

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Irena KOKALJ

**UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE
KAPACITETE STORŽKOV HMELJA PRI PITOJNIH
PIŠČANCIH**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Irena KOKALJ

**UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE STORŽKOV
HMELJA PRI PITOVIH PIŠČANCIH**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**DETERMINATION OF ANTIOXIDATIVE CAPACITY OF HOP
CONES IN BROILERS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Z magistrskim delom končujem magistrski študijski program 2. stopnje Znanost o živalih. Delo je bilo opravljeno na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Vido Rezar in za 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:

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

Irena Kokalj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK636.5.084/.087(043.2)=163.6
- KG perutnina/pitovni piščanci/prehrana živali/meso/hmelj/hmeljevi storžki/antioksidativna kapaciteta/oksidativna stabilnost
- AV KOKALJ, Irena, dipl. inž. kmet. zoot. (UN)
- SA REZAR, Vida (mentorica)/LEVART, Alenka (somentorica)
- KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- LI 2015
- IN UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE STORŽKOV HMELJA PRI PITOVIH PIŠČANCIH
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij Znanosti o živalih, 2. stopnja)
- OP IX, 64 str., 12 pregl., 6 sl., 98 vir.
- IJ sl
- JJ sl/en
- AI Hmelj je potencialno zanimiv krmni dodatek zaradi svojih antioksidativnih in antimikrobnih lastnosti. V raziskavi so nas zanimale antioksidativne lastnosti storžkov hmelja, njihov vpliv na zdravje in proizvodnost živali ter na kakovost mesa. V poskus smo vključili 84 dan starih pitovnih piščancev. Oksidacijski stres smo izzvali z dodatkom 7,5 % lanenega olja v krmo živali, s tem smo povečali potrebe živali po antioksidantih. Piščance smo razdelili v tri skupine ter jih dnevno, po volji, krmili s pripadajočo krmno mešanico. Osnovni krmni mešanici smo dodali nič (KONT), 0,9 (KONT_0,9) ali 3,6 (KONT_3,6) kg hmelja/t krmne mešanice. Poskus je trajal 37 dni. V tem obdobju smo tedensko spremljali individualne priraste. Vpliv dodatka na zdravje živali smo ovrednotili s kometnim testom in določanjem koncentracije malondialdehida (MDA) v krvni plazmi. Ob koncu poskusa smo živali žrtvovali ter ovrednotili oksidativno stabilnost in fizikalne lastnosti (pH, barva, električna prevodnost, izceja) prsne mišičnine. Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da je večja vsebnost hmelja v krmi negativno vplivala na prirast živali. Pri ugotavljanju oksidativnega statusa živali in oksidacijske stabilnosti mesa smo ugotovili, da je hmelj statistično značilno povečal koncentracijo MDA v plazmi in prsni mišičnini. Analiza kakovosti mesa je pokazala, da dodatek hmelja ni vplival na pH, električno prevodnost in izcejo. Značilno pa je vplival na barvo mesa, kjer je povečal intenziteto rumenega odtenka. Za uporabo hmelja v prehrani piščancev in za potrditev naših rezultatov bodo potrebne dodatne raziskave.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du2
- DC UDC636.5.084/.087(043.2)=163.6
- CX poultry/broilers/animal nutrition/meat/hop/hop cones/antioxidative capacity/oxidative stability
- AU KOKALJ, Irena
- 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 2015
- TY DETERMINATION OF ANTIOXIDATIVE CAPACITY OF HOP CONES IN BROILERS
- DT M. Sc. Thesis (Master study Programmes)
- NO IX, 64 p., 12 tab., 6 fig., 98 ref.
- LA sl
- AI sl/en
- AB Hops could be an interesting additive in animal nutrition due to its antioxidative and antimicrobial properties. In our study we investigated the antioxidant properties of hop cones, and the effect of hop cones supplementation on health of animals, their performance, and meat quality. 84 one-day-old broiler chickens were included in the experiment. Oxidative stress was induced by the addition of 7.5 % of linseed oil in animal feed. The chickens were divided into three groups, and were fed with the experimental diet mixtures. The basal diet was not supplemented (KONT), while other two groups (KONT_0,9 and KONT_3,6) were supplemented with 0.9 or 3.6 kg hops/t of feed, respectively. The experiment lasted 37 days. During this period individual growth rates was measured weekly. The effect of supplement on the animal's health was evaluated using comet assay and by measurement of malondialdehyde (MDA) concentration in blood plasma. At the end of the experiment, the animals were slaughtered. Quality indices (pH, colour, electrical conductivity and drip loss) and oxidative stability of the breast muscle were evaluated. Based on the results, we can conclude that the higher hop concentration in the diet negatively affects the growth of the animals. Supplementation of hops statistically significant increased the concentration of MDA in plasma and breast muscle. The analysis of the meat quality shows that the addition of hops has no effect on pH, electrical conductivity and drip loss. The significant differences between the groups were observed in meat colour, where hop supplement increased intensity of yellow colour. For use of hops in broiler nutrition and to confirm our results further experiments are needed.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
SEZNAM GESEL	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 OKSIDACIJSKI STRES	4
2.1.1 Malondialdehid (MDA).....	5
2.1.2 Kometni test	6
2.2 ANTIOKSIDANTI.....	7
2.3 RASTLINSKI DODATKI V KRMI	12
2.4 HMELJ IN NJEGOVE UČINKOVINE.....	14
2.4.1 Hmeljevi storžki.....	15
2.4.2 Grenčični kislini.....	17
2.4.3 Ksantohumol	18
2.5 HMELJ KOT RASTLINSKI DODATEK V PREHRANI ŽIVALI.....	19
3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 MATERIAL	23
3.1.1 Zasnova poskusa.....	23
3.1.2 Sestava krmnih mešanic.....	23
3.1.3 Priprava dodatka.....	26
3.2 METODE	27
3.2.1 Izvedba poskusa.....	27
3.2.2 Zbiranje vzorcev in njihova priprava za analize	27
3.2.2.1 Odvzem vzorcev krvi.....	27

3.2.2.2	Odvzem vzorcev prsne mišičnine.....	28
3.2.3	Oksidativna stabilnost krme.....	29
3.2.3.1	Določanje malondialdehida v vzorcih krme.....	29
3.2.4	Določanje malondialdehida v krvni plazmi in kometni test	29
3.2.4.1	Določanje malondialdehida v vzorcih krvne plazme	29
3.2.4.2	Ovrednotenje poškodb DNK limfocitov s kometnim testom	30
3.2.4.2.1	Izolacija limfocitov.....	30
3.2.4.2.2	Izvedba kometnega testa.....	30
3.2.5	Oksidativna stabilnost in kakovost mesa	31
3.2.5.1	Določanje malondialdehida v vzorcih prsne mišičnine.....	31
3.2.5.2	pH mesa	33
3.2.5.3	Barva mesa	33
3.2.5.4	Električna prevodnost in izceja mesa	33
3.2.6	Statistična obdelava podatkov.....	34
4	REZULTATI.....	35
4.1	PROIZVODNE LASTNOSTI PIŠČANCEV.....	35
4.2	OKSIDATIVNA STABILNOST KRME.....	37
4.2.1	Koncentracija malondialdehida (MDA) v krmni mešanici in hmelju	37
4.3	OKSIDATIVNI STRES IN POŠKODBE DNK LIMFOCITOV	38
4.4	OKSIDATIVNA STABILNOST IN KAKOVOST MESA.....	39
4.4.1	Koncentracija MDA v prsni mišičnini.....	39
4.4.2	Kakovost mesa	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	43
5.1	RAZPRAVA.....	43
5.2	SKLEPI.....	52
6	POVZETEK.....	53
7	VIRI	55
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Stopnje poškodb jedrne DNK od najmanj poškodovane (A), do zelo poškodovane (D) (Cortés-Gutiérrez in sod., 2011: 657).....	7
Slika 2: Pridelava hmelja v Sloveniji (ton/leto) (SURS, 2015).....	15
Slika 3: Storžki sorte Dana (foto F. Korber, povzeto po Čerenak, 2012: 17)	16
Slika 4: Kemijska struktura hmeljevih grenčičnih kislin humulona in lupulona (Zanoli in Zavatti, 2008: 386).....	17
Slika 5: Kemijska struktura ksantohumola (Zanoli in Zavatti, 2008: 387)	18
Slika 6: Delitev vzorcev prsne mišičnine	28

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Sestava osnovne krmne mešanice za pitovne piščance (g/kg)	24
Preglednica 2: Sestava premiksa za vse skupine	24
Preglednica 3: Kemijska sestava krme (g/kg)	25
Preglednica 4: Maščobnokislinska sestava krmnih mešanic in hmelja (g MK/100 g vsote MK).....	25
Preglednica 5: Telesne mase piščancev in zauživanje krme do 14. dne.....	35
Preglednica 6: Proizvodni rezultati piščancev na koncu poskusa (37. dan).....	35
Preglednica 7: Telesne mase piščancev 21. in 37. dan poskusa ter masa polovice prsne mišičnine (LSM ± standardna napaka)	36
Preglednica 8: Rezultati analiz MDA v krmnih mešanicah in hmelju	37
Preglednica 9: Rezultati analiz MDA v plazmi in kometnega testa (LSM ± standardna napaka).....	38
Preglednica 10: Rezultati analiz MDA v prsni mišičnini (LSM ± standardna napaka)	39
Preglednica 11: Rezultati meritev fizikalnih lastnosti mesa (LSM ± standardna napaka)..	40
Preglednica 12: Rezultati merjenja barve mesa po dnevih (LSM ± standardna napaka)	41

