najprej smo pripravili koncentrirano raztopino ksilenol oranžnega, ki smo jo pripravili tako, da smo zatehtali 50 mg spojine, jo kvantitativno prenesli v 5 ml bučko, dopolnili do oznake z mili-Q vodo in raztopino dobro premešali. Koncentrirano raztopino smo hranili v hladilniku v temi. Raztopino barvnega reagenta smo pripravili tako, da smo zatehtali 100 mg butiliranega hidroksitoluena (BHT) in ga prenesli v 250 ml bučko. Vanjo smo dodali 108 ml metanola, 1 ml koncentrirane raztopine ksilenol oranžnega in 11 ml mili-Q prečiščene vode. Tako pripravljeno raztopino barvnega reagenta smo pomešali in jo iz bučke prelili v temno steklenico. Dobro zaprto temno steklenico (ker je metanol hlapen in se posledično spreminja koncentracija raztopine), smo prav tako kot ksilenol oranžno koncentrirano raztopino, hranili v hladilniku pri temperaturi 2-8 °C, kjer je barvni reagent obstojen najmanj 6 mesecev.

- Železov reagent

Za pripravo železovega reagenta smo zatehtali 490 mg železovega amonijevega sulfata ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$) in ga kvantitativno prenesli v 50 ml merilno bučko. Dodali smo okoli 20 ml mili-Q prečiščene vode in 7 ml koncentrirane žveplove (VI) kisline. Raztopino v bučki smo z vodo dopolnili do oznake in dobro premešali, nato pa vsebino prelili v temno steklenico.

Standardna raztopina za kalibriranje:

- Raztopina terc-butilhidroperoksida (t-BuOOH)

Koncentrirano raztopino t-BuOOH (200 mM) smo pripravili tako, da smo v 10 ml bučko odpipetirali 286 μl 70 % raztopine t-BuOOH in do oznake razredčili z metanolom. Raztopino smo nato dobro premešali. Osnovno delovno raztopino t-BuOOH (200 μM) smo pripravili tako, da smo v 50 ml bučko odpipetirali 50 μl koncentrirane raztopine t-BuOOH in razredčili od oznake z metanolom. To

raztopino smo prelili v temno steklenico in jo hranili v hladilniku pri temperaturi 2-8 °C.

- Raztopina metanola (90 %)

V stekleni posodi smo zmešali 108 ml metanola in 12 ml mili-Q prečiščene vode.

3.2.1.1 Priprava standardnih raztopin za umeritveno premico

V 2 ml plastične eppendorfove epruvete s pokrovčkom smo odpipetirali raztopini t-BuOOH in 90 % metanola različnih volumnov, da smo dobili množine t-BuOOH za umeritveno premico (preglednica 11). Koncentracije standardov so zajele območje od 0 do 20 nmol t-BOOH. Umeritvena premica je bila linearna v vseh dneh meritev v celotnem območju (vsak dan smo naredili novo umeritveno premico s svežimi standardi in nanjo umerili vse vzorce, ki smo jih tisti dan naredili) z najnižjim korelacijskih koeficientom 0,97.

Preglednica 11: Volumen t-BuOOH in volumen 90 % raztopine za pripravo standardnih raztopin za umerjanje.

Volumen 200 µM raztopine t-BuOOH (µl)	Volumen 90 % raztopine metanola (µl)	Množina t-BuOOH v reakcijskem mediju (nmol)
0	100	0
10	90	2
20	80	4
40	60	8
60	40	12
80	20	16
100	0	20

Poleg standardnih raztopin smo v eppendorfove epruvete s pokrovčkom dodali tudi 1 ml barvnega in 10 µl železovega reagenta. Nato smo vse epruvete inkubirali 30 min v temi, da je nastal obarvan kompleks s ksilenol oranžnim. Po 30-ih minutah smo pomerili absorbanco standardnih raztopin pri 560 nm, pri čemer smo standardne raztopine prelili v plastične mikro kivete za enkratno uporabo.

3.2.1.2 Priprava vzorcev in določitev lipidnih peroksidov

Zatehtali smo 100 – 110 mg posameznega vzorca v označeno eppendorfovo epruveto s pokrovčkom, pri čemer smo maso posameznega vzorca zabeležili. V epruveto smo nato dodali 1 ml 90 % raztopine metanola. Vzorce smo ekstrahirali na vrtinčniku (vortex) 5

minut, nato smo jih 15 minut centrifugirali pri temperaturi 4 °C in 15000 obratih/min. Po končani ekstrakciji smo prenesli 100 µl supernatanta v nove eppendorfove epruvete s pokrovčkom s pomočjo elektronskih pipet. Supernatantu smo dodali 1 ml barvnega reagenta in 10 µl železovega reagenta ter raztopine vzorcev inkubirali 30 minut v temi. Pri tem je pomembno, da je reakcija potekala v temi vsaj 30 minut, da je reakcija potekla in se je razvila barva. Barva vzorca je stabilna nekaj ur. Po končani reakciji smo izmerili absorbanco raztopin vzorcev pri 560 nm, pri čemer smo raztopine vzorcev prelili v plastične kivete za enkratno uporabo.

3.2.2 Določitev s tiobarbiturno kislino reagirajočih spojin (TBARS)

Vzorci smo pripravili tako, da smo 100 mg – 110 mg posameznega vzorca zatehtali v 2 ml plastično eppendorfovo epruveto s pokrovčkom. Nato smo z elektronsko pipeto odpipetirali 0,5 ml raztopine BHT v metanolu in 0,75 ml 5 % raztopine TCA. Eppendorfove epruvete smo dobro zaprli in jih namestili na vrtničnik (vortex) za 15 minut. Potem pa smo vzorce še 15 minut centrifugirali pri 20000 obratih in 4 °C. S pipeto smo previdno prenesli zgornjo bistro fazo v steklene epruvete s pokrovčki (0,75 ml supernatanta). Pri pipetiranju smo bili pozorni, da nismo zajeli oborjenih beljakovin. V steklene epruvete z vzorci smo tako kot pri standardnih raztopinah dodali 1,5 ml raztopine TBA z dispenzorjem in jih dali v grelni blok (90 °C) za 60 minut, da je potekla derivatizacija MDA vzorcev s TBA. Na koncu smo jih hitro ohladili v kadi z mrzlo vodo.

S tiobarbiturno kislino reagirajoče spojine (TBARS) smo določili s spektrofotometrično metodo. V našem primeru je bil to kompleks MDA-TBA₂ in drugih aldehydov, ki reagirajo s TBA. Pri tej metodi smo izmerili absorbanco pri 532 nm v plastičnih kivetah za enkratno uporabo proti slepi vrednosti. Absorbanco smo izmerili s spektrofotometrom Cary UV/VIS. Ta metoda je v primerjavi s kromatografsko ločbo MDA-TBA₂ (HPLC-metoda) lažje izvedljiva in manj zahtevna ter tako primernejša za uporabo v slabše opremljenih laboratorijih.

3.2.2 Določitev maščobnokislinske sestave krmnih mešanic za kokoši nesnice

Za določanje maščobnokislinske sestave v krmnih mešanicah s plinsko kromatografijo smo uporabili metodo in situ priprave metilnih estrov maščobnih kislin, ki sta jo razvila Park in Goins (1994).

V steklene epruvete smo zatehtali 0,3-0,4 g vzorca in jim dodali 300 µl metilen klorida (CH₂Cl₂) in 3 ml 0,5 M natrijevega hidroksida (NaOH) v metanolu. Epruvete smo pred zaprtjem prepihal z dušikom, da ni prišlo do oksidacije maščobnih kislin. Nato smo jih

segrevali v termičnem bloku pri 90 °C 10 min. Ko smo jih na hitro ohladili v vodni kopeli, smo dodali 3 ml 14 % BF_3 v metanolu ter jih zopet prepihali z dušikom. Sledila sta ponovno segrevanje in ohlajanje. Potem smo v epruvete z vzorcem dodali 3 ml deionizirane vode in 1,5 ml heksana. Sledilo je enominutno stresanje, da so se estri maščobnih kislin ekstrahirali iz polarne v nepolarno fazo. Vzorce smo nato še 10 minut centrifugirali na 2000 obratih/min. Po ekstrakciji smo s stekleno Pasteurjevo pipeto previdno prenesli zgornjo fazo v zatemnjene vialice in jih prepihali z dušikom. Tako pripravljene estre smo analizirali s plinskim kromatografom. Instrument smo kalibrirali s standardnimi mešanici metilnih estrov (NuChek Prep.). Kromatograme smo ovrednotili s programsko opremo proizvajalca. Rezultat analize so masni deleži posameznih maščobnih kislin (md, %), ki smo jih v vsebnosti (mg/100 g) pretvorili s pomočjo vsebnosti maščob in faktorja ($F = 0,956$).

Analizirali smo sveže krmne mešanice in krmne mešanice po treh mesecih shranjevanja pri sobni temperaturi.

3.3 ANALIZA PODATKOV

Rezultate meritev lipidnih peroksidov in malondialdehida smo podali kot povprečne vrednosti dveh določitev. Izračunali smo tudi absolutne in relativne napake. Če so napake presegle 10 %, smo analizo ponovili.

4 REZULTATI

V poskusu smo določali vsebnosti LP in TBARS kot pokazatelje oksidativnega kvarjenja krmnih mešanic za kokoši nesnice. Vse krmne mešanice so bile obogatene z n-3 VNMK (dodatek 6 % lanenega olja) in so imele dodane različne dodatke sintetičnih (SANOX, vitamin E) in naravnih antioksidantov (dodatek oljčnih listov, oljčne pulpe in njunih etanolnih ekstraktov), razen KONT, ki je bila brez dodatkov. Maščobnokislinsko sestavo smo določili v svežih in tri mesece pri sobni temperaturi shranjenih krmnih mešanicah.

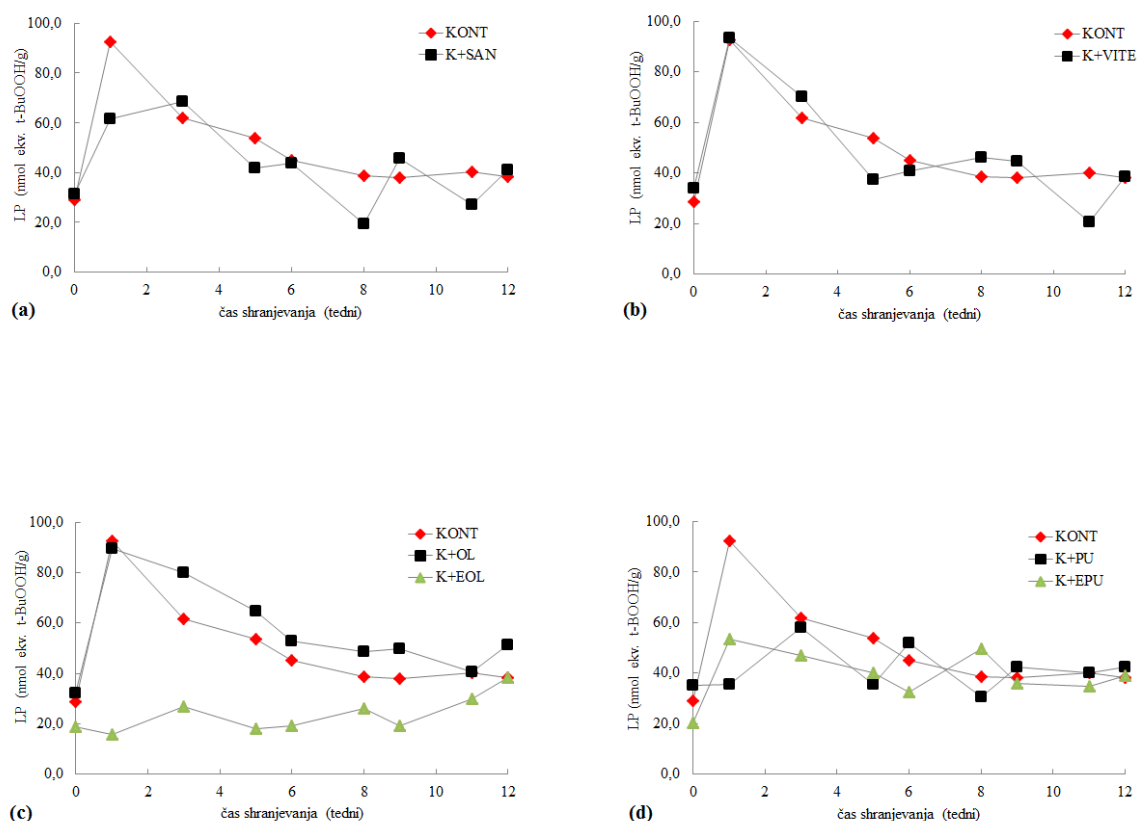
4.1 SPREMINJANJE VSEBNOSTI LIPIDNIH PEROKSIDOV MED SHRANJEVANJEM KRMNIH MEŠANIC

Z analizo svežih in shranjenih krmnih mešanic smo opazovali spreminjanje vsebnosti LP kot primarnega pokazatelja oksidativnega kvarjenja maščob, ki jih prikazujemo v preglednici 12 in na sliki 7.