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BHA	- butilhidroksi anizol
BHT	- butilhidroksitoluen
DHK	- dokozaheksaenojska kislina
DNK	- deoksiribonukleinska kislina
EDTK	- etilendiamintetraocetna kislina
EPK	- eikozapentaenojska kislina
HPLC	- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
LDL	- low density lipoproteins (lipoproteini nizke gostote)
MDA	- malondialdehid
MK	- maščobne kisline
MQ	- Milli Q voda
NADPH	- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMK	- nasičene maščobne kisline
OTM	- Olive tail moment (repni moment po Olivu)
PKM	- popolna krmna mešanica
SS	- suha snov
SURS	- Statistični urad Republike Slovenije
TBK	- tiobarbiturna kislina
TBHQ	- butilhidroksikinon
TCK	- triklorocetna kislina
TEP	- 1,1,3,3-tetraetoksipropan
VNMK	- večkrat nenasičene maščobne kisline

SEZNAM GESEL

- Ekstrakt:** je z različnimi topili pridobljena trdna ali tekoča snov določene substance (npr. rastlin).
- Fenoli:** so v vodi topne karboksilne spojine.
- Flavonoidi:** so rastlinski pigmenti z antioksidativno sposobnostjo.
- Izkoristljivost hranil:** z izkoristljivostjo hranil označujemo delež hranljivih snovi, ki se absorbira v prebavilih živali, zmanjšan za endogene izgube.
- Lipidna oksidacija:** je nekontrolirana oksidacija lipidov.
- Oksidativna stabilnost:** z oksidativno stabilnostjo opisujemo stanje ko so prosti radikali in antioksidanti v ravnovesju.
- Polifenoli:** so sekundarni metaboliti rastlin, za katere je značilno povezovanje več fenolnih spojin v enotno strukturo. Pripisujemo jim najrazličnejše načine delovanja, kot je antioksidativno, antimikrobno, antiinflamatorno.
- Prooksidant:** atom ali molekula, ki s sprejemanjem elektronov omogoči oksidacijo drugega atoma ali molekule.

1 UVOD

Ozaveščanje in zahteva porabnikov po zagotavljanju varne in kakovostne hrane je spodbudila uporabo naravnih krmnih dodatkov v reji živali. S prepovedjo uporabe nutritivnih antibiotikov v EU so se stroški reje povečali, zato se iščejo učinkoviti naravni nadomestki. Potencialen naraven antibiotik in antioksidant predstavlja hmelj. Njegova učinkovitost je poznana že iz pivovarske industrije, kjer se primarno uporablja za dodajanje arome ter antimikrobno in antioksidativno zaščito piva. Zaradi slednjih pozitivnih lastnosti bi ga lahko uporabljali v živinoreji, kot naravni krmni dodatek z namenom zmanjšanja uporabe sintetičnih dodatkov. To še posebno velja za antioksidante, ki so pomemben dodatek krmi. Uporaba naravnih antioksidantov je ključna za ohranjanje zdravja živali, kakovosti živalskih proizvodov in posredno zdravja ljudi ter zmanjševanje onesnaženosti okolja.

Uporabo hmelja kot prehranski dodatek so spodbudila tudi nihanja na trgu hmelja, ki so imela za posledico presežke hmelja na svetovni ravni. Velike zaloge so posledica velike pridelave in uvedbe novih tehnologij konzerviranja hmelja. Razmere na trgu so vplivale tudi na slovensko hmeljarstvo, saj se je pridelava hmelja v zadnjih letih zmanjšala. Zato bi dodaten vir uporabe hmelja koristil tudi slovenskim trgom in tako pomagal ohraniti raznolikost in konkurenčnost slovenskega kmetijstva.

Krma in živali pa niso izpostavljene samo mikrobnim aktivnostim temveč tudi oksidacijskemu stresu. Ta v reji živali predstavlja velik problem, saj so živali, ki so izpostavljene oksidacijskemu stresu manj produktivne, zaradi slabše zaščite pa je omejena uporaba njihovih proizvodov. Piščanci imajo zaradi hitre rasti velike potrebe po energiji, zato je njihova prehrana bogata z maščobami. Vir maščob v krmi največkrat predstavljajo rastlinska olja, ta pa so bogata z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (VNMK). Uporaba VNMK v prehrani živali je vse pogostejša z namenom pridobivanja funkcionalnih živil. Zaradi velike vsebnosti VNMK, ki so zelo nestabilne molekule ter nepravilnega konzerviranja in skladiščenja krme, prihaja do procesa oksidacije lipidov. Za zmanjšanje oksidacijskega stresa, ki je posledica porušenega ravnovesja med prostimi radikali in antioksidanti, slednje dodajamo v krmo, da zaščitimo organizem živali.

Kar nekaj avtorjev kot učinkovit vir antioksidantov navaja različne rastlinske dodatke. Ti so bogati z bioaktivnimi snovmi, ki imajo ugodne učinke na organizem. Njihova uporaba v prehrani ljudi in živali je zelo pomembna saj izboljšujejo proces prebave, uravnavajo črevesno floro ter povečujejo apetit. Med bioaktivne snovi štejemo tudi flavonoide, ki jih najdemo v vseh rastlinah, vendar v različnih koncentracijah. Flavonoidi imajo veliko sposobnost uničevanja prostih radikalov in aktiviranja antioksidantnih encimov (Procházková in sod., 2011). Antioksidativna sposobnost rastlinskih dodatkov se kaže tudi v zaščiti živalskih proizvodov, tako Loetscher in sod. (2013) navajajo pozitivne učinke listov rožmarina, koprive ter plodu aronije in šipka na oksidacijsko stabilnost mesa. Kim in sod. (2009) opisujejo česen in njegovo lupino, kot učinkovit vir antioksidantov. Dodatek česna in njegove lupine je zmanjšal oksidacijo lipidov in s tem povezano nastajanje s tiobarbiturno kislino reagirajoče spojine v piščančji prsni mišičnini, vendar je njegova vsebnost vplivala na senzorične lastnosti mesa. Zanimivo antioksidativno delovanje velja tudi za sojine izoflavone. Njihova vsebnost v krmi je povečala antioksidativno kapaciteto merjeno z določanjem MDA v plazmi in prsni mišičnini (Jiang in sod., 2007).

Vir antioksidativne in antimikrobne zaščite predstavlja tudi hmelj. Ključno vlogo pri antioksidativni kapaciteti hmelja imajo polifenoli (ksantohumol, izoksanthumol in prenilnaringenini), ki so znani po antioksidativnih, antimikrobnih, antimutagenih lastnostih, delujejo pa tudi protivnetno. Hmelj vsebuje tudi druge sekundarne metabolite, med katere štejemo grenčične α in β – kisline, za katere pa je znano antimikrobno delovanje (Krofta in sod., 2008; Van Cleemput in sod., 2009). Njegove antimikrobne lastnosti v krmi in vpliv na piščance so opisali Cornelison in sod. (2006). Veliko je tudi napisanega o njegovi tako antimikrobni, kot antioksidativni zaščiti piva (Stavri in sod., 2004). Antioksidativna kapaciteta hmelja pri živalih še ni dobro poznana. Jakovljević in sod. (2008) so pri belih miškah, katerim so dodajali hmelj, ugotovili izboljšano antioksidativno zaščito jeter. Tudi ob dodatku etanola podganam se je ksantohumol izkazal kot učinkovita zaščita pred nastankom poškodb jeter (Pinto in sod., 2014). Antioksidanti hmelja imajo vlogo tudi pri zaščiti pred razvojem rakavih obolenj. V *in vitro* pogojih je ksantohumol uspešno zmanjšal razvoj in širjenje raka prostate (Delmulle in sod., 2006). Za grenčične kisline je znana njihova antimikrobna učinkovitost. Tako je njihovo dodajanje v

krmo piščancev, statistično značilno zmanjšalo prisotnost bakterije *Clostridium perfringens* v prebavilih (Tillman in sod., 2011).

Nenazadnje hmelj vpliva tudi na zauživanje krme in prirast. V raziskavi vpliva dodatka oranovnega olja ali ekstrakta hmelja v krmo pitovnim piščancem so znanstveniki ugotovili boljše zauživanje krme od 22. dne dalje in večji prirast do 22. dne ob dodatku hmelja v primerjavi s skupino, ki je imela za dodatek oranovo olje in kontrolno skupino brez dodatka. Končna masa živali je bila ob dodatku hmelja ali oranovnega olja enaka kontrolni skupini (Bozkurt in sod., 2009).

Cilj naše raziskave je bil ugotoviti ali:

- dodatek storžkov hmelja v različnih koncentracijah vpliva na zauživanje in izkoriščanje krme ter prirast,
- dodatek storžkov hmelja v različnih koncentracijah vpliva na antioksidativno zaščito živali,
- dodatek storžkov hmelja vpliva na oksidativno stabilnost prsne mišičnine pri različnih pogojih skladiščenja in na njene fizikalne lastnosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDACIJSKI STRES

Med delovanjem organizma prihaja do neravnovesja med prostimi radikali in antioksidanti. Stanje, ko je v organizmu prisotnih več oksidantov kot antioksidantov, imenujemo oksidacijski stres. Prosti radikali so zelo nestabilne in reaktivne oblike molekul, ionov in atomov, ki imajo enega ali več neparnih elektronov. Organizem v normalnih presnovnih procesih sam proizvaja proste radikale, vendar ne vedno v škodo le-tega, ampak tudi kot zaščito pred mikroorganizmi, kot pomoč pri celičnem signaliziranju in regulaciji apoptoze (Frankič in Salobir, 2007; Aruoma, 1998).

Na oksidacijski stres pri ljudeh zaradi povečanega nastajanja prostih radikalov vplivajo na eni strani zunanji dejavniki, kot je zauživanje alkohola (Sun in sod., 1997), kajenje in izpostavljanje cigaretnemu dimu (Nielsen in sod., 1997), prisotnost radioaktivnega in UV sevanja, izpostavljenost ultrazvočnemu in mikrovalovnemu valovanju, psihološka stanja, kot je stres (Sies, 1997), terapija z zdravili, onesnaženo okolje (smog, saje, izpušni plini avtomobilov (Ješe Janežič, 2001), ter na drugi strani tudi prehrana s prevelikim zauživanjem VNMK in prekomerna fizična aktivnost (Bošković, 2009). Večina biološko pomembnih prostih radikalov izhaja iz kisika in dušika, ki ju zgoraj omenjeni dejavniki lahko spremenijo v molekule, ki največkrat poškodujejo nukleinske kisline, lipide in beljakovine. Zaradi teh poškodb je moteno prepisovanje DNK, sinteza beljakovin, transport ionov, aktivnost encimov ter druge napake, ki vodijo v slabše delovanje organov in sistemov in v bolezenska stanja (Surai in sod., 2003).

Za nekatera bolezenska stanja pri ljudeh in povečanje dejavnikov tveganja za razvoj le-teh je dokazano, da so nastala kot posledica delovanja prostih radikalov. Aruoma (1998) je med te bolezni uvrstil različna rakava obolenja, bolezni prebavnega trakta, oči (degenerativne poškodbe mrežnice), srca in ožilja (ateroskleroza), ledvic, pljuč, rdečih krvničk in bolezni živčevja (Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen).

Negativni vpliv oksidacijskega stresa se kaže tudi pri živalih. Ta je največkrat povezan z neprimernim okoljem (temperatura, zračenje hleva, gostota naselitve, dostopnost krme in vode) in prehrano z veliko vsebnostjo maščob in majhno vsebnostjo antioksidantov (Betti

in sod., 2009; Cortinas in sod., 2005). Fellenberg in Speisky (2006) kot posledico oksidativnega stresa navajata slabši prirast pitovnih piščancev in slabšo oksidativno stabilnost mesa. Takšno meso ima krajši rok uporabe, zaradi oksidacije maščob, ki so prisotne v mesu pride do žarkosti. Takšno meso ni okusno, ima neprijeten vonj, slabšo strukturo in videz, manjšo hranilno vrednost. Je slabše kakovosti in nezanimivo za porabnika. Tavárez in sod. (2011) so v poskusu krmili pitovne piščance z oksidiranim in svežim sojinim oljem. Cilj raziskave je bil ugotoviti, kako krma z dodatkom oksidiranega olja vpliva na rast živali, kakovost mesa in oksidativni status. Skupina piščancev, ki je bila krmljena z oksidiranim oljem je zaužila manj krme zato je bila lažja, imela je manjši prirast in slabše izkoriščanje krme kot skupina, krmljena s svežim oljem. Oksidirano olje je zmanjšalo intenzivnost rumenega odtenka mesa, medtem ko pri merjenju rdečega odtenka in svetlosti mesa prsne mišičnine med skupinama ni bilo razlik. Prav tako ni bilo razlik v strižni sili in izceji, kar je v nasprotju z Zhang in sod. (2011), ki navajajo, da meso prsne mišičnine piščancev, ki so bili krmljeni z oksidiranimi maščobami slabo zadržuje vodo in ima večjo izcejo kot kontrolna skupina. Krmljenje z oksidiranim oljem je povzročilo povečano oksidacijo maščob v vzorcih mesa ne pa v plazmi.

Kljub številnim opravljenim raziskavam na temo zaščite zdravja ljudi, živali in njihovih proizvodov pred oksidacijskih stresom, še vedno ostaja najlažja in najbolj učinkovita metoda zadostno uživanje antioksidantov.

Oksidacijski stres lahko ovrednotimo z merjenjem oksidacijskih produktov. Za merjenje oksidacijskih produktov je razvitih več metod, vendar se največkrat uporablja metoda za določitev malondialdehida, ki je sekundarni produkt lipidne oksidacije. Poleg merjenja oksidacijskih produktov lahko oksidacijski stres merimo tudi direktno s testi za merjenje poškodb DNK. Tu se največkrat uporablja dokaj enostaven, hiter in natančen kometni test.

2.1.1 Malondialdehid (MDA)

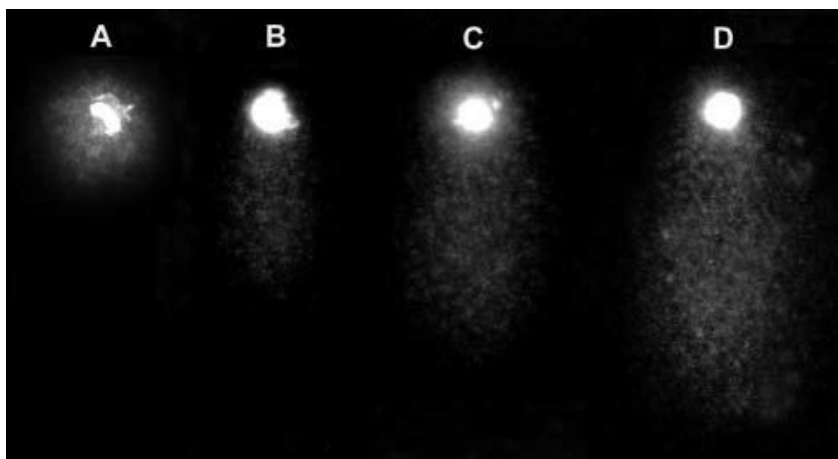
Malondialdehid je aldehyd z dolgo življenjsko dobo, ki nastane pri lipidni peroksidaciji ali lipidni avtooksidaciji. Med tem procesom iz VNMK, še posebno tistih, ki imajo dve ali več dvojnih vezi, nastajajo različni produkti. Med nastale sekundarne produkte štejemo tudi malondialdehid (1,3-propandial) (Ješe Janežič, 2001; Rezar, 2001).

MDA je najpogosteje uporabljena spojina za merjenje lipidne peroksidacije. Lahko ga določamo z merjenjem kompleksa MDA-DAN (diaminonaftalen), ki reagira le z MDA in ne z ostalimi snovmi v mediju (Karatas in sod., 2002) ali MDA-TBK, ki je najpogosteje uporabljena metoda. Pri reakciji s tiobarbiturno kislino (TBK) nastane rožnato obarvan produkt (Wong in sod., 1987). Za nastanek kompleksa MDA-TBK je potrebno kislo okolje, saj se takrat MDA sprosti, poleg tega pa kislo okolje deluje kot katalizator za reakcijo MDA-TBK. V medij je potrebno dodati tudi antioksidant BHT (butilhidroksitoluen), ki preprečuje lipidno peroksidacijo med pripravo vzorca. Za večjo natančnost produkt MDA-TBK merimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (Tatum in sod., 1990). MDA je zelo reaktivna spojina, ki reagira z beljakovinami, lipidi (fosfolipidi v celičnih membranah) in nukleinskimi kisljinami, sposoben je tudi inaktivirati encime. Za MDA je znano, da je toksičen, citotoksičen, mutagen in kancerogen, povzroča različne bolezni in starostne spremembe. Zaradi naštetega je MDA v kateremkoli organizmu nezaželen. Esencialne maščobne kisline so glavni prekursor nastanka MDA, med njimi najbolj arahidonska in dokozaheksaenojska kislina, v hrani pa trikrat nenasičena linolenska kislina. Koncentracijo MDA v plazmi povečata tudi alkohol in kajenje, slednje poveča kisikove proste radikale in zmanjša aktivnost nekaterih antioksidantov (Nielsen in sod., 1997).

Z normalnim načinom življenja, zmanjšanjem dejavnikov, ki povzročajo oksidacijski stres in raznovrstno prehrano se lahko izognemo lipidni peroksidaciji in z njo povezanim MDA. Za dodatno zaščito organizma poskrbimo z zadostnim vnosom antioksidantov.

2.1.2 Kometni test

S kometnim testom ali elektroforezo posameznih celic (angl. SCGE) merimo poškodbe molekul DNK v celicah, največkrat za test uporabimo bele krvničke ali limfocite (Cortés-Gutiérrez in sod., 2011). Gre za potovanje DNK iz jedra po agaroznem gelu proti anodi. Test je dobil ime po sijočem jedru, ki za seboj pušča sled v obliki repa (poškodovana DNK), kar spominja na komet (slika 1). Prednost kometnega testa pred ostalimi klasičnimi metodami je, da je kometni test natančna in občutljiva metoda, ki pokaže poškodbe DNK v posameznih celicah. Prav tako pa je hitra, direktna in nezahtevna metoda, ki je zelo uporabna v različnih vejah raziskovanja in diagnosticiranja (Lah in sod., 2005).