Preglednica 12: Koncentracija lipidnih peroksidov (nmol ekv. t-BuOOH/g) v svežih in shranjenih vzorcih krmnih mešanic za kokoši nesnice brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk

Tedni shranjevanja	KONT	K+SAN	K+VITE	K+OL	K+EOL	K+PU	K+EPU
0	28,8	31,4	34,0	32,1	18,8	35,0	20,3
1	92,6	61,7	93,5	89,8	15,6	35,4	53,4
3	61,9	68,7	70,3	80,2	27,0	58,2	46,8
5	53,7	41,8	37,3	64,7	18,1	35,6	40,0
6	45,1	43,6	41,0	52,7	19,2	51,9	32,6
8	38,7	19,4	46,1	48,5	26,2	30,5	49,5
9	38,1	45,7	44,8	49,7	19,3	42,5	35,9
11	40,3	27,1	20,8	40,8	29,9	40,2	34,8
12	38,2	41,1	38,5	51,3	38,2	42,3	39,0

Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.



Slika 7: Spreminjanje vsebnosti lipidnih peroksidov (nmol ekv. t-BuOOH/g vzorca) med shranjevanjem krmnih mešanic za kokoši nesnice pri sobni temperaturi brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk: (a) KONT in K+SAN, (b) KONT in K+VITE, (c) KONT, K+OL in K+EOL, (d) KONT, K+PU in K+EPU

Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.

Vsebnosti LP v svežih krmnih mešanicah so bile med 18,8 (K+EOL) in 35,0 (K+PU) nmol ekv. t-BuOOH/g. Povprečna začetna vsebnost LP je znašala $28,6 \pm 6,5$ nmol ekv. t-BuOOH/g (preglednica 12). V svežih krmnih mešanicah je bila vsebnost LP v vzorcih K+EOL in K+EPU za 34,7 oz. 29,5 % manjša, v primerjavi z vzorcem KONT

Maksimalne vsebnosti LP so bile v nekaterih krmnih mešanicah dosežene že prvi teden po začetku shranjevanja, in sicer smo slednje izmerili v vzorcih KONT, K+VITE, K+OL in K+EPU. Med temi smo opazili, da je bila najvišja izmerjena koncentracija LP v krmni mešanici z dodatkom ekstrakta pulpe (K+EPU) nižja v primerjavi z ostalimi krmnimi mešanicami. V vzorcih K+SAN in K+PU je bil maksimum dosežen dva tedna po začetku shranjevanja, v vzorcu K+EOL pa smo najvišjo koncentracijo LP zabeležili šele v 12-em tednu shranjevanja, ki je bila v primerjavi z ostalimi maksimumi najnižja (38,2 nmol ekv.

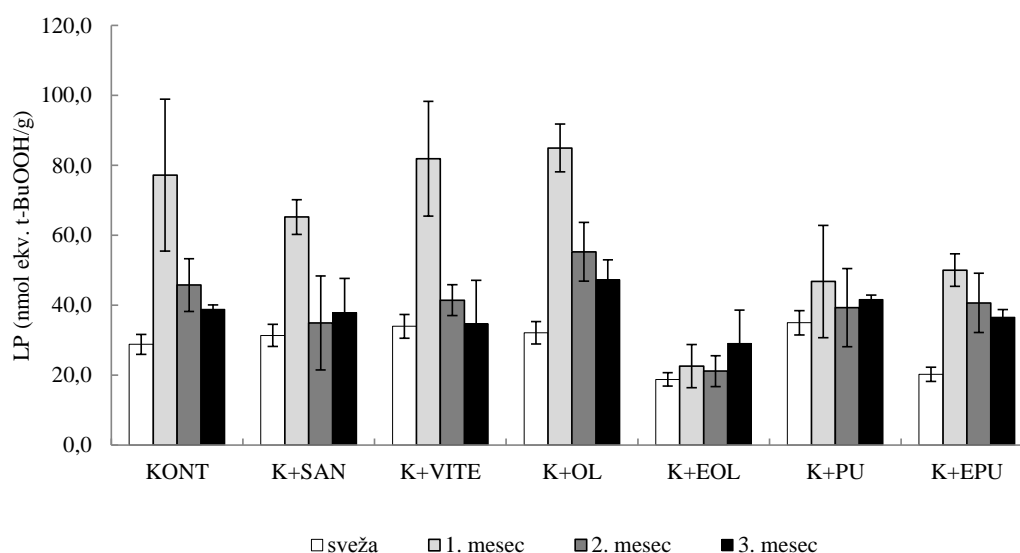
t-BuOOH/g), kar pomeni, da je dodatek ekstrakta oljčnih listov najbolj učinkovito zavrnil lipidno oksidacijo (preglednica 12 in slika 7).

Povprečni vsebnosti LP sta bili v prvem tednu $63,2 \pm 30,6$ nmol ekv. t-BuOOH/g in v tretjem tednu shranjevanja $59,0 \pm 17,6$ nmol ekv. t-BuOOH/g, kar je bilo precej več (okoli dvakrat več) kot v vzorcu sveže krmne mešanice (preglednica 12).

Povprečna vsebnost LP v vzorcih v petem tednu je bila $41,6 \pm 14,7$ nmol ekv. t-BuOOH/g, v šestem $40,9 \pm 11,7$ nmol ekv. t-BuOOH/g in v osmem $37,0 \pm 11,8$ nmol ekv. t-BuOOH/g, iz česar smo lahko sklepali, da je vsebnost LP v vzorcih počasi padala. (preglednica 12).

Ko smo primerjali razlike vsebnosti LP med tri mesece shranjenim vzorcem KONT in tri mesece shranjenimi drugimi krmnimi mešanici, smo ugotovili, da je bilo največje odstopanje v vzorcih K+OL in K+EOL, pri čemer je bila pri prvem za 21,5 % večja, pri drugem pa za 25,1 % manjša vsebnost LP.

Na sliki 8 predstavljamo mesečna povprečja koncentracije LP v analiziranih vzorcih krmnih mešanic.



Slika 8: Spreminjanje vsebnosti lipidnih peroksidov (mesečne povprečne vrednosti, nmol ekv. t-BuOOH/g vzorca) v svežih in shranjenih krmnih mešanicah za kokoši nesnice pri sobni temperaturi brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk

Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.

Prvi mesec shranjevanja smo izmerili velike razlike v povprečnih vsebnostih LP v vzorcih krmnih mešanic, ki so se gibale med 22,6 (K+EOL) in 85,0 (K+OL) nmol ekv. t-BuOOH/g (slika 8). Največja odstopanja od mesečnega povprečja smo opazili v vzorcih KONT, K+VITE in K+PU (za 21,7; 16,4 in 16,1 nmol ekv. t-BuOOH/g). Na podlagi mesečnih povprečij in njihovih odstopanj smo ugotovili, da se vzorci KONT, K+VITE, K+OL med seboj niso bistveno razlikovali v vsebnosti LP. Nekoliko manjše so bile vsebnosti LP v vzorcih K+SAN, K+PU in K+EPU. Nasprotno pa smo izmerili izrazito manjšo vsebnost LP v vzorcu K+EOL v primerjavi z drugimi vzorci (slika 8). Ko smo primerjali povprečne koncentracije LP med vzorci mesec dni shranjenih in svežih krmnih mešanic, smo opazili, da je v prvem mesecu shranjevanja nastalo največ LP v vzorcih KONT in K+OL (168,2 in 164,8 % več kot na začetku), najmanj pa v vzorcih K+EOL in K+PU (20,3 in 33,7 % več kot na začetku).

Drugi mesec shranjevanja so bile povprečne vsebnosti LP krmnih mešanic med 21,2 (K+EOL) in 55,3 (K+OL) nmol ekv. t-BuOOH/g. Tudi po dveh mesecih shranjevanja je bil dodatek ekstrakta oljčnih listov najbolj učinkovit pri zaviranju nastanka LP v krmnih mešanicah. Ko smo primerjali vsebnosti LP med vzorci svežih in dva meseca shranjenih krmnih mešanic, smo ugotovili, da je najbolj odstopala vsebnost LP v vzorcu K+EPU (za 100,4 % večja vsebnost LP) in najmanj vsebnosti LP v vzorcih K+SAN, K+EOL in K+PU (za 11,3; 12,6 in 12,3 % večja vsebnost LP). Vsa odstopanja vsebnosti LP v vzorcih shranjenih krmnih mešanic od svežih so bila manjša v primerjavi s prejšnjim mesecem (slika 8).

Tretji mesec shranjevanja so bile povprečne mesečne vsebnosti LP v krmnih mešanicah med 29,1 (K+EOL) in 47,3 (K+OL) nmol ekv. t-BuOOH/g. Glede na odstopanja od mesečnih povprečij smo izmerili, da se vzorci KONT, K+SAN, K+VITE, K+OL, K+PU in K+EPU med seboj niso bistveno razlikovali v vsebnosti LP. Smo pa ugotovili manjšo vsebnost LP v vzorcu K+EOL v primerjavi z drugimi krmnimi mešanicami (slika 8). Po primerjavi vsebnosti LP med vzorci svežih in tri mesece shranjenih krmnih mešanic smo ugotovili, da je najbolj odstopala vsebnost LP v K+EPU (za 80,2 % večja vsebnost LP) in najmanj v K+VITE (le za 2,2 % večja vsebnost LP).

Spreminjanje vsebnosti LP glede na vsebnost maščobe v krmnih mešanicah z dodatki je prikazana v preglednici 13.

Preglednica 13: Koncentracija lipidnih peroksidov (mmol ekv. t-BuOOH/kg maščobe) v svežih in shranjenih vzorcih krmnih mešanic za kokoši nesnice brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk

Tedni shranjevanja	KONT	K+SAN	K+VITE	K+OL	K+EOL	K+PU	K+EPU
0	0,38	0,41	0,44	0,36	0,25	0,45	0,26
1	1,22	0,80	1,22	1,00	0,24	0,46	0,69
3	0,82	0,89	0,91	0,89	0,36	0,75	0,61
5	0,71	0,54	0,48	0,72	0,24	0,46	0,52
6	0,59	0,57	0,53	0,59	0,26	0,67	0,42
8	0,51	0,25	0,60	0,54	0,35	0,39	0,64
9	0,50	0,59	0,58	0,55	0,26	0,55	0,47
11	0,53	0,35	0,27	0,45	0,40	0,52	0,45
12	0,50	0,53	0,50	0,57	0,51	0,54	0,51

Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.

Koncentracijo LP na kilogram maščobe smo izračunali iz vsebnosti LP v krmnih mešanicah in vsebnosti surove maščobe, ki smo jo določali z Weendsko analizo (preglednica 10). Minimalne vsebnosti LP so pred začetkom shranjevanja vsebovali vzorci KONT, K+OL in K+EPU (povprečno 0,33 mmol ekv. t-BuOOH/kg maščobe). V prvem tednu shranjevanja je imel minimalno vsebnost LP na kilogram maščobe vzorec K+EOL, v katerem smo izmerili najmanjšo vsebnost LP med vsemi krmnimi mešanicami. V osmem ter enajstem tednu smo minimalne vsebnosti izmerili v vzorcih K+SAN, K+VITE in K+PU. Maksimalne vsebnosti LP na kilogram maščobe smo izmerili v vzorcih KONT, K+VITE, K+OL in K+EPU v prvem tednu shranjevanja, kjer je vsebnost povprečno znašala 1,03 mmol ekv. t-BuOOH/kg maščobe. V tretjem tednu sta bili maksimalni vsebnosti LP doseženi v vzorcih K+SAN in K+PU. Medtem ko so imele večinoma vse krmne mešanice največjo vsebnost LP v prvem mesecu, je dodatek ekstrakta oljčnih listov svoj maksimum dosegel šele v zadnjem, 12-em, tednu shranjevanja (preglednica 13).

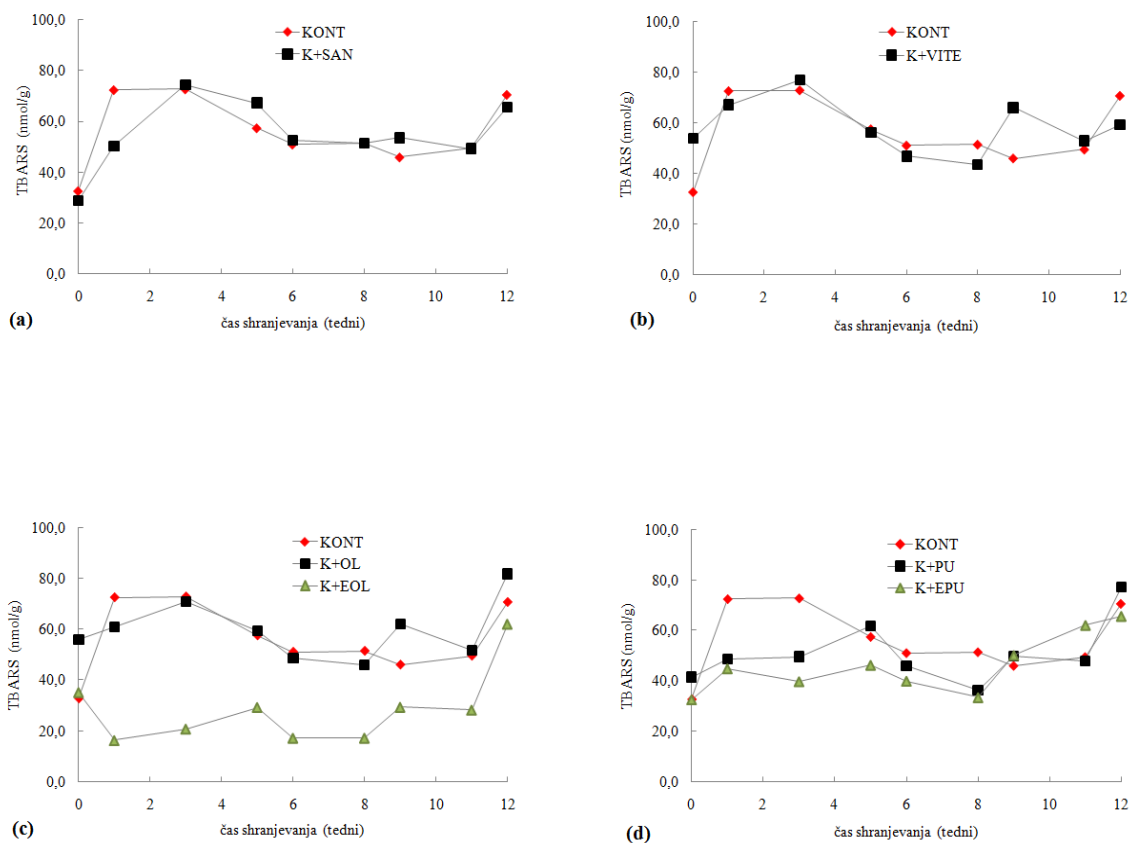
4.2 SPREMINJANJE VSEBNOSTI S TIOBARBITURNO KISLINO REAGIRAJOČIH SPOJIN (TBARS) MED SHRANJEVANJEM KRMNIH MEŠANIC

V svežih in shranjenih krmnih mešanic smo merili spreminjanje vsebnosti TBARS, ki so pokazatelji sekundarnega oksidativnega kvarjenja maščob in jih prikazujemo v preglednici 14 in na sliki 9.

Preglednica 14: Koncentracija s tiobarbiturno kislino reagirajočih spojin (TBARS, nmol/g vzorca) v vzorcih krmnih mešanic za kokoši nesnice brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk

Tedni shranjevanja	KONT	K+SAN	K+VITE	K+OL	K+EOL	K+PU	K+EPU
0	32,6	28,8	53,9	56,0	35,1	41,4	32,5
1	72,5	50,1	67,1	61,0	16,3	48,5	44,8
3	72,8	74,4	76,9	70,9	20,8	49,5	39,7
5	57,5	67,3	56,2	59,3	29,2	61,8	46,2
6	51,0	52,5	46,8	48,7	17,2	45,8	39,9
8	51,4	51,3	43,5	46,0	17,2	36,3	33,3
9	46,0	53,5	66,0	62,1	29,3	49,9	50,1
11	49,4	49,3	52,9	51,6	28,2	47,9	62,1
12	70,6	65,6	59,3	81,7	61,8	77,1	65,7

Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.



Slika 9: Spreminjanje vsebnosti TBARS (nmol/g vzorca) med shranjevanjem krmnih mešanic za kokoši nesnice pri sobni temperaturi brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk: (a) KONT in K+SAN, (b) KONT in K+VITE, (c) KONT, K+OL in K+EOL, (d) KONT, K+PU in K+EPU

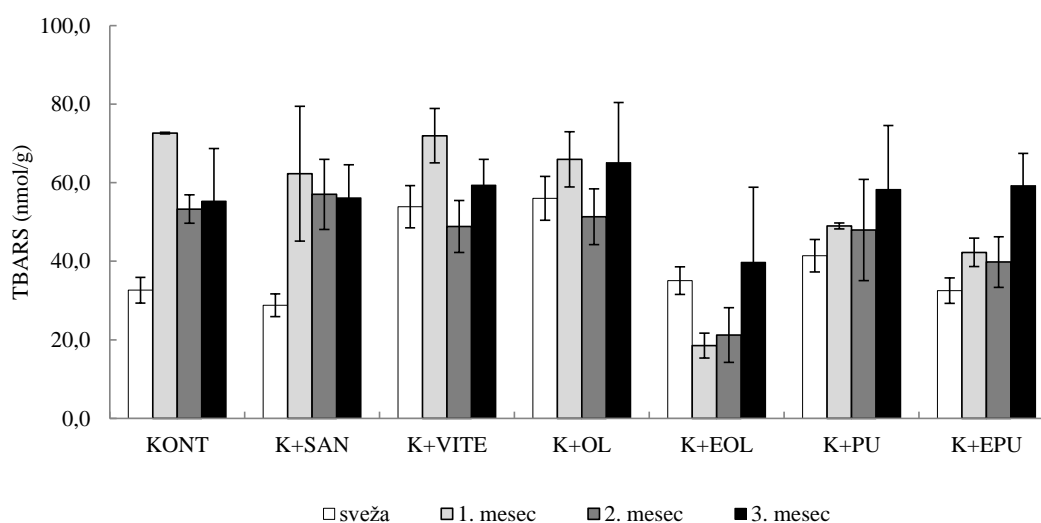
Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.

V svežih krmnih mešanicah smo izmerili med 28,8 (K+SAN) in 56,0 (K+OL) nmol TBARS /g (slika 9). Povprečna začetna vsebnost TBARS je znašala $40,0 \pm 10,9$ nmol/g (preglednica 14).

Maksimalne vsebnosti TBARS so bile v vzorcih KONT, K+SAN in K+VITE dosežene po treh tednih shranjevanja. V ostalih krmnih mešanicah, K+OL, K+EOL, K+PU in K+EPU pa so bile dosežene v zadnjem tednu shranjevanja vzorcev (preglednica 14 in slika 9). Največ TBARS je nastalo v vzorcu krmne mešanice z dodatkom oljčnih listov (K+OL), najmanj pa pri dodatku ekstrakta oljčnih listov (K+EOL).

Vsebnost TBARS je bila v vseh svežih vzorcih krmnih mešanic v primerjavi z vzorcem KONT, večja, razen v vzorcih K+SAN in K+EPU, kjer sta bili vsebnosti manjši za 11,6 in 0,3 %. Najvišji koncentraciji TBARS smo izmerili v vzorcih K+VITE in K+OL.

Na sliki 10 predstavljamo mesečna povprečja koncentracije LP v analiziranih vzorcih krmnih mešanic.



Slika 10: Spreminjanje vsebnosti TBARS (mesečne povprečne vrednosti, nmol/g vzorca) v svežih in shranjenih krmnih mešanicah za kokoši nesnice pri sobni temperaturi brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk

Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.

Prvi mesec shranjevanja smo izmerili razlike pri mesečnih povprečnih vsebnostih TBARS vzorcev krmnih mešanic, ki so se gibale med 18,5 (K+EOL) in 72,7 (KONT) nmol/g (slika 10). Glede na standardne odklone mesečnih povprečij smo izmerili, da se vzorci KONT, K+SAN, K+VITE, K+OL med seboj niso bistveno razlikovali v vsebnosti TBARS, prav tako tudi ne (od njih v vsebnosti TBARS manjša) vzorca K+PU in K+EPU, nasprotno smo opazili relativno majhno vsebnost TBARS pri vzorcu K+EOL v primerjavi z drugimi vzorci (slika 10). Zelo podobno smo ugotovili tudi v primerjavi vzorcev svežih ter mesec dni shranjenih krmnih mešanic, kjer smo izmerili, da se je vsebnost v vzorcu K+EOL v primerjavi s svežim vzorcem celo zmanjšala. Po mesecu dni shranjevanja je bila vsebnost TBARS tako za 47,2 % manjša v krmni mešanici z dodatkom ekstrakta oljčnih listov kot v svežem vzorcu. Medtem je pri vseh ostalih krmnih mešanicah vsebnost narastla, najbolj v vzorcih KONT (122,9 %) in K+SAN (116,3 %) (slika 10).