Slika 1: Stopnje poškodb jedrne DNK od najmanj poškodovane (A), do zelo poškodovane (D) (Cortés-Gutiérrez in sod., 2011: 657)

Uporabljamo ga za odkrivanje več tipov poškodb DNK, največkrat gre za enojne ali dvojne prelome vijačnice, navzkrižne povezave, alkalno labilna mesta (enojni prelomi) ali kot enojni prelomi zaradi nedokončanega ali zakasnjenege popravljanja napake na DNK (Hartmann in sod., 2003). Z uporabo specifičnih protiteles ali DNK popravljalnih encimov lahko s kometnim testom ugotavljamo tudi poškodbe nastale zaradi oksidacijskega stresa (Cortés-Gutiérrez in sod., 2011). Zaradi široke uporabnosti ga danes uporabljamo v farmacevtski industriji, medicinskih in epidemioloških raziskavah, biomonitoringu in toksikologiji (Collins, 2004; Cortés-Gutiérrez in sod., 2011).

2.2 ANTIOKSIDANTI

Aerobni organizmi za svoje normalno delovanje nujno potrebujejo kisik, da lahko preko dihanja ustvarjajo dovolj energije za delovanje ostalih metaboličnih procesov. Kisik pa lahko istočasno povzroča oksidacijski stres, ki je toksičen za celice (Limón-Pacheco in Gonsebatt, 2009). Za zaščito pred prostimi radikali, ki so posledica oksidacijskega stresa, so organizmi tekom evolucije razvili vrsto obrambnih mehanizmov, kot so preventivni mehanizmi, popravljalni mehanizmi, fizična obramba in antioksidativna obramba (Valko in sod., 2007). Antioksidanti so molekule, ki s svojim delovanjem preprečijo ali otežijo prostim radikalom vstop v verižno reakcijo tako, da jim donirajo vodikov atom, s tem jih nevtralizirajo ter preprečijo oksidacijo drugih molekul in poškodbo celic. Naloga antioksidantov je zagotoviti optimalno ravnovesje med prostimi radikali in antioksidanti (Fellenberg in Speisky, 2006).

V grobem antioksidante delimo na dva načina, prva delitev je na endogene in eksogene. Endogeni antioksidanti so tisti, ki jih telo lahko samo proizvede, eksogeni, ki predstavljajo glavno antioksidantov pa tisti, katere je potrebno v telo vnesti s hrano. Med njima je zelo tanka meja, saj je za izgradnjo nekaterih endogenih antioksidantov potrebna sestavina, ki jo moramo vnesti s hrano. Takšen primer je selen, ki je esencialen za izgradnjo Se-glutation peroksidaze (Frankič in Salobir, 2007).

Med endogene antioksidante štejemo:

- glutation (GHT), Se-glutation peroksidaza,
- katalaze,
- NADPH,
- sečna in lipojska kislina,
- hormoni (melatonin, estrogen in drugi),
- Mn, Cu, Zn-superoksid dismutaza (SOD),
- beljakovine, ki vežejo kovinske ione, vključno albumin (in nanj vezani tioli in bilirubin), beljakovine, ki vežejo Fe in Cu (transferin in celuroplazmin).

Eksogeni antioksidanti pa so:

- vitamin A in karotenoidi (β -karoten, likopen, lutein in drugi),
- vitamin E (tokoferoli in tokotrienoli),
- vitamin C (askorbinska kislina)
- fitokemijske spojine z antioksidacijsko aktivnostjo (polifenoli, flavonoidi),
- Se in drugi elementi, potrebni za gradnjo antioksidativnih encimov,
- prehranski in drugi dodatki (koencim Q₁₀, glutation, lipojska kislina in drugi),
- antioksidanti za zaščito krme (BHA, BHT, propil galat in drugi).

Druga delitev antioksidantov je glede na izvor. Tu ločimo naravne in sintetične antioksidante. Sintetične antioksidante zaradi dostopnosti, nizke cene in učinkovitosti uporabljamo kot konzervanse živalske krme. Najbolj uporabljeni so tisti, ki imajo fenolno strukturo: butilhidroksitoluen (BHT), butilhidroksikinon (TBHQ), propil galat in oktil galat (Fellenberg in Speisky, 2006). Zaradi vse bolj energijsko bogate krme se lahko za zaščito živali pred oksidacijskim stresom uporabljata sintetični vitamin E (all-rac tokoferol) ali

semisintetični vitamin E (α -tokoferil acetat), vendar sta ti obliki slabše učinkoviti kot naravna oblika vitamina E (Voljč in sod., 2011).

Naravni antioksidanti izvirajo iz rastlinskih delov: listi, lubje, semena in plodovi. Med njih štejemo vitamin E, vitamin A in druge molekule z antioksidativnimi lastnostmi, kot so karoteni (β -karoten, likopeni, luteini, asta-, zea- in kanta-ksantin), flavonoidi (katehini, kvercetin, rutin, morin) in drugi neflavonoidni fenoli (rosmanol, rosmaridifenol). Antioksidante pa ločimo tudi glede na topnost, tako poznamo v vodi topne antioksidante (vitamin C) in v maščobah topne antioksidante (vitamin E) (Fellenberg in Spiesky, 2006).

Antioksidanti so esencialna sestavina zdrave in uravnotežene prehrane ljudi. Primerno uživanje hrane z antioksidanti zmanjša tveganje za razvoj različnih vrst raka in kardiovaskularnih boleznih (Biesalski in sod., 1997), revmatoidnega artritis, sladkorne bolezni, nevrološke bolezni (Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen) ter upočasnjeni proces staranja (Valko in sod., 2007). Vir antioksidantov predstavljajo živila kot so sadje (črna grozdje, hruške, jagode, češnje, slive, citrusi), zelenjava (artičoke, peteršilj, rabarbara, leča, čebula, fižol, špinača), zelišča (rožmarin, žajbelj, origano, timijan, ingver), zeleni čaj, črni čaj, rdeče vino, pomarančni sok, kava in čokolada (Dimitrios, 2006).

Kakovost krme je zelo pomembna tako za dobro počutje živali, kot za njihovo zdravje in kakovost živalskih proizvodov. Komponente v krmi, ki v telesu povečajo oksidativni stres so kovinski ioni, toksini, večja vsebnost VNMK, zato je potrebno v krmo dodajati antioksidante. Antioksidanti v prehrani živali izboljšajo stabilnost krme, izboljšajo ješčnost živali, zaradi česar živali boljše priraščajo, izboljšajo zdravje živali in njihov imunski odgovor. Poleg tega pa je dodajanje antioksidantov v krmo tudi dober vir le-teh za ljudi, v živalskih proizvodih. Antioksidanti, ki delujejo proti kvarjenju maščob, lovijo hidroperoksilne radikale, ki se tvorijo v iniciacijski fazi oksidacije maščob in tako preprečijo nadaljevanje verižne reakcije prostih radikalov (Frankič in Salobir, 2007).

Danes glavnina živinoreje poteka pod pogoji intenzivne reje, zaželen je hiter prirast, kar pomeni več maščob v krmi, še posebno VNMK, ki so zelo nestabilne. To je razlog za dodatno skrbnost pri dodajanju antioksidantov v krmo, saj se s takšno prehrano potrebe po antioksidantih povečajo. Najpogosteje se dodaja razna rastlinska olja, kot je laneno olje,

palmovo olje, repično olje in vitamine, še posebno vitamin E in C. Nekaj potreb po antioksidantih lahko pokrijemo z rastlinskimi olji, vendar ne vseh, zato je potrebno dodajati še vitamin E (Voljč in sod., 2011).

Ljudje z načinom prehranjevanja zaužijemo malo esencialnih maščobnih kislin (MK), ki pa so prisotne v oljih in ribah. Z namenom, da bi razširili dosegljivost esencialnih MK, jih dodajamo v prehrano drugim živalim, najpogosteje pitovnim piščancem. Zaradi dodajanja VNMK, ki so nestabilne in hitro oksidirajo je potrebno dodajati tudi več antioksidantov, torej vitamina E, ki učinkovito preprečuje lipidno peroksidacijo. Koliko vitamina E pa je potrebno dodati v krmo, da do oksidacije pride kasneje, je odvisno od količine VNMK (Voljč in sod., 2011).

Dovzetnost mesa za oksidacijo je odvisna od deleža VNMK med lipidi, od količine reaktivnega kisika v organizmu in od količine antioksidantov. Do največje lipidne oksidacije pride med rokovanjem z mesom, med predelavo, skladiščenjem in pripravo. Med temi procesi se železo sprostijo iz velikih molekul kot so hemoglobin, mioglobin in je tako dosegljiv že v manjših molekulah kot so aminokisliline, nukleotidi in fosfati, kar pomeni, da lahko deluje kot prooksidant. Sekundarni produkt lipidne peroksidacije in pokazatelj, da je do oksidacije prišlo, je MDA. Ta se sorazmerno z dodajanjem VNMK v proizvodih povečuje (Frankič in Salobir, 2007).