Drugi mesec shranjevanja so bile povprečne vsebnosti TBARS v vzorcih med 21,2 (K+EOL) in 57,0 (K+SAN) nmol/g. Glede na standardne odklone mesečnih povprečij smo izmerili enako kot mesec prej, in sicer ni bilo razlik v vsebnosti TBARS pri vzorcih KONT, K+SAN, K+VITE, K+OL, prav tako ni bilo razlik med vzorcema K+PU in K+EPU, opazili pa smo manjšo vsebnost TBARS v vzorcu K+EOL, ki je bila približno enkrat manjša od vzorcev K+PU in K+EPU (slika 10). Podobno smo ugotovili tudi pri primerjavi vzorcev svežih ter dva meseca shranjenih vzorcev krmnih mešanic, kjer smo opazili, da je ostala vsebnost TBARS v vzorcu krmne mešanice K+EOL manjša od začetne vsebnosti. Prav tako so bile zmanjšane vsebnosti TBARS pri vzorcih K+VITE in K+OL v primerjavi s svežimi vzorci (slika 10).

Tretji mesec shranjevanja so bile povprečne mesečne vsebnosti TBARS med 39,8 (K+EOL) in 65,1 (K+OL) nmol/g. Glede na standardne odklone mesečnih povprečij smo izmerili enako kot oba meseca prej, in sicer ni bilo razlik v vsebnosti TBARS v vzorcih KONT, K+SAN, K+VITE in K+OL. Prav tako nismo izmerili razlik med vzorci K+PU, K+EPU in K+EOL.

4.3 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA IN VSEBNOST MAŠČOBNIH KISLIN V KRMNIH MEŠANICAH

Maščobnokislinsko sestavo in vsebnost maščobnih kislin smo določili v vzorcih svežih in v krmnih mešanicah, ki smo jih shranjevali tri mesece pri sobni temperaturi (preglednica 15).

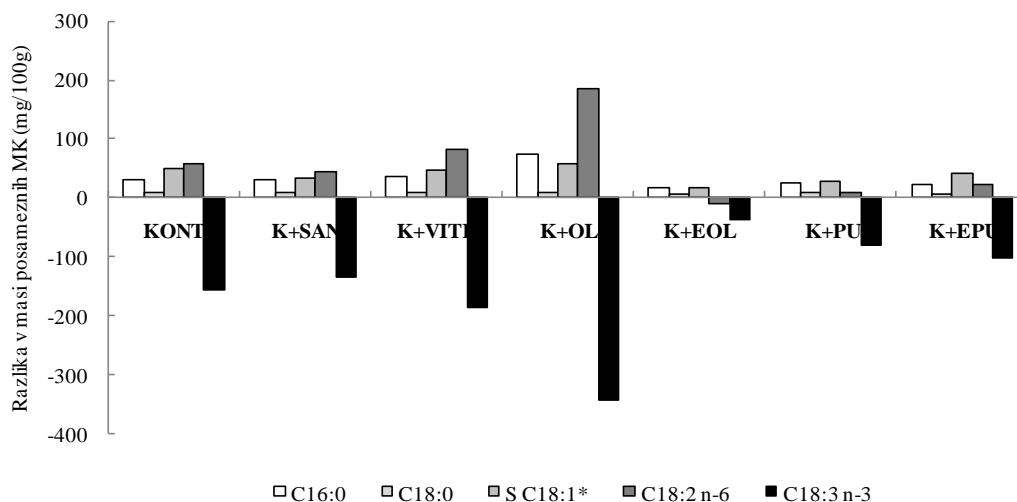
Preglednica 15: Maščobnokislinska sestava (md, %) svežih in tri mesece shranjenih krmnih mešanic brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk

Krma		C16:0	C18:0	Σ C18:1*	C18:2 n-6	C18:3 n-3
KONT	sveža	7,80	3,67	19,48	25,82	42,20
	3 meseci	8,21	3,78	20,18	26,61	40,05
K+SAN	sveža	7,80	3,67	19,48	25,82	42,20
	3 meseci	8,23	3,79	19,95	26,43	40,38
K+VITE	sveža	7,76	3,67	19,40	25,62	42,51
	3 meseci	8,25	3,77	20,02	26,74	39,96
K+OL	sveža	7,49	3,69	19,45	24,46	43,86
	3 meseci	8,35	3,80	20,13	26,61	39,84
K+EOL	sveža	7,91	3,62	19,48	26,54	41,37
	3 meseci	8,13	3,72	19,71	26,40	40,84
K+PU	sveža	7,98	3,64	20,77	25,73	40,79
	3 meseci	8,30	3,77	21,17	25,83	39,71
K+EPU	sveža	7,79	3,67	19,51	25,73	42,20
	3 meseci	8,11	3,77	20,08	26,05	40,81

* Σ C18:1 – vsota izomer oktadecenojske kisline.

Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.

Največjo razliko v vsebnosti α -linolenske MK (C18:3 n-3) med shranjevanjem smo določili v vzorcu K+OL, in sicer smo po treh mesecih shranjevanja določili za 9,1 % manjšo vsebnost v primerjavi s svežim vzorcem. Najmanjšo razliko v vsebnosti α -linolenske MK smo izmerili v vzorcu K+EOL (1,3 % manjšo) (preglednica 15).



Slika 11: Razlika (mg/100 g) v vsebnosti posameznih maščobnih kislin v svežih in tri mesece shranjenih krmnih mešanica za kokoši nesnice brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk

* Σ C18:1 – vsota izomer oktadecenojske kisline

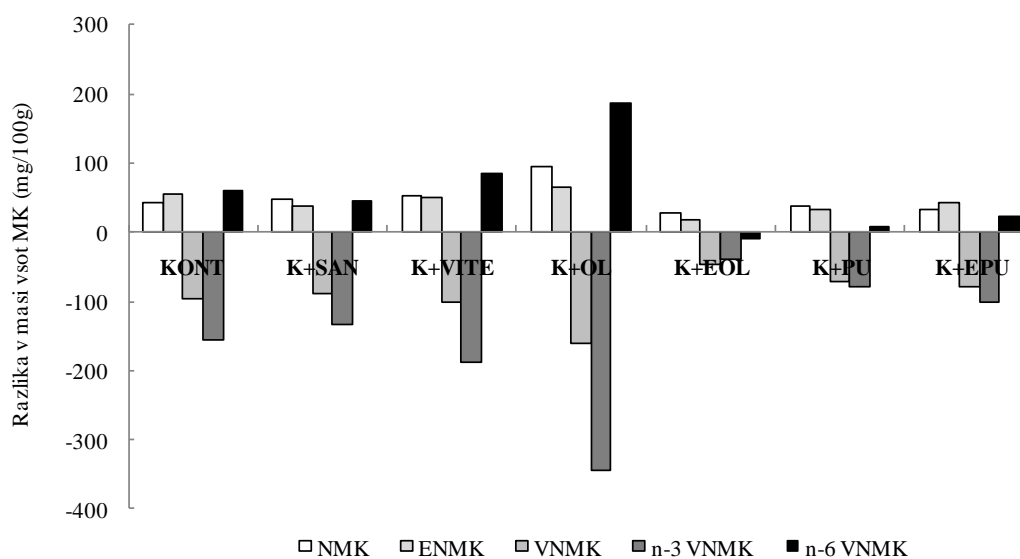
Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.

Največjo razliko v vsebnosti linolne MK (C18:2 n-6) smo med trimesečnim shranjevanjem določili v vzorcu K+OL (za 8,7 % več), najmanjšo pa v vzorcih K+PU in K+EOL (za 0,4 % in 0,5 % manj). Vsebnost linolne MK se je povečala na račun oksidacijske razgradnje α -linolenske MK, poleg tega pa je skupna oksidacijska razgradnja obeh v manjši meri vplivala na povečan delež ENMK in NMK, kot so oleinska (Σ C18:1), stearinska (C18:0) in palmitinska (C16:0) MK (slika 11).

Preglednica 16: Vsote maščobnih kislin (md, %) v svežih in tri mesece shranjenih krmnih mešanicah brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk

Krma		NMK	ENMK	VNMK	n-3 VNMK	n-6 VNMK	razmerje n-6/n-3
KONT	sveža	12,13	19,86	68,01	42,20	25,82	0,61
	3 meseci	12,72	20,60	66,68	40,05	26,63	0,66
K+SAN	sveža	12,13	19,86	68,01	42,20	25,82	0,61
	3 meseci	12,77	20,39	66,84	40,38	26,45	0,65
K+VITE	sveža	12,07	19,80	68,13	42,51	25,62	0,60
	3 meseci	12,79	20,47	66,75	39,96	26,78	0,67
K+OL	sveža	11,84	19,84	68,32	43,86	24,46	0,56
	3 meseci	12,94	20,59	66,46	39,84	26,62	0,67
K+EOL	sveža	12,20	19,89	67,91	41,37	26,54	0,64
	3 meseci	12,60	20,15	67,25	40,84	26,42	0,65
K+PU	sveža	12,28	21,20	66,52	40,79	25,73	0,63
	3 meseci	12,81	21,64	65,55	39,71	25,84	0,65
K+EPU	sveža	12,15	19,92	67,93	42,20	25,73	0,61
	3 meseci	12,61	20,52	66,87	40,81	26,07	0,64

Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.



Slika 12: Razlika (mg/100 g) v vsebnosti vsot maščobnih kislin v svežih in tri mesece shranjenih krmnih mešanicah za kokoši nesnice brez in z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti iz stranskih proizvodov oljk

Kratice krmnih mešanic so razložene v materialih in metodah na strani 26.

V vsebnosti NMK, ENMK, VNMK, n-3 VNMK in n-6 VNMK v vzorcih svežih in shranjenih krmnih mešanicah smo izmerili največje razlike v vzorcu K+OL (9,3 %; 3,7 %; 2,7 %; 9,2 % in 8,8 %), kar pomeni, da je dodatek oljčnih listov najslabše od vseh zaščitil α -linolensko MK pred razgradnjo. Nasprotno je bila ob dodatku ekstrakta oljčnih listov (K+EOL) razlika med vzorci svežih in shranjenih krmnih mešanic najmanjša pri NMK, ENMK, VNMK in n-3 VNMK (3,2 %; 1,3 %; 1 % in 1,3 %), kar pa pomeni, da je ta dodatek od vseh najbolj uspešno zaščitil α -linolensko MK (preglednica 16 in slika 12). Dodatek oljčne pulpe je le malo boljše kot ekstrakt oljčnih listov zaščitil še n-6 VNMK. Razmerje med n-3/n-6 VNMK je bilo med shranjevanjem krmnih mešanic najbolj spremenjeno v vzorcu K+OL (za 19,6 %) in najmanj v vzorcu K+EOL (1,5 %).

5 RAZPRAVA

V poskusu smo shranjevali krmne mešanice za kokoši nesnice, ki smo jim dodali 6 % ekstra deviškega lanenega olja ter sintetične antioksidante SANOX in vitamin E, ali naravne antioksidante oljčne liste, oljčno pulpo ali njuna ekstrakta. Laneno olje, ki smo ga uporabili v poskusu, vsebuje velik delež VNMK (72,21 %), med katerimi prevladuje α -linolenska MK (56,07 %), ki spada med n-3 VNMK. Z dodajanjem olj, bogatih z VNMK (kot laneno), v krmne mešanice za kokoši nesnice lahko spremenimo maščobnokislinsko sestavo jajc, predvsem sestavo maščobnih kislin v rumenjaku. Tako lahko dobimo t. i. funkcionalna živila, ki pa pozitivno vplivajo na zdravje potrošnika. Zaradi dodatka večkrat nenasičenih MK iz lanenega olja, so krmne mešanice bolj podvržene oksidaciji.

Krmne mešanice smo shranjevali v plastičnih posodah s priprtimi pokrovi pri sobni temperaturi (20 ± 5 °C). S temi pogoji smo želeli ponazoriti razmere pri skladiščenju krmnih mešanic na perutninskih obratih, kjer so te navadno skladiščene v papirnatih vrečah ali silosih. S shranjevanjem krmnih mešanic za kokoši nesnice z dodatki SANOX, vitamina E, oljčnih listov in oljčne pulpe ter njunih ekstraktov, smo želeli ugotoviti, kateri od dodatkov najbolje ščiti maščobe v krmnih mešanicah pred lipidno oksidacijo. Oksidativno stabilnost krmnih mešanic smo ovrednotili z merjenjem koncentracije primarnih in sekundarnih produktov oksidacije maščob, kot so LP in TBARS. Spremljanje obsega lipidne oksidacije v krmnih mešanicah je pomembno, saj so zdrave živali predpogoj za zdrave živalske proizvode (Frankič in sod., 2008). Kljub pomembnosti monitoringa oksidativnega kvarjenja pred krmljenjem živali pa je to področje slabo raziskano.

Izmerili smo tudi maščobnokislinsko sestavo svežih in tri mesece shranjenih krmnih mešanic z dodatki. Vpeljali in uporabili smo enostavnejši in hitri metodi za določevanje vsebnosti LP ter TBARS v krmnih mešanicah. Rok uporabe takšne krme je običajno tri mesece, zato smo toliko časa tudi v našem poskusu opazovali spreminjanje vsebnosti LP in TBARS.

Povprečna vsebnost LP v svežih vzorcih krmnih mešanic je znašala $28,6 \pm 6,5$ nmol ekv. t-BuOOH/g, najvišjo koncentracijo LP smo določili v K+VITE (34,0 nmol ekv. t-BuOOH/g), najnižjo v K-EOL (18,8 nmol ekv. t-BuOOH/g). Vsebnost LP v vzorcih svežih krmnih mešanic z dodatkom ekstraktov oljčnih listov in pulpe je bila v primerjavi s povprečno vsebnostjo manjša za 34,3 in 29,0 % (slika 7). Manjši vsebnosti sta bili posledica poteka iniciacijske faze oksidacije lipidov. Ker je bila v krmnih mešanicah K+VITE, K+OL in K+PU vsebnost LP povprečno 18,0 % večja v primerjavi s povprečjem, smo sklepali, da je v teh svežih vzorcih že potekala propagacijska faza. V

takšnih vzorcih smo že na podlagi začetnih vsebnosti LP pričakovali, da bo obseg oksidativnega kvarjenja maščob med shranjevanjem zelo velik, saj večja prisotnost LP v krmi pomeni tudi večjo vsebnost prostih radikalov, ki se lahko tako v verižni reakciji tvorijo brez začetnih iniciatorjev, pri tem pa nastaja vedno več peroksidnih radikalov in posledično lipidnih peroksidov (Skvarča, 2000a).

V poskusu smo ugotovili, da so bile maksimalne izmerjene vsebnosti LP v krmnih mešanicah KONT, K+VITE, K+OL in pri K+EPU (preglednica 12) dosežene že po prvem tednu shranjevanja, medtem sta bili maksimalni izmerjeni koncentraciji LP pri K+SAN in K+PU doseženi po treh tednih shranjevanja, iz česar lahko sklepamo, da sta dodatka SANOX in oljčna pulpa rahlo zavrla lipidno oksidacijo v prvem tednu, saj je bila maksimalna koncentracija LP dosežena kasneje (slika 7), v tretjem tednu, vendar je bil obseg lipidne oksidacije manjši. Največja izjema je bil dodatek ekstrakta oljčnih listov, kjer je bil maksimum dosežen šele v 12-em tednu shranjevanja. Poleg tega je bila maksimalna vsebnost LP v vzorcu K+EOL (38,2 nmol ekv. t-BuOOH/g) enkrat manjša, kot na primer v vzorcih KONT in K+VITE (92,6 in 93,5 nmol ekv. t-BuOOH/g), kar pomeni, da je dodatek ekstrakta oljčnih listov močno zavrl oksidativno kvarjenje krmne mešanice, saj je bil vrh propagacije dosežen kasneje, kot pri vseh ostalih krmnih mešanicah (preglednica 12). Glede na to, da smo merili vsebnosti LP v tedenskih oz. dvotedenskih intervalih, obstaja tudi verjetnost, da dejanskih maksimumov nismo zaznali.

V prvem mesecu shranjevanja se je v primerjavi z vzorci sveže krmne mešanice in vzorci KONT najslabše izkazal dodatek oljčnih listov. V krmni mešanici s tem dodatkom smo izmerili največjo vsebnost LP (85,0 nmol ekv. t-BuOOH/g) (preglednica 12). Vzrok za to je bila lahko večja vsebnost surovih maščob v tej krmni mešanici, ki je bila za 17,6 % večja od povprečja ostalih krmnih mešanic (preglednica 10). Posledično so se morale fenolne spojine z antioksidativno aktivnostjo »žrtvovati« tudi za zaščito maščob, ki so izhajale iz oljčnih listov, medtem pa so VNМК iz lanenega olja oksidirale. Prav tako je povečan obseg oksidativnega kvarjenja maščob potekal v primerjavi s svežimi vzorci in vzorci KONT v vzorcu K+VITE (slika 8). Vzroke za slabšo zaščito pred lipidno oksidacijo K+VITE lahko pripišemo dejstvu, da je vitamin E pretežno *in vivo* antioksidant, ki v obliki α -tokoferol acetata (kot smo ga dodali v krmo) v *in vitro* sistemih ne deluje kot antioksidant (Machlin, 1991). Hamre in sod. (2010) so ugotovili, da lahko dodatek mešanice vitamina E in C uspešno zaščiti krmo za ribe pred lipidno oksidacijo. Večina drugih raziskovalcev zato učinek dodanega vitamina E navadno določa preko analize živalskih produktov (mesa ali jajc), saj se le-ta učinkovito naloži v tkivih in produktih živali, kjer uspešno preprečuje oksidacijo maščob med shranjevanjem (npr. med

shranjevanjem jajc v hladilniku), kot so to dokazali Botsoglou in sod. (2012b). V primerjavi z dodatkom vitamina E in dodatkom oljčnih listov je v ostalih krmnih mešanicah potekala propagacijska faza počasneje in v nekaterih vzorcih v prvem mesecu shranjevanja še ni dosegla maksimuma (slika 7). Povprečna mesečna vsebnost LP v vzorcu K+EOL je bila v prvem mesecu, v primerjavi s svežo krmno mešanico, večja le za 20,3 % in v primerjavi z vzorcem KONT za 70,7 % manjša.

V drugem mesecu shranjevanja smo določili manjše povprečne mesečne vsebnosti LP v primerjavi z mesecem prej. Po dveh mesecih shranjevanja se je v primerjavi svežim vzorcem vsebnost LP najbolj povečala v vzorcu K+EPU (za 100,4 %), kar lahko pripišemo majhni začetni vsebnosti LP, mogoče pa tudi manjši vsebnosti olevuropeina in hidroksitirozola v ekstraktu oljčne pulpe kljub relativno veliki vsebnosti oleozidov, kot so pri analizi opazili Cardoso in sod. (2005) (preglednica 7). Najmanjšo razliko v LP med svežimi in dva meseca shranjenimi vzorci smo izmerili v vzorcu K+SAN (za 11,3 % manjšo). V primerjavi z dva meseca shranjenim vzorcem KONT in mesečnimi povprečji ostalih vzorcev smo opazili manjša odstopanja vsebnosti LP kot mesec prej, razen pri dodatku oljčnih listov, kjer je bila za 20,7 % večja od vzorca KONT (slika 8). Dodatek sintetičnega antioksidanta SANOX je v primerjavi s KONT za 23,7 % zmanjšal vsebnost LP.

Tretji mesec shranjevanja smo prav tako kot oba meseca prej izmerili manjšo vsebnost LP v K+EOL v primerjavi z ostalimi krmnimi mešanicami. V primerjavi s svežimi krmnimi mešanicami je tudi tretji mesec shranjevanja, glede na mesečno povprečje, najbolj odstopal vzorec K+EPU (za 80,2 % večja vsebnost LP), vendar je bilo odstopanje od tri mesece shranjene mešanice KONT le 6 %. Vzrok za to je bil enak kot mesec prej (zaradi majhne vsebnosti LP pred začetkom shranjevanja) (slika 8).

V raziskavi shranjevanja krmnih mešanic za kozice *Penaeus monodon* in pitovne piščance so avtorji to tezo potrdili, saj so odkrili izboljšanje oksidativne stabilnosti pri dodajanju mešanice sintetičnih antioksidantov BHA in BHT. Bautista-Teruel in Subosa (1999) sta ugotovila, da se je z dodatkom SANOX zmanjšala vsebnost LP in MDA med shranjevanjem krmne mešanice za kozice z veliko vsebnostjo maščob (okoli 11,3 %), bogatih z VNМК, pri 10 °C 10 tednov. Posledično se je v tem poskusu statistično značilno izboljšala tudi preživitvena sposobnost kozic. Njobe in sod. (2006) so ugotovili, da 60-dnevno shranjevanje krmne mešanice za pitovne piščance z dodatkom mešanice antioksidantov BHA in BHT pri 15 °C in 50 % vlažnosti značilno zmanjša količino prostih МК in vsebnost LP, vendar je bilo povečanje PŠ (peroksidnega števila) v njihovi študiji

bistveno večje (7-10-krat) v primerjavi z začetno vrednostjo PŠ (0,6 mekv/kg maščob), kot smo ga izmerili v naši raziskavi (2 - 4,5-kratno povečanje, začetna PŠ 0,4 mekv/kg maščob), kar je verjetno posledica sestave krmne mešanice, ki je vsebovala tudi ribjo moko, v naši raziskavi pa je bil vir maščobe laneno olje.

Preračunane vsebnosti LP v vzorcih posameznih krmnih mešanic z dodatki na kilogram maščobe so pokazale na zelo majhen obseg oksidativnega kvarjenja maščob v naših analiziranih krmnih mešanicah. Največje vsebnosti smo zaznali v vzorcih KONT in K+VITE v prvem tednu shranjevanja, in sicer 1,22 mmol ekv. t-BuOOH/kg maščobe. Vsebnosti LP v vzorcih drugih krmnih mešanic so bile malo manjše, najmanjše smo opazili v vzorcu krmne mešanice z dodatkom ekstrakta oljčnih listov. Kljub temu pa so vse vsebnosti LP v vzorcih vseh krmnih mešanic v primerjavi s standardi, ki veljajo za uživanje maščob (olja) v prehrani ljudi, daleč pod dovoljeno mejo vsebnosti LP, saj je dovoljena meja za hladno stiskana in deviška olja 15 mekv/kg maščobe (CODEX STAN 210-1999, CODEX STAN 19-1981). Na podlagi tega smo sklepali, da je bilo v krmne mešanice dodano ekstra deviško laneno olje že samo po sebi dovolj zaščiteno pred lipidno oksidacijo in zato dodani sintetični in naravni antioksidanti niso imeli bistvenega učinka pri zaviranju le-te.

Terminacijska faza oksidacije lipidov je posledica njihove razgradnje v sekundarne oksidacijske produkte kot so malondialdehid in druge spojine, ki jih v poskusu označujemo z oznako TBARS (s tiobarbiturno kislino reagirajoče snovi). Malondialdehid (MDA) je glavni sekundarni produkt oksidacije VNMK s tremi ali več dvojnimi vezmi (Botsoglou, 2012b). Uporaben je za ugotavljanje celičnih poškodb (Grotto in sod., 2007). Je toksičen, karcinogen, mutagen, se veže na lipide, beljakovine in nukleinske kisline ter inaktivira ribonukleazo, poleg tega ima močan vpliv na sprejemljivost krme zaradi poslabšanega okusa, vonja in videza (Skvarča, 2000a; Frankič in Salobir, 2007). Zaradi vseh teh dejavnikov je njegov monitoring pred krmljenjem živalim ključnega pomena.