Preučevanje vplivov ob dodajanju antioksidantov v krmo je aktualna tema mnogih raziskovalcev. Voljč in sod. (2011) so v poskus vključili pitovne piščance, katerim so krmo obogatili z naravno (45,6 mg/kg) ali sintetično (61,8 in 166,3 mg/kg) obliko vitamina E. Dodatek 166,3 mg sintetičnega in 45,6 mg naravnega vitamina E/kg krme je znatno zmanjšal poškodbe DNK molekule. Vplival je tudi na oksidativno stabilnost svežega mesa, saj je zmanjšal koncentracijo MDA v prsni mišičnini. Razlika v delujoči koncentraciji dodatka je v izkoriščanju le-tega, organizem lažje izkorišča naravni kot sintetični vitamin E. Koncentracija in vir vitamina E nista statistično značilno vplivala na količino zaužite krme in na rast piščancev.

Guo in sod. (2001) so želeli ugotoviti, kolikšna koncentracija vitamina E ima pozitivne učinke na proizvodne lastnosti piščancev in oksidativno stabilnost mesa. Pitovnim

piščancem so v krmo dodali 5, 10, 20, 50 ali 100 mg vitamina E/kg krme. Na podlagi raziskave so ugotovili, da dodatek vitamina E nima vpliva na zauživanje krme, čeprav so pri skupinah, ki so zauživale višjo koncentracijo dodatka (50 ali 100 mg vitamina E/kg krme) opazili večji prirast, kar pripisujejo zmanjšani peroksidaciji v organizmu. Tudi med skladiščenjem je bilo meso bedrne mišičnine skupine, ki so zauživale višje koncentracije vitamina E, bolj oksidativno stabilno.

Pri vzreji piščancev se pojavlja problem toplotnega stresa, ki nastane zaradi problemov s prezračevanjem in klimatizacijo hlevov, najpogosteje v deželah s toplim podnebjem. Hashizawa in sod. (2013) so testirali vpliv vitamina E pri piščancih, ki so bili izpostavljeni toplotnemu stresu, na oksidativni stres in oksidativno stabilnost mesa. Toplo okolje ima za posledico manjše zauživanje krme, manjši prirast in povečan pogin živali. Vitamin E ni imel vpliva na proizvodne lastnosti piščancev, rejenih v toplem okolju, saj je bil s temperaturo povzročen stres prevelik.

Skřivan in sod. (2012) so v poskus vključili pitovne piščance, katerim so v krmo dodali različne količine vitamina C (280 ali 560 mg/kg krme) in selen (0,3 mg/kg krme). Koncentracija dodanih komponent se je v bedrni mišičnini poviševala sorazmerno v odvisnosti od količine dodatka. Vitamin C je zmanjšal vsebnost maščob v bedrni mišičnini in povečal vsebnost beljakovin. Selen je v primerjavi s kontrolno skupino izboljšal antioksidativno kapaciteto mesa, s tem je zmanjšal oksidativni stres in pripomogel k boljši oksidativni zaščiti mesa. Vitamin C ni vplival na senzorične lastnosti bedrne mišičnine.

Antioksidanti v krmi in krmnih mešanicah niso pomembni le za prehrano živali temveč tudi za oksidacijsko zaščito krme. Med skladiščenjem se krma kvari, največji problem predstavlja oksidacija maščob. Zaradi oksidativnega kvarjenja maščob dobi krma okus po žarkem, neprijeten vonj in videz.

2.3 RASTLINSKI DODATKI V KRMI

S prepovedjo uporabe antibiotikov v prehrani živali in zavedanjem rejcev in porabnikov o škodljivih učinkih le-teh, se pojavlja trend, da se v prehrano živali z namenom izboljšanja zdravja živali in doseganja dobrih proizvodnih rezultatov, dodaja naravne krmne dodatke. Rešitev za to so rastlinski dodatki, ki so že stoletja v uporabi, večinoma v humani medicini. Rastlinski dodatki se že uporabljajo v prehrani živali, predvsem za izboljšanje ješčnosti, prebave in imunskega odgovora, uporablja pa se jih tudi kot antioksidante in kot barvila (Frankič in sod., 2008).

Rastlinske dodatke lahko v krmo dodajamo kot posušene rastline ali v obliki ekstrakta. Ti so lahko prečiščeni ali neprečiščeni, kaj je bolj učinkovito, je odvisno od učinka, ki ga želimo doseči in od posameznega ekstrakta. Veliko znanja je potrebnega, da ugotovimo koliko rastlinskega dodatka dodamo v krmo, če dodatek vključimo v prenizki koncentraciji je učinek skoraj zanemarljiv, če v previsoki koncentraciji, je lahko škodljiv. V prehrani povečajo izločanje sline, povečajo sintezo žolčnih kislin in aktivnost prebavnih encimov. Rastlinski dodatki tudi ugodno vplivajo na počutje in zdravje živali, kar se kaže v dobri proizvodnji kakovostnih in stabilnih živalskih proizvodov (Frankič in sod., 2008).

Rastlinski dodatki imajo tudi protimikrobno delovanje na patogene mikroorganizme, zato so pomemben del sestave krmne mešanice, saj ohranjajo higieno krme. Posledično so bolj zdrava tudi prebavila živali, so manj občutljiva in omogočajo boljšo absorpcijo esencialnih hranil in boljšo rast (Frankič in sod., 2008).

V rastlinskih dodatkih je prisotnih veliko molekul, najpomembnejše med njimi so fenolne spojine, ki jim pripisujemo antioksidacijske lastnosti. Med fenolne spojine spadajo flavonoidi, hidrolizirajoči tanini, fenolne kisline ter nekateri vitamini (vitamin A in E). Veliko fenolnih spojin vsebujejo rožmarin, žajbelj, origano, kamilica, zeleni čaj, regrat in ognjič. Vsebnost antioksidantov v rastlinskih dodatkih je pomembna za zdravje živali in tudi za oksidacijsko stabilnost živalskih proizvodov. Velik problem pri reji pitovnih piščancev predstavlja zajedavska bolezen prebavil, kokcidioza. Znano je, da ti zajedavci povzročajo lipidno peroksidacijo v črevesju, zato je dobro stremeti k iskanju novih

rastlinskih dodatkov, ki imajo morebiti še večjo antioksidativno aktivnost (Frankič in sod., 2008).

Kamboh in Zhu (2013) navajata ugodne učinke dodatka bioflavonoidov soje in citrusov v prehrani piščancev. Dodatek je povečal antioksidativni status živali in zmanjšal koncentracijo MDA v prsni mišičnini. Za flavonoide je znano, da spreminjajo razmerje med MK, največkrat med NMK in VNMK. V tem poskusu dodatek ni značilno spremenil razmerja med MK.

Pri proizvodnji hrane za ljudi ostane veliko stranskih proizvodov, nekatere porabimo za proizvodnjo drugih izdelkov (gnojila), večina pa jih ostane. S svojo prisotnostjo ti ostanki pripomorejo k onesnaževanju podtalnice, zraka, poleg tega pa predstavljajo dobro gojišče za razmnoževanje patogenov. Takšen primer opisujejo Hu in sod. (2012) na Kitajskem, ki je velika pridelovalka brokolija. Za humano prehrano so najbolj zanimivi cvetovi brokolija, steblo in listi pa ostanejo na polju. Ker je brokoli dober antioksidant, bi lahko te ostanke porabili v prehrani piščancev. V poskusu so v krmo dodali posušen brokoli in spremljali antioksidativno aktivnost, pigmentacijo kože in kakovost mesa. Ugotovili so, da je brokoli zmanjšal izcejo iz prsne mišičnine, barva kože pa je bila intenzivneje rumena kot pri kontrolni skupini, ki je bila brez dodatka. Pripomogel je tudi k boljši antioksidativni zaščiti živali, kar se odraža v nižji koncentraciji MDA. Dodatek brokolija ni vplival na zauživanje in izkoriščanje krme ter na rast živali.

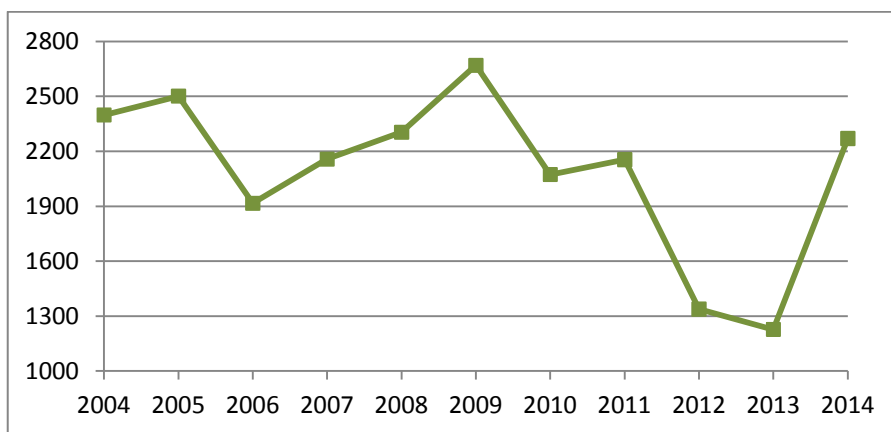
Pri proizvodnji vina se vinarji srečujejo z grozdnimi tropini, ki ostanejo pri stiskanju grozdnih jagod v preši. Tudi grozdje velja za dober antioksidant, njegovi proizvodi so priporočljivi v humani prehrani. Zaradi dobrih lastnosti so ga v različnih koncentracijah dodali v krmo pitovnim piščancem. V raziskavi so primerjali vpliv grozdnih tropin in vitamina E na antioksidativno zaščito živali. Ugotovili so, da med koncentracijo MDA v prsni mišičnini piščancev krmljenih s grozdnimi tropini in tistih z vitaminom E ni statistično značilnih razlik. Dodatek grozdnih tropin v krmi je imel večji učinek na zauživanje in izkoriščanje krme kot vitamin E (Brenes in sod., 2008).

2.4 HMELJ IN NJEGOVE UČINKOVINE

Hmelj (*Humulus lupulus*) je zelnata trajnica ovijalka. Je dvodomna rastlina, moška rastlina razvije 7,5-12,5 cm dolge plodove, ženska pa storžkom podobna socvetja, dolga med 2,5 in 5 cm, zgrajena iz prekrivajočih se lističev. Hmelj je sestavljen iz podzemnega dela, ki prezimi in nadzemnega dela, ki vsako leto odmre. Vsako pomlad iz korenike požene steblo, dolgo od 9-18 m, iz stebela poženejo listi, ki so poraščeni z dlačicami za zaščito pred insekti. Ženska rastlina poleti razvije storžke, ko ti dozoriijo, hmelj požanjejo. Žetev hmelja se prične konec avgusta ali v začetku septembra. Po žetvi sledi sušenje do primerne vlažnosti za skladiščenje. Hmelj raste na obeh poloblah v zmernem pasu, kjer je dovolj padavin, ugodna dolžina dneva, temperatura in rodovitnost tal. Prve omembe hmelja segajo v čas Rimljanov, ki so ga opisovali kot rastlino, ki duši druge rastline. Kasneje so ga uporabljali kot okrasno rastlino, v Srednjem veku pa se je njegova uporaba razširila v pivovarsko industrijo, kjer predstavlja glavno sestavino še danes. Poleg pivovarske industrije, kjer se porabi 95 % vsega hmelja, se je njegova uporaba razširila tudi v fitomedicinske in rastlinsko prehranske dodatke. V Belgiji mladi poganjki v spomladanskem času predstavljajo kulinarično specialiteto (Van Cleemput in sod., 2009; Zanolini in Zavatti, 2008).

Za uporabo hmelja v pivovarski industriji so primerne le ženske rastline. Te razvijejo hmeljeve storžke, v katerih najdemo grenčične snovi, ki dajo pivu posebno aromo. Moške rastline so za komercialne namene nezaželene, a ključne v razvoju vrst. Slovenija je v letu 2013 proizvedla 2.031 hl piva od tega ga je izvozila 720 hl. Poraba piva v Sloveniji je v letu 2013 znašala 1562 hl, kar znese približno 75 l/prebivalca, ta podatek nas uvršča v sredino evropske bilance popite količine (Beer statistics, 2014).

Slovenija je pomembna pridelovalka hmelja, v letu 2013 smo ga pridelali najmanj v zadnjih desetih letih, pa kljub temu skoraj 1300 ton (SURs, 2015), kar predstavlja približno 2,8 % evropske proizvodnje (Hop report, 2013). V lanskem letu je bila proizvodnja na podobni ravni kot pred gospodarsko krizo (SURs, 2015) (Slika 2).



Slika 2: Pridelava hmelja v Sloveniji (ton/leto) (SURSTAT, 2015)

Nasičenost trga in svetovna gospodarska kriza sta prizadela tudi pridelovalce hmelja. Obdobje med 2008 in 2010 je bilo za pridelovalce še posebno slabo, saj je bila proizvodnja velika, prosti trg hmelja pa se je začel umirjati. Mali varilci piva so odkupovali manjše količine hmelja, večje pivovarne pa so poslovale preko pogodb. Iz tega razloga je veliko hmelja ostalo v skladiščih, ta trend je bilo opaziti tudi v Sloveniji (Pavlovič, 2009).

Kar nekaj avtorjev navaja antibiotske in antioksidativne lastnosti hmelja. Te lastnosti že izkoriščamo v pivovski industriji, kjer hmelj preprečuje razmnoževanje mlečnokislinskih bakterij in s tem podaljša rok trajanja piva. Vsebnost antioksidativnih snovi v hmelju je odvisna od vrste hmelja in pogojev v katerih raste (Abram in sod., 2015). Te učinkovine so pomembne med pridelavo in skladiščenjem piva, saj preprečujejo razvoj nezaželenega okusa piva, poleg tega pa imajo tudi dobre učinke na zdravje ljudi (Krofta in sod., 2008). Hmelj je bogat vir flavonoidov med katere spadajo: flavanoni (naringenini), halkoni (ksantohumol, izoksantohumol) in katehini (Miranda in sod., 1999), ter flavonil glikozidi in tanini (Stevens in Page, 2004). Vse več avtorjev navaja tudi uporabo hmeljevih listov kot antioksidantov. Listi imajo sicer manjšo, vendar ne zanemarljivo antioksidativno aktivnost, kot storžki (Abram in sod., 2015).

2.4.1 Hmeljevi storžki

Najpomembnejši del rastline predstavljajo hmeljevi storžki. Njihova uporaba sega daleč v zgodovino. Uporabljali so jih za blaženje glavobolov, motenj spanja, simptomov stresa, nerivoze, razdražljivosti, kot toplo oblogo pri bolezni dihal, prevretek pa za lajšanje

trebušnih bolečin. Kot prehranski dodatek spodbuja apetit, povečuje količino želodčnih sokov, ne da bi vplival na kislino in ureja prebavo. Uporaba sega tudi v pripravke za nego kože (celjenje razjed) in aromaterapijo (vdihavanje in pomiritev) (Zanoli in Zavatti, 2008).

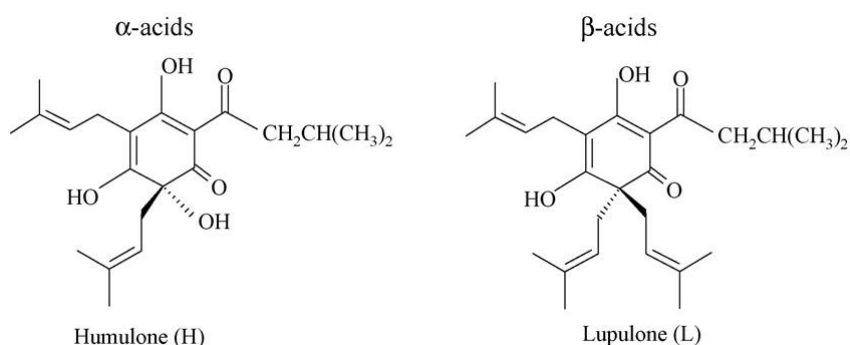
V poletnem času, med cvetenjem, hmeljevi storžki izločajo rumeno snov lupulin, ki je bogata s sekundarnimi metaboliti: smolnate grenčične kisline, eterična olja in polifenoli (ksantohumol in drugi halkoni). Hmeljeve grenčine predstavljajo alfa in beta kisline, katerim pripisujejo dobre antioksidativne in antibiotične lastnosti. Vsebnost kislin v hmelju je odvisna od vrste hmelja in pogojev rasti. Grenčični kislini sta blede rumeno obarvani smoli oziroma olji, ki sta topni v ogljikovodikih, kot je heksan. Sta zelo občutljivi na oksidacijo, takrat spremenita obliko, ki je topna v dietiletru in ne več v heksanu, obenem se razvije tudi neprijeten vonj (Van Cleemput in sod., 2009). V izogib oksidaciji, hmeljeve storžke po žetvi sušijo v pečeh pri 50-60 °C, 6-10 ur, do primerne vlažnosti 8-12 %. Tako osušen hmelj zmeljejo v prah, homogenizirajo in oblikujejo pelete. Peletiran hmelj neprodušno zaprejo in skladiščijo pri nizki temperaturi. Takšen način predelave nekoliko zmanjša antioksidativno kapaciteto hmelja, vendar izgube navadno niso večje od 5 %. Za krajše obdobje skladiščenja hmelj ni potrebno predelovati v pelete. Vpliv temperature skladiščenja je eden od dejavnikov, ki vplivajo na kvarjenje alfa kisline, katera predstavlja vrednost hmelja na trgu. V peletiranem hmelju, ki je shranjen v toplem okolju (20-24 °C) se alfa kisline hitreje kvarijo, kot pri shranjevanju v hladnem okolju (2-3 °C). Kar zadeva antioksidativne aktivnosti pa temperatura nima statistično značilnega vpliva, če so peleti hmelja shranjeni v neprodušno zaprtih vrečkah. Če hmelja ne zaščitimo pred zrakom, pa ima temperatura okolja velik vpliv. Nizke temperature povečujejo delež vlage in znižujejo antioksidativno aktivnost hmelja (Krofta in sod., 2008).