V svežih krmnih mešanic smo določili $40,0 \pm 10,9$ nmol TBARS/g, največji odstopanji od vzorca KONT (32,6 nmol/g) smo izmerili v vzorcih K+VITE in K+OL, kjer je bila vsebnost TBARS 53,9 in 56,0 nmol/g krme (preglednica 14).

Glede na to, da smo merili vsebnosti TBARS enkrat na teden oz. enkrat na dva tedna, obstaja tudi verjetnost, da dejanskih maksimumov nismo izmerili. Smo pa na podlagi izvedenih meritev ugotovili, da so bile maksimalne vsebnosti TBARS v vzorcih KONT, K+SAN in K+VITE dosežene po treh tednih shranjevanja (preglednica 14), v vzorcih ostalih krmnih mešanic (K+OL, K+EOL, K+PU in K+EPU) pa so bile dosežene v zadnjem

tednu shranjevanja vzorcev, kar je bila najbrž posledica pretvorbe primarnih oksidacijskih produktov v sekundarne (slika 9). Vendar tega ne moremo trditi zagotovo, saj vzorcev krmnih mešanic nismo shranjevali v kontrolirani atmosferi in nismo izračunali kinetike lipidne oksidacije kot navaja Abram (1995). Na podlagi podatkov v literaturi, kjer so proučevali oksidacijsko stabilnost ekstra deviškega sončničnega olja v zaprtem sistemu pri 60 °C (Wardhani in sod., 2013), lahko predvidevamo, da pretvorba LP v sekundarne produkte oksidacije, tudi v našem poskusu, poteka hitro, čeprav smo potek oksidacije spremljali pri nižji (sobni) temperaturi.

Prvi mesec shranjevanja smo iz mesečnih povprečij izračunali povečanje vsebnosti TBARS v vzorcih K+SAN, K+VITE, K+OL s povprečno vsebnostjo 66,7 nmol/g. Opazili smo malo manjše povečanje vsebnosti TBARS v vzorcih K+PU in K+EPU (povprečno 45,7 nmol/g) (preglednica 14). Izjema je bil dodatek ekstrakta oljčnih listov, kjer se je vsebnost TBARS celo zmanjšala v primerjavi s svežo krmno mešanico za 47,2 %. Tudi dodatka oljčne pulpe in njen ekstrakt sta zavrla obseg nastanka TBARS za povprečno 24,2 % v primerjavi s svežo krmno mešanico. Kot smo pričakovali glede na velike vsebnosti TBARS v vzorcih krmnih mešanic pred začetkom shranjevanja, sta se vsebnosti v vzorcih K+VITE in K+OL povečali le za 33,5 in 17,8 % in sta v prvem mesecu dosegli maksimum. Najbolj se je povečala vsebnost TBARS v vzorcu K+SAN (za 116,3 %) v primerjavi z vzorcem sveže krmne mešanice (slika 10). V primerjavi z en mesec shranjenim vzorcem KONT in vzorci ostalih krmnih mešanic se je (enako kot v primerjavi s svežimi vzorci krmnih mešanic) kot najboljši zaviralec nastanka sekundarnih produktov oksidacije izkazal dodatek ekstrakta oljčnih listov, kjer je bila vsebnost TBARS za 74,5 % manjša (slika 9).

Drugi mesec shranjevanja smo opazili zmanjšanje mesečnih povprečij vsebnosti TBARS v primerjavi z mesecem prej, razen pri krmni mešanici z dodatkom ekstrakta oljčnih listov, kjer se je vsebnost TBARS povečala za 14,5 % (preglednica 14). Zmanjšanje vsebnosti TBARS v vzorcih ostalih krmnih mešanicah je bilo najbrž posledica poteka terminacijske faze LP in manjše pretvorbe v TBARS. Verjetno je tudi, da lahko zmanjšanje sekundarnih produktov lipidne oksidacije povežemo z dejstvom, da ima MDA kot glavni sekundarni produkt lipidne oksidacije širok spekter spojin s katerimi lahko reagira (amini, aminokisliline, aaminski sladkorji, nukleotidi in proteini) in z njimi tvori komplekse, ki pa jih ne moremo izmeriti, ker ne reagirajo s TBA (Esterbauer, 1991, cit. po Botsoglou, 2012b). Kljub temu smo največje odstopanje od sveže krmne izmerili v mesečnem povprečju vzorca K+SAN, kjer je bila vsebnost TBARS za 98 % večja kot v sveži krmni mešanici (slika 10). Tudi v tem mesecu je bila povprečna mesečna vsebnost TBARS v vzorcu K+EOL za 39,5 % manjša v primerjavi s svežimi vzorci krmnih mešanic. Prav tako je bila

mesečna povprečna vsebnost TBARS od vseh krmnih mešanic v vzorcu K+EOL manjša v primerjavi z vzorcem KONT, in sicer za 60,2 % (slika 9).

Tretji mesec shranjevanja so bile mesečne povprečne vsebnosti TBARS malo povečane v primerjavi z drugim mesecem shranjevanja, kar je bila najbrž posledica povečanja vsebnosti LP, ki se je pojavila od 11-ega tedna naprej, razen pri K+EPU, kjer se je začela že v 9-em tednu. Z razliko od ostalih se je šele v tem tednu pravzaprav začela propagacijska faza LP v krmni mešanici z dodatkom ekstrakta oljčnih listov, kar pomeni, da je ta antioksidativni dodatek najbolje zadržal lipidno oksidacijo maščob v krmi in se je pretvorba v sekundarne produkte najbrž šele začela. Med primerjavo vzorcev svežih krmnih mešanic (pred začetkom shranjevanja) ter tri mesece shranjenih krmnih mešanic smo opazili, da so se vsebnosti TBARS pri vseh vzorcih povečale v primerjavi s svežimi krmnimi mešanicami, in sicer najbolj v vzorcih K+SAN in K+EPU (slika 10). V primerjavi s tri mesece shranjeno mešanico KONT in tri mesece shranjenimi krmnimi mešanicami z dodanimi sintetičnimi ali naravnimi antioksidanti, smo opazili, da je vsebnost TBARS v mešanici K+EOL ostala (enako kot oba meseca prej) manjša od vzorca KONT, in sicer za 28,1 %, medtem pa je bila vsebnost pri vseh ostalih krmnih mešanicah večja kot v mešanici KONT (slika 9).

Glede na vsebnosti LP in TBARS smo ugotovili, da je bila vsebnost TBARS v vseh vzorcih krmnih mešanic v drugem in tretjem mesecu shranjevanja enaka ali malo večja kot vsebnost LP, kar je bila najbrž posledica akumulacije TBARS med shranjevanjem. V poskusu so se dodatki naravnih in sintetičnih antioksidantov izkazali za različno učinkovite, in sicer so si vzorci krmnih mešanic z antioksidativnimi dodatki glede na učinkovitost zaviranja nastanka LP in TBARS sledili (od najmanj do najbolj učinkovitega): K+OL > K+VITE > K+SANOX > K+PU > K+EPU > K+EOL. Razlike v obsegu lipidne oksidacije med vzorci krmnih mešanic z dodano oljčno pulpo, njenim ekstraktom in ekstraktom oljčnih listov so bile zelo majhne, s čimer smo potrdili hipotezo, da nekateri stranski produkti oljčne industrije dovolj uspešno zaščitijo maščobe v krmnih mešanicah pred lipidno oksidacijo. Kljub temu so bile razlike v našem poskusu med vsebnostmi LP in TBARS krmnih mešanic z dodatki ali brez, v primerjavi z razlikami iz literature, minimalne. Tako so npr. Hamre in sod. (2010) pri preverjanju oksidativne stabilizacije krme za ribe izmerili bistvene razlike v vsebnosti TBARS med krmo brez dodatkov in krmami z dodatki antioksidantov. Kar pomeni, da je bil obseg lipidne oksidacije v krmi brez dodatka velik, zavrli so ga šele dodatki, ki so bili kombinacija več različnih antioksidantov (askorbinske kisline, askorbil palmitata, ekstrakta rožmarina, mešanice tokoferolov, citronske kisline, sperminala, mešanice fosfatov in etoksikvina). Zato smo na

podlagi te primerjave sklepali, da kljub manjšim razlikam v obsegu oksidativnega kvarjenja, ni prišlo do razlik med krmnimi mešanici, čemur je bil vzrok dodatek ekstrakta deviškega lanenega olja, ki je že samo po sebi vsebovalo naravne antioksidante in je bilo tako dovolj zaščiteno pred lipidno oksidacijo. Učinek dodatkov pri preprečevanju lipidne oksidacije med shranjevanjem se tako ni mogel izraziti v celoti.

Do enakega sklepa je prišla tudi Lupšina (2013), ki je v svoji magistrski nalogi raziskovala vpliv krmjenja krmnih mešanic z dodatkom oljčnih listov, pulpe in njihovih ekstraktov kokošim nesnicam na proizvodne lastnosti, antioksidativni status kokoši, fizikalne lastnosti jajc ter njihovo oksidativno stabilnost. Kokoši je krmila s svežimi krmnimi mešanici, ki smo jih shranjevali in analizirali v našem poskusu. Do zanimivih ugotovitev v istih krmnih mešanicah pa je prišel Šmon (2013), ki je v svojem diplomskem delu analiziral hlapne spojine svežih, pospešeno staranih in tri mesece shranjenih krmnih mešanic. Analiziral je iste krmne mešanice, ki smo jih uporabili tudi v našem poskusu. Ugotovil je, da je glede na določitev hlapnih spojin najmanj oksidiral vzorec krmne mešanice z dodatkom oljčnih listov, glede na določitev MDA pa vzorec z dodatkom ekstrakta oljčnih listov. Zaradi velikega standardnega odklona pri določitvah MDA je sklepal, da je najbolj natančna določitev hlapnih spojin, in sicer je ugotovil, da je najboljši pokazatelj lipidne oksidacije heksanal.

Maščobnokislinsko sestavo in vsebnost maščobnih kislin smo določili v vzorcih svežih in 3 mesece shranjenih krmnih mešanic pri sobni temperaturi. Največjo razliko v vsebnosti α -linolenske MK (C18:3 n-3) vzorcih svežih in shranjenih krmnih mešanic smo izmerili v vzorcu K+OL, in sicer za 9,1 % manjšo vsebnost v shranjeni krmni mešanici v primerjavi z vzorcem sveže krme. Medtem smo najmanjšo razliko opazili v vzorcu K+EOL (1,3 % manjšo), ki je po shranjevanju obdržala največjo vsebnost α -linolenske MK med krmnimi mešanici (preglednica 15). Vsebnost linolne MK se je malo povečala na račun oksidacije α -linolenske MK, poleg tega pa je skupna oksidacijska razgradnja obeh v manjši meri vplivala na malo povečan nastanek ENMK in NMK, kot so oleinska (Σ C18:1), stearinska (C18:0), margarinska (C17:0) in palmitinska (C16:0) MK (slika 11). V vsebnosti NMK, ENMK, VNMK, n-3 VNMK in n-6 VNMK v vzorcih svežih in shranjenih krmnih mešanicah je prišlo do največjega povečanja v vzorcu K+OL in najmanjšega v vzorcu K+EOL, kar je pomenilo, da je dodatek ekstrakta oljčnih listov od vseh najbolj uspešno zaščitil α -linolensko MK (preglednica 16 in slika 12). Dodatek oljčne pulpe je le malo bolje kot ekstrakt oljčnih listov zaščitil še n-6 VNMK. Razmerje med n-3/n-6 VNMK je bilo med shranjevanjem krmnih mešanic najbolj spremenjeno v vzorcu K+OL (za 19,6 %) in najmanj v vzorcu K+EOL (1,5 %). Krmne mešanice z različnimi

krmnimi dodatki so se glede na obseg sprememb v njihovi MK sestavi v treh mesecih shranjevanja razvrstile po naslednjem vrstnem redu (od najmanj do najbolj dostopne lipidni oksidaciji): K+EOL > K+PU > K+EPU > K+SAN > K+VITE > K+OL. Kljub temu so bile razlike med odstopanji minimalne in bi lahko sklepali, da so bile lahko posledica naključnih napak pri določitvah posameznih MK. Na podlagi ugotovitev smo tudi pri maščobnokislinski sestavi sklepali, da med krmnimi mešanici ni prišlo do bistvenih razlik. Do enakih sklepov je prišel tudi Šmon (2013).