Slika 3: Storžki sorte Dana (foto F. Korber, povzeto po Čerenak, 2012: 17)

2.4.2 Grenčični kislini

Smola, ki je sekundarni metabolit v lupulinu je sestavljena iz grenčičnih alfa in beta kislin. Veliko zanimanja vzbuja njihova antioksidativna aktivnost in ugoden vpliv na zdravje človeka. Alfa kisline so zelo pomembna sestavina hmelja, predstavlja tudi vrednost le-tega na trgu. Glavne sestavine alfa kislin so humulon (35-70 %), kohumulon (20-65 %) in adhumulon (10-15 %). Vsebnost humulona in kohumulona se razlikuje glede na vrsto medtem, ko je vsebnost adhumulona vrstno neodvisna. Pri varjenju piva imajo alfa kisline pomembno vlogo. Z vsebnostjo približno 4 mg/l izboljšujejo stabilnost pene, preprečujejo nenadno brizganje tekočine in pripomorejo k daljši obstojnosti piva. Med toplotno obdelavo pri varjenju piva alfa kislina izomerizira, produkt je zelo grenka izo-alfa kislina, ki je topna v vodi in predstavlja preko 80 % hmeljevih substanc v pivu.



Slika 4: Kemijska struktura hmeljevih grenčičnih kislin humulona in lupulona (Zanoli in Zavatti, 2008: 386)

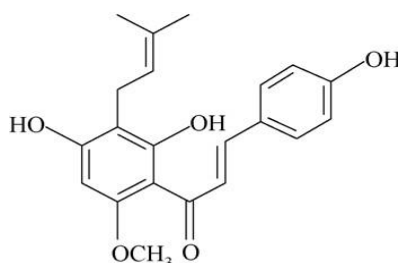
Beta kisline so zgrajene iz lupulona in kolupulona, ki sta v večini vrst predstavljena v približno enaki vsebnosti (20-55 %) in adlupulona (10-15 %). Beta kislina je tudi manj kislota kot alfa kislina zaradi zamenjave alkoholne funkcije z dodatno prenilno skupino na šestem ogljikovem atomu. Te kisline so ekstremno občutljive na avtooksidacijo, ki jo spodbudi izpostavljanje zraku. Oksidacijske reakcije povečajo število oksidiranih snovi. Določena oksidacijska reakcija privede do zelo stabilne snovi hulupulon, ki je bolj grenčična kot beta kislina sama. Kljub temu beta kisline in hulupulon nimajo velikega vpliva na kakovost piva (Van Cleemput in sod., 2009).

Bioaktivnost hmeljevih grenčičnih kislin sega na različna področja. Van Cleemput in sod. (2009) navajajo antikancerogeno delovanje, gre za zaviranje metabolne aktivnosti rakavih

celic in kontrolirano celično smrt hitro rastočih rakavih celic. Preprečujejo tudi angiogenezo, s tem celice ne dobijo dovolj kisika in hranil, kar je ključno za razvoj malignih tumorjev in napredovanje rakavih obolenj. Delujejo tudi protivnetno (uporaba pri zdravljenju artritisa in drugih revmatičnih obolenjih), vplivajo na prebavo (spodbujajo izločanje prebavnih sokov), pozitivne učinke pa imajo tudi na zaviranje razvoja osteoporoze. Dolgotrajno izpostavljanje in vdihavanje lupulina lahko privede do alergijskih reakcij, ki zajemajo spremembe na koži (dermatitis), respiratorne (oteženo dihanje, astma) in prebavne težave (bruhanje, zgaga, driska).

2.4.3 Ksantohumol

Glavni polifenol po strukturi halkon, ki prevladuje in sodeluje pri antioksidativni zaščiti in ga najdemo le v hmelju, je ksantohumol. Je del smole, ki jo izločajo lupulinske žleze in v sušenem hmelju predstavlja od 0,1 do 1 % suhe mase hmeljevega storžka. Prvi ga je izoliral Power s sodelavci leta 1913, od takrat postaja vse bolj zanimiva snov kot dodatek v prehrani. V rastlini je ksantohumol vključen v rast in zaščito le-te pred zajedavci in plesnimi, ter oksidacijo. Ksantohumol učinkovito zmanjšuje lipidno peroksidacijo, deluje protivnetno, protimikrobno in preprečuje rakava obolenja (Karabín in sod., 2015). Pri zniževanju lipidne peroksidacije LDL je lahko bolj učinkovit kot α -tokoferol (vitamin E) (Miranda in sod., 2000). Je najboljše raziskana rastlinska snov v smislu preprečevanja raka saj deluje kot zaviralec metabolne aktivnosti prokancerogenov, spodbuja encime, ki onemogočajo delovanje rakavih celic in zavira rast tumorja v začetni fazi (Stevens in Page, 2004). Ksantohumol s svojo antioksidativno zaščito zavira širjenje raka na prsih, jajčnikih, prostate in raka črevesja (Delmulle in sod., 2006).



Slika 5: Kemijska struktura ksantohumola (Zanoli in Zavatti, 2008: 387)

2.5 HMELJ KOT RASTLINSKI DODATEK V PREHRANI ŽIVALI

V zadnjih letih prodaja hmelja ne sledi proizvodnji, kar ima za posledico polna skladišča. Vse več avtorjev navaja dobre antioksidativne in antimikrobne lastnosti hmelja, zato ga je smiselno uporabiti kot krmni dodatek v prehrani živali. Cornelison in sod. (2006) so piščance razdelili v tri skupine. Primerjali so dodatek hmelja ali penicilina v krmo piščancem, s skupino brez dodatka. Rezultati so pokazali, da je imel že dodatek 227 g hmelja/t podoben učinek kot dodatek 50 g penicilina/t krmne mešanice. Statistično značilne razlike v prid skupin z dodatkom so bile v prirastu, končni telesni masi ter izkoriščanju krme. Raziskava je pokazala, da ob takšni količini hmelja v krmi ni potrebe po nutritivnih antibiotikih.

Boljši prirast in nekoliko večje zauživanje krme pri pitovnih piščancih ob dodatku hmelja so ugotovili tudi Sacakli in sod. (2011). Pri drugih lastnostih kot je končna telesna masa, zamaščenost trebušne votline in črevesna pH avtorji niso ugotovili statistično značilnih razlik med kontrolno skupino in skupino z dodatkom hmelja.

Dorn in sod. (2010), so miškam v krmo dodajali hmeljevo učinkovino ksantohumol, 1000 mg/kg telesne mase na dan. Želeli so ugotoviti učinek le-te na delovanje organov. Med skupinama ni bilo razlik v telesni masi in velikosti organov (srce, pljuča, jetra, timus) in prebavnem sistemu. Dodatek ksantohumola ni vplival na zauživanje krme in vode ter dnevni prirast. Iz rezultatov je razvidno, da ksantohumol tudi v večji količini nima negativnega oziroma toksičnega vpliva na organizem.

Vpliv hmelja so znanstveniki preučevali tudi pri živalih, katerih proizvode najdemo v humani prehrani. To so večinoma prežvekovalci (govedo, ovce, koze), perutnina, kjer piščanci predstavljajo največji delež, ter kunci in prašiči. Veliko mesa je namenjenega predelavi. Tekom predelave je meso najbolj izpostavljeno oksidacijskemu stresu, zato je prehrana teh živali še kako pomembna. Oksidacija negativno vpliva na teksturo mesa, njegov vonj in okus ter hranilno vrednost, poleg tega vodi do nastanka toksičnih snovi. Dodatek hmelja (2 g/kg) v prehrano jagnjet je značilno vplival na oksidativno stabilnost mesa. Oksidativna stabilnost lipidov mesa, shranjenega v hladilniku in nato kuhanega, je bila vseh sedem dni boljša kot pri kontrolni skupini. Vzorce mesa so shranili tudi v

zamrzovalnik, tudi pri teh vzorcih je bila oksidativna stabilnost lipidov boljša kot pri kontroli. Hmelj je vplival tudi na barvo mesa, meso jagnjet je bilo svetlejšje (višja vrednost L) in bolj rumene (višja vrednost b) barve. Čas shranjevanja je vplival na pH mesa, ta se je sorazmerno s časom shranjevanja povečeval (Villalobos-Delgado in sod., 2015).

Narvaez in sod. (2011) so učinke hmelja preučevali pri govedu. Cilj poskusa je bil določiti vpliv hmelja na fermentacijo v vampu. Vpliv so testirali v vampnem soku v različnem časovnem obdobju (6-48 ur). Hmelj je po 48 urah v primerjavi s kontrolno skupino zmanjšal produkcijo plinov, vključno z metanom. Po 24 urah je zmanjšal vsebnost hlapnih maščobnih kislin. To je verjetno posledica antimikrobnega delovanja hmelja, ki je v tem poskusu pokazal, da so ob dodatku hmelja bolj prizadete po Gramu pozitivne kot po Gramu negativne bakterije. Preston in sod. (1973) so pri govedu ugotavljali rast in klavne lastnosti po krmljenju z različno količino hmelja (0-50 % v krmni mešanici). Krmna mešanica je bazirala na koruzni silaži. Krmo so pripravili tako, da sta koruzna silaža in hmelj skupaj predstavljala 90 % krmne mešanice. Masa klavnih polovic, mesnatost, marmoriranost mesa in debelina maščobe se je večala z vsebnostjo dodatka hmelja. Prav tako je več hmelja v krmi pripomoglo k zmanjšanemu procesu ketoze v vampu in abscesov na jetrih, v primerjavi s krmo, kjer dodatka hmelja ni bilo.