V poskusu smo uporabili tudi novo metodo za določanje lipidnih peroksidov, saj jodometričnega določanja (modificirano določevanje peroksidnega števila po Wheelerju) LP v našem poskusu ni bilo mogoče uporabiti zaradi velike količine pigmentov pri ekstrakciji maščob. Zaradi slednjih pri titraciji izločenega joda z raztopino $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ v prisotnosti škrobovice kot indikatorja ne bi prišlo do zelenega barvnega preskoka. Zato smo za določevanje LP v krmnih mešanicah uporabili novo metodo PeroxiDetectTM kita, kot jo za določevanje primarnih produktov v substratih bogatih z maščobami priporoča podjetje Sigma-Aldrich. Ta metoda temelji na že uveljavljeni FOX-metodi, kjer se količina LP določa s količino tvorjenja barvnega kompleksa s ksilenol oranžnim, kot posledica oksidacije Fe^{2+} ionov. Metoda se je izkazala za hitro, enostavno, natančno in ekološko manj sporno od dobro uveljavljene jodometrične metode (DeLong in sod., 2002; Yildiz in sod., 2003). Količino sekundarnih produktov oksidacije smo v poskusu določali s tiobarbiturno kislino (TBA). Tako določevanje je v literaturi (Grotto in sod., 2007; Seljeskog in sod., 2006 in Lykkesfeldt, 2001) opisano kot najširše uporabljeno, najhitrejše, najcenejše in je splošno najenostavnejši postopek za merjenje količine TBARS v vzorcih. Uporabili smo spektrofotometrično tehniko, ki temelji na kolorimetričnem določevanju. To tehniko smo uporabili, ker je spektrofotometer enostaven za uporabo, kar pomeni, da se lahko monitoring oksidacijskih produktov izvaja tudi v slabše opremljenih laboratorijih, kot je npr. na farmi pred krmljenjem živali. Z metodama smo tako potrdili hipotezo, da je določanje LP in TBARS mogoče s spektrofotometrijo opraviti natančno, preprosto in hitro ter z ekološko manj obremenjujočimi posledicami.

6 SKLEPI

- Uvedli smo spektrofotometrično metodo za določevanje lipidnih peroksidov (LP) s PeroxiDetect™ kitom. Obe uporabljeni metodi LP in s tiobarbiturno kislino reagirajoče spojine (TBARS) omogočata hitro, enostavno, in natančno določitev primarnih in sekundarnih oksidacijskih produktov v krmnih mešanicah bogatih z n-3 VNMK.
- Pri dodatkih SANOX, vitamina E in oljčnih listov nismo ugotovili večjih odstopanj v učinkovitosti zaviranja lipidne oksidacije v primerjavi s KONT.
- Dodana pulpa in ekstrakta oljčnih listov in pulpe so se izkazali za nekoliko učinkovitejše pri zmanjšanju obsega lipidne oksidacije v primerjavi s KONT. Najbolj učinkovit je bil dodatek ekstrakta oljčnih listov.
- Pri določanju maščobnokislinske sestave krmnih mešanic smo ugotovili, da je najbolj oksidirala α -linolenska MK. Razlike v oksidaciji VNMK med krmnimi mešanicami z dodatki so bile minimalne.
- Iz rezultatov raziskave lahko sklepamo, da je bila krma že sama po sebi zaradi dodatka 6 % ekstra deviškega lanenega olja, ki prav tako vsebuje antioksidante, dovolj zaščitena, ali oksidacijski stres ni bil izzvan v dovolj veliki meri in zato dodatki SANOX, vitamina E, oljčnih listov, pulpe in ekstraktov iz njih niso imeli večjega vpliva na oksidacijsko stabilnost krmnih mešanic.

7 POVZETEK

Neprimerno skladiščenje krmnih mešanic, obogatenih z n-3 večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (VNMK), lahko vodi do nastanka toksičnih produktov oksidacije maščob v krmi, kot so lipidni peroksidi (LP) in različni aldehidi (TBARS) idr. Ker so vsi ti za živali in ljudi toksični, smo želeli v našem poskusu med trimesečnim shranjevanjem krmnih mešanic z dodatki SANOX, vitaminom E in s stranskimi proizvodi oljčne industrije (oljčni listi, pulpa in njuna ekstrakta) ugotoviti, ali lahko ti s svojim antioksidativnim delovanjem zmanjšajo obseg oksidacijskega kvarjenja lipidov. Da bi to ugotovili, smo v krmno mešanico pred začetkom shranjevanja dodali 6 % ekstra deviškega lanenega olja. Obseg lipidne oksidacije v krmnih mešanicah z dodatki smo določali z merjenjem vsebnosti nastalih LP in TBARS. Določali smo tudi maščobnokislinsko sestavo pred in po shranjevanju, da bi ugotovili, v kolikšni meri je oksidacija vplivala na vsebnosti VNMK. Vpeljali smo tudi novo metodo za določanje vsebnosti lipidnih peroksidov s PeroxiDetect™ kitom, ki je zaradi enostavnosti zelo primerna za določanje v laboratorijih s slabšo opremo.

Krmne mešanice smo shranjevali v plastičnih posodah s priprtim pokrovom pri sobni temperaturi (20 ± 5 °C). Med poskusom smo vsak teden odvzeli en alikvot vsakega vzorca in ga zamrznili pri temperaturi - 70 °C do analize. Osnovna krmna mešanica je bila pri vseh enaka, dodali smo različne sintetične ali naravne antioksidante. Krmni mešanici KONT nismo dodali antioksidantov, krmni mešanici K+VITE smo dodali 150 IU/ kg vitamina E, krmna mešanica K+OL je imela dodan 1 % posušenih mletih oljčnih listov, krmna mešanica K+EOL je imela dodan etanolni ekstrakt iz ekvivalentne količine v krmo dodanih (10 g/kg krme) oljčnih listov, krmna mešanica K+PU je imela dodan 1 % dodatek oljčne pulpe in krmna mešanica K+EPU je imela dodan etanolni ekstrakt iz ekvivalentne količine v krmo dodane (10 g/kg krme) oljčne pulpe.

Iz rezultatov analiz krmnih mešanic med shranjevanjem smo sklepali, da dodatki SANOX, vitamina E in oljčnih listov niso bistveno odstopali v učinkovitosti zaviranja lipidne oksidacije krmnih mešanic v primerjavi s KONT, hkrati pa so se dodatki ekstrakta oljčnih listov in pulpe ter pulpa izkazali za nekoliko učinkovitejše pri zmanjšanju obsega lipidne oksidacije krmnih mešanic. Pri določanju maščobnokislinske sestave krmnih mešanic smo ugotovili, da je najbolj oksidirala α -linolenska MK. Razlike v lipidni oksidaciji med krmnimi mešanicami so bile minimalne, zato smo sklepali, da med njimi ni prišlo do bistvenih razlik v oksidaciji, saj je bila dovolj dobro zaščitena že osnovna krmna mešanica KONT z dodatkom 6 % ekstra deviškega lanenega olja, ki prav tako vsebuje antioksidante in je samo po sebi dovolj zaščitena pred lipidno oksidacijo.

8 VIRI

- Abram V. 1995. Kinetika oksidacije lipidov. V: Klofutar C. (ur.), Hribar J. (ur.), Žlender B. (ur.), Plestenjak A. (ur.), Pokorn J. (ur.), Rudan-Tasič D. (ur.), Wondra M. (ur.). Podaljšanje obstojnosti živil. 17. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 8.-10. jun. 1995. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 77-86
- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Žlender B. (ur.), Gašperlin L. (ur.). Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. okt. 2000. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Bandelj Mavsar D., Bučar-Miklavčič M., Mihelič R., Podgornik M., Raffin G., Režek Donev N., Valenčič V. 2008. Sonaravno ravnanje z ostanki predelave oljk. Koper, Založba Annales: 91 str.
- Bautista-Teruel M. N., Subosa P. F. 1999. Butylated hydroxytoluene: its effect on quality of shrimp diet stored at various temperatures and on growth and survival of *Penaeus monodon* juveniles. *Aquaculture*, 179: 403-414
- Benavente-García O., Castillo J., Lorente J., Ortuno A., Del Rio J. A. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea Europaea L.* leaves. *Food Chemistry*, 68: 457-462
- Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. 2004. Food chemistry. 3rd revised ed. Berlin, Springer: 1077 str.
- Botsoglou E., Govaris A., Ambrosiadis J., Fleutoris D. 2012a. Lipid and protein oxidation of α -linolenic acid-enriched pork during refrigerated storage as influenced by diet supplementation with olive leaves (*Olea europaea L.*) or α -tocopheryl acetate. *Meat Science*, 92, 3: 165-302
- Botsoglou E., Govaris A., Fletouris D., Botsoglou N. 2012b. Lipid oxidation of stored eggs enriched with very long chain *n*-3 fatty acids, as affected by dietary leaves (*Olea europaea L.*) or α -tocopheryl acetate supplementation. *Food Chemistry*, 134: 1059-1068
- Bouaziz M., Fki I., Jemai H., Ayadi M., Sayadi S. 2008. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108: 253-262
- Butinar B., Bučar-Miklavčič M. 2000. Tokoferoli in polifenoli v oljčnih oljih slovenske Istre. V: Žlender B. (ur.), Gašperlin L. (ur.). Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. okt. 2000. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 77-91
- Cardoso S. M., Guyot S., Marnet N., Lopes-da-Silva J. A., Renard C. M: G. R., Coimbra M. A. 2005. Characterization of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 21-32
- CODEX STAN 19-1981. Codex standard for edible fats and oils not covered by individual standards. 1981: 5 str.
- CODEX STAN 210-1999. Codex standard for named vegetable oils. 1999: 16 str.

- Connor W. E. 2000. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71:171-175
- Coppen P. P. 1994. The use of antioxidants. V: Allen, J.C. (ed.), Hamilton R.J.(ed.). *Rancidity in foods*. London, Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall: 84-103
- Dai J., Mumper R. J. 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15: 7313-7352
www.mdpi.com/1420-3049/15/10/7313/pdf (27. jun. 2013)
- DeLong J. M., Prange R. K., Hodges D. M., Forney C. F., Bishop M. C., Quilliam M. 2002. Using a Modified Ferrous Oxidation-Xylenol Orange (FOX) Assay for Detection of Lipid Hydroperoxides in Plant Tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 248-254
- Dibner J. J., Atwell C. A., Kitchell M. J., Shermer W. D., Ivey F. J. 1996. Feeding of oxidized fats to broilers and swine: effects on enterocyte turnover, hepatocyte proliferation and the gut associated lymphoid tissue. *Animal Feed Science Technology*, 62: 1-13
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). 2011. Scientific opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), "anti-inflammatory properties" (ID 1882), "contributes to the upper respiratory tract health" (ID 3468), "can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract" (3779), and "contributes to body defences against external agents" (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9, 4: 2033
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2033.pdf> (2. apr. 2013)
- Esterbauer H. 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *American Journal of Clinical Nutrition*, 57: 779-86
- Fraeye I., Bruneel C., Lemanieu C., Buyse J., Muylaert K., Foubert I. 2012. Dietary enrichment of eggs with omega-3 fatty acids: A review. *Food Research International*, 48: 961-969
- Frankič T., Salobir J. 2007. Antioksidanti v prehrani živali. V: Zbornik predavanj 16. Mednarodnega znanstvenega posvetovanja o prehrani domačih živali, »Zdravčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 8.-9. nov. 2007. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije: 27-40
- Frankič T., Voljč M., Rezar V., Salobir J. 2008. Rastlinski ekstrakti v prehrani živali. V: Zbornik predavanj 17. Mednarodnega znanstvenega posvetovanja o prehrani domačih živali, »Zdravčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 13.-14. nov. 2008. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije: 10-22
- Functional Foods. 2010. Luxembourg, Publications Office of the European Union: 24 str.
ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/fp7/kbbe/docs/functional-foods_en.pdf (26. jun. 2013)

- García-Rebollar P., Cachalodra P., Alvarez C., De Blas C., Méndez J. 2008. Effect of the combined supplementation of diets with increasing levels of fish and linseed oils on yolk fat composition and sensorial quality of eggs in laying hens. *Animal Feed Science and Technology*, 140: 337-348
- Grotto D., Santa Maria L. D., Boeira S., Valentini J., Charão M. F., Moro A. M., Nascimento P. C., Pomblum V. J., Garcia S. C. 2007. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43: 619-624
- Hall C. 3rd, Tulbek M. C., Xu Y. 2006. Flaxseed. V: *Advances in food and nutrition research*. Vol. 51. Taylor S.Y (ed.). Amsterdam, Elsevier: 1-97
- Halliwell B., Aeschbach R., Lölliger J., Aruoma O. I. 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chemical Toxicology*, 33, 7: 601-617
- Hamre K., Kolås K., Sanders K. 2010. Protection of fish feed, made directly from marine raw materials, with natural antioxidants. *Food Chemistry*, 119: 270-278
- Isa Brown: Commercial Management Guide. 2010. A Hendrix Genetics Company http://www.morrishatchery.com/mngmt_guides/ISA%20Brown%20Guide-Nov.%203,2010.pdf (20. dec. 2012)
- Isa Brown: Nutrition Management Guide. 2011. A Hendrix Genetics Company. <http://www.isapoultry.com/Products/ISA/~media/Files/ISA/ISA%20product%20information/ISA/Commercials/2011%20Nutrition%20management%20guide%20commercials%20ISA%20brown%20nieuw%201.ashx> (20. dec. 2012)
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Žlender B. (ur.), Gašperlin L. (ur.). *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. okt. 2000. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-23
- Laguette M., Lecomte J., Villeneuve P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46: 244-282
- Lee O.-H., Lee B.-Y., Lee J., Lee H.-B., Son, J.-Y., Park C.-S., Shetty K., Kim Y.-C. 2009. Assessment of phenolic-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresource Technology*, 100: 6170-6113
- Leeson S., Summers J. D. 2008. *Commercial poultry nutrition*. 3rd edition. Guelph, Nottingham University Press: 398 str.
- Lykkesfeldt J. 2001. Determination of Malondialdehyde as Dithiobarbituric Acid Adduct in Biological Samples by HPLC with Fluorescence Detection: Comparison with Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. *Clinical Chemistry*, 47, 9:1725-1727
- Lupšina K. 2013. Vpliv oljčnih listov in pulpe na antioksidativni status kokoši in oksidativno stabilnost jajc. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 47 str.
- Machlin L. J. 1991. *Handbook of vitamins*. 2nd edition. New York, Marcel Dekker: 595 str.

- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-47
- Muggli R. 1994. Physiological Requirements of Vitamin E as a Function of the Amount and Type of Polyunsaturated Fatty Acid. *Review of Nutrition and Dietetics*, 75: 166-168
- Nutrient Requirements of Poultry. 9th edition. 1994. Subcommittee on Poultry Nutrition, National Research Council.
<http://www.lamolina.edu.pe/zootecnia/biblioteca2012/NRC%20Poultry%201994%5B1%5D.pdf>
- Njobeh P. B., Iji P. A., Nsahlai I. V. 2006. Influence of Composition and Storage Conditions on the Concentrations of Free Fatty Acids and Peroxides in Broiler Diets. *International Journal of Poultry Science*, 5, 3: 279-283
<http://www.docsdrive.com/pdfs/ansinet/ijps/2006/279-283.pdf> (15.mar. 2013)
- Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the Commission related to nutrition claims concerning omega-3 fatty acids, monounsaturated fat, polyunsaturated fat and unsaturated fat. 2005. *The EFSA Journal*, 253:1-29
<http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/253.pdf> (9. feb. 2013)
- Park P. W., Goins R. E. 1994. In Situ Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Analysis of Fatty Acid Composition in Foods. *Journal of Food Science*, 59, 6: 1262-1266
- Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Bioproceni pridobivanja antioksidantov. V: Žlender B. (ur.), Gašperlin L. (ur.). *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. okt. 2000. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39-51
- Rezar V. 2010. Zaščita mesa pred lipidno peroksidacijo. V: Zbornik predavanj 19. Mednarodnega znanstvenega posvetovanja o prehrani domačih živali, »Zdravčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 11.-12. nov. 2010. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije: 62-73
- Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q₁₀. V: Žlender B. (ur.), Gašperlin L. (ur.). *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. okt. 2000. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 287-294
- Salobir J. 2004. Prehrana kokoši nesnic, jarčk in pitovnih piščancev. V: Reja kokoši v manjših jatah. Slekovec A. (ur.). Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 131-172
- Salobir K. 2000. Antioksidanti v živilih – vpliv na zdravje. V: Žlender B. (ur.), Gašperlin L. (ur.). *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. Okt. 2000. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 287-294
- Salobir K. 2001. Prehranska funkcionalnost maščob. V: Žlender B., Gašperlin L. (ur.). *Funkcionalna hrana*. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož 8. in 9. november 2001. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 121-135
- Sansoucy, R. 1985. Olive by-products for animal feed. *FAO animal production and health*. Paper 43. Rome, Food and agriculture organization of the united nations.
<http://www.fao.org/docrep/003/X6545E/X6545E00.htm#TOC> (15. jan. 2013)

- Seljeskog E., Hervig T., Mansoor M. A. 2006. A novel HPLC method for measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clinical Biochemistry*, 39: 947-954
- Shi H., Noguchi N., Niki E. 2001. Introducing natural antioxidants. V: *Antioxidants in food. Practical applications*. Pokorny J., Yanishlieva N. Gordon M. (eds.). Cambridge, England, Woodhead Publishing Limited: 147-155
- Škvarča M. 2000a. Zdravstveni vidiki razgradnje maščob med skladiščenjem in pripravo mesa. V: *Žlender B. (ur.), Gašperlin L. (ur.). Meso in mesnine za kakovostno prehrano*. Portorož, 10.-11. feb. 2000. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 136-151
- Škvarča M. 2000b. Učinek antioksidantov na kakovost maščob. V: *Žlender B. (ur.), Gašperlin L. (ur.). Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. okt. 2000. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 179-190
- Soni M. G., Burdock G. A., Christian M. S., Bitler C. M., Crea R. 2006. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 903-915
- Syed Haris O. 2010. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scientia Pharmaceutica*, 78: 133-154
- Šmon A. 2013. Določanje izbranih produktov oksidacije maščobnih kislin v krmi. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerzitetni študijski program biokemija: 63 str.
- Vesel V., Valenčič V., Jančar M., Čalija D., Butinar B., Bučar-Miklavčič M. 2009. *Oljka – živilo, zdravilo, lepotilo*. Ljubljana, Založba kmečki glas: 141 str.
- Voljč M. 2012. Vpliv kostanjevega tanina, RRR- α in all-rac- α -tokoferola na zmanjšanje oksidacijskega stresa prašičev in izboljšanje oksidacijske stabilnosti njihovega mesa. Doktorska disertacija. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 86
- Yegani M., Miles R. J., Nilipour A. H., Butcher G. D. 2001. Vitamin C-Practical applications in modern poultry production. *World Poultry*, Elsevier, 17, 10: 18-19 http://www.worldpoultry.net/PageFiles/29880/001_boerderij-download-WP6115D01.pdf (15. mar. 2013)
- Yildiz G., Wehling R. L., Cuppett S. L. 2003. Comparison of Four Analytical Methods for the Determination of Peroxide Value in Oxidized Soybean oils. *Journal of the American Chemists' Society*, 80: 103-107
- Wanasundara P. K. J. P. D., Shahidi F. 2005. *Antioxidants: Science, Technology, and Applications*. V: *Bailey's Industrial Oil and Fat products*. 6th edition. Shahidi F. (ed.). Saskatoon, John Wiley & Sons: 431-489
- Wardhani D.H. Fuciños P., Vázquez J.A., Pandiella S.S. 2013. Inhibition kinetics of lipid oxidation of model foods by using antioxidant extract of fermented soybeans. *Food Chemistry*, 139: 837-844
- WHO/FAO. 2010. *Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation*. Rome, FAO food and nutrition paper: 91 str. <http://www.fao.org/docrep/013/i1953e/i1953e00.pdf> (14. feb. 2013)

ZAHVALA

Prisrčno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Vidi Rezar in somentorici asist. dr. Alenki Levart za veliko potrpljenja, koristnih nasvetov in razumevanja pri izdelavi naloge. Hvala za vloženi čas in vse mogoče strokovne razlage.

Zahvala gre tudi predsednici komisije prof. dr. Antoniji Holcman in recenzentu prof. dr. Janezu Salobirju za hiter in strokoven pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi tehnični sodelavki Anici Mušič za vso pomoč pri opravljanju analiz, za angažiranost in dobro voljo. V veselje, mi je bilo delati v laboratoriju z vami.

Za pomoč pri navajanju virov se zahvaljujem gospe Jerneji Bogataj in dr. Nataši Siard za hiter pregled angleškega izvlečka.

Seveda dolgujem veliko zahvalo gospe Sabini Knehtl. Hvala vam za podporo pri administrativnih zadevah in vedno vnovično voljo za pomoč študentom. S svojim delom ste mi precej olajšali študij.

Maja J., Jasmina, Mojca, Anika, Jera, Maja M. in Toni hvala vam za smeh, dobro voljo in mnogo konstruktivnih debat ob kavnem avtomatu. Polepšali ste mi študij in dali veliko nasvetov iz prakse, da sem kot »mestno dekle« lažje razumela predavanja. Veseli me, da sem dobila resnično dobre prijatelje, ki boste hodili ob meni celo življenje.

Mami iskrena hvala ti, ker si mi omogočila študij, ker si verjela vame, ker si me naučila delavnosti in mi dala prave vrednote, ki so me naredile spoštovanja vrednega človeka. Maša hvala ker me podpiraš in včasih postavljaš na realna tla. Omi hvala ti!

Jernej hvala ti, ker verjameš vame in mi daješ moč, upanje ter voljo, da dosežem svoje cilje.

Tadeja hvala za lektoriranje in vso ostalo podporo.