Vpliv hmelja na lastnosti zauživanja krme, prirasta in izkoriščanja krme pri govedu so preučevali tudi Wang in sod. (2010). Med kontrolno skupino, ki ni zauživala hmelja in med skupino z dodatkom hmelja avtorji niso ugotovili razlik. Razlog za to vidijo v premajhni količini dodatka hmelja, ta je znašala med 119 in 476 mg/kg SS krme. Poleg omenjenih lastnosti so opazovali tudi vpliv na fermentacijo v vampu z *in vitro* metodo. Rezultati so pokazali, da je hmelj statistično značilno vplival na fermentacijo v vampu in sicer, na povečano produkcijo plinov ter na povečano koncentracijo hlapnih MK. Tako je dodatek hmelja povečal delež propionata v celokupnih hlapnih MK in zmanjšal delež acetata ter s tem izboljšal fermentacijo *in vitro*. Ugotavljali so tudi prisotnost oziroma koncentracijo *Escherichie coli* v iztrebkih goveda, vendar so ugotovili, da dodatek hmelja ni vplival na prisotnost te bakterije v iztrebkih, saj nima dovolj močnega antimikrobnega vpliva na Gram negativne bakterije, med katere spada tudi *Escherichia coli*.

Kot navedeno, hmelj vpliva tudi na prebavni trakt živali in ljudi. Bolezni prebavil predstavljajo veliko težav za rejce pitovnih piščancev. Te so vzrok za izgube in slabše proizvodne rezultate. Ena takšnih bolezni je tudi kokcidioza, ki spodbuja izločanje sluzi, kar lahko povzroči namnoževanje bakterije *Clostridium perfringens*, to pa poslabša proizvodne rezultate. Črevesne lezije nastale zaradi kokcidioze izboljšajo dostopnost hranil za patogene bakterije, kar povzroči mikrobno neravnovesje. Antimikrobno delovanje hmelja so raziskovali v poskusu, kjer so ugotavljali vpliv različne količine (30 mg/kg in 240 mg/kg) beta kisline na proizvodnost in črevesno mikrobioto piščancev. Piščanci z dodatkom beta kisline so zaužili manj krme in posledično počasneje prirastali kot kontrolna skupina. Kljub temu so bile izgube zaradi kokcidioze v skupinah krmljenih z dodatkom beta kisline na koncu poskusa manjše. Hmelj zmanjšuje razmnoževanje in rast patogenih bakterij. Predstavlja dober nadomestek za antibiotična sredstva (Bortoluzzi in sod., 2015). Podobno so ugotovili tudi Siragusa in sod. (2008), ki so različno količino (62,5, 125 in 250 ppm) lupulona dodali v vodo. Piščanci so popili manj vode, v kateri je bilo 250 ppm beta lupulona, verjetno zaradi lepljivosti, ki ga je povzročil lupulon zaradi slabe topnosti v vodi. Dodatek lupulona je neodvisno od vsebnosti v vodi zmanjšal število bakterij vrste *Clostridium perfringens* v črevesju živali.

Vpliv hmelja so raziskovalci preučevali tudi pri odstavljenih pujskih. Uživanje rastlinskih dodatkov, ki so bogati s polifenoli, širi razmerje med zauživanjem krme in prirastom. Fiesel in sod. (2014) so naredili raziskavo z namenom, da bi ugotovili ali dodatek grozdja in hmelja izboljša razmerje med zauživanjem krme in prirastom. Prav tako jih je zanimala prebavljivost hranil in mikrobiota v črevesju. Ugotovili so, da med skupino, ki je kot krmni dodatek zauživala grozdje in skupino, ki je zauživala hmelj, ni bilo razlik v dnevnem zauživanju krme in dnevnem prirastu v primerjavi s kontrolno skupino, ki ni dobila dodatka. Pri ugotavljanju razmerja med zauživanjem krme in prirastom so pri skupini, ki je zauživala grozdje, opazili nekoliko izboljšano razmerje, kot pri skupini s hmeljem, razlika je bila značilna. Dodatek hmelja je pri živalih nekoliko zmanjšal prebavljivost surovih beljakovin in vlaknin. Dodatek tako hmelja kot grozdja v krmo je statistično značilno zmanjšal število *Streptococcus spp.* in *Clostridium cluster* v blatu pujskov. Poleg tega sta dodatka zvišala pH v prebavilih, kar je zmanjšalo mikrobno aktivnost. Na podlagi rezultatov avtorji sklepajo, da imajo polifenoli antimikrobni učinek.

Grueso in sod. (2013) so preučevali vpliv hmelja na prebavljivost vlaknin pri kuncih. Pripravili so štiri krmne mešanice. Prva je vsebovala veliko škroba in netopne vlaknine, druga je bila enaka le z dodatkom hmelja, tretja pa je vsebovala malo škroba in topne vlaknine, četrta je bila enaka le z dodatkom hmelja. Kombinacija škroba in vlaknin je izboljšala prebavljivost vseh vlaknin. Dodatek topnih vlaknin v krmo je zmanjšal pH in število *Clostridium perfringens* v mehkem blatu. Dodatek hmelja ni vplival na sestavo iztrebkov pri kuncih, je pa značilno zmanjšal prebavljivost hemiceluloze. Hmelj je v nasprotju s topnimi vlakninami zvišal pH v iztrebkih, izboljšal zauživanje krme in zmanjšal pogin zaradi debelosti.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Zasnova poskusa

Poskus je bil opravljen na Katedri za prehrano na Oddelku za zootehniko, Biotehniške fakultete.

V poskus smo vključili 84 dan starih petelinčkov provenience ross 308. Poskus je trajal 37 dni.

Živali so bile razdeljene v tri skupine, vsaka skupina pa je bila dnevno krmljena po volji s krmno mešanico, kot sledi:

- KONT (kontrola) = popolna krmna mešanica (PKM), ki je vsebovala 7,5 % lanenega olja in 10 IU vitamina E na kg
- KONT_0,9 = kot KONT z dodatkom 0,9 kg hmelja/t PKM
- KONT_3,6 = kot KONT z dodatkom 3,6 kg hmelja/t PKM

V PKM smo dodali kokcidiostatik Elankoban.

3.1.2 Sestava krmnih mešanic

Osnovna krmna mešanica (preglednica 1), tako štarter kot finiŝer, je bila v vseh skupinah enaka. Kontrolna skupina je zauŝivala krmno meŝanico le z dodatkom lanenega olja in vitamina E, ostali skupini pa sta imeli ŝe dodatek hmelja v razliĝnih koncentracijah. Od zaĝetka poskusa do 20. dne smo piŝĝance krmili s ŝtarterjem, od 21. dne do konca poskusa pa s finiŝerjem. Ŝivali so imele vodo vseskozi na voljo (kapljiĝni sistem).

Preglednica 1: Sestava osnovne krmne mešanice za pitovne piščance (g/kg)

	Štarter (g/kg)			Finišer (g/kg)		
	KONT ¹	KONT_0,9 ¹	KONT_3,6 ¹	KONT ²	KONT_0,9 ²	KONT_3,6 ²
Koruza	190,00	189,10	186,40	270,00	269,10	266,40
Pšenica	300,00	300,00	300,00	284,10	284,10	284,10
Soj. tropine	384,94	384,94	384,94	332,36	332,36	332,36
Laneno olje	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
Apnenec	13,16	13,16	13,16	10,63	10,63	10,63
Mon. fosfat ³	20,87	20,87	20,87	16,46	16,46	16,46
Sol	4,35	4,35	4,35	4,36	4,36	4,36
L-liz.-HCl ⁴	2,25	2,25	2,25	0,07	0,07	0,07
DL-metion. ⁵	3,39	3,39	3,39	2,02	2,02	2,02
L-treonin ⁶	1,04	1,04	1,04	-	-	-
Premiks	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Hmelj	-	0,90	3,60	-	0,90	3,60

KONT¹ – štarter kontrolna krma (PKM), KONT_0,9¹ – štarter z dodatkom 0,9 g hmelja/kg PKM, KONT_3,6¹ – štarter z dodatkom 3,6 g hmelja/kg PKM, KONT² – finišer kontrolna krma (PKM), KONT_0,9² – finišer z dodatkom 0,9 g hmelja/kg PKM, KONT_3,6² – finišer z dodatkom 3,6 g hmelja/kg; ³ Monodikalcijev fosfat, ⁴ L-lizin-HCl je vseboval 78,8 % lizina; ⁵ DL-metionin je vseboval 98 % metionina; ⁶ L-treonin je vseboval 98 % treonina

Premiks smo pripravili po priporočilih za rejo piščancev ross 308 za krmo »grower« (Ross..., 2007). Količino vitamina E smo dodali po priporočilih NRC (1994). Za vse skupine in obe PKM (štarter, finišer) je bila sestava premiksa enaka (preglednica 2).

Preglednica 2: Sestava premiksa za vse skupine

Element	Enote	Količina
Baker	mg	16
Jod	µm	1250
Železo	mg	40
Mangan	mg	120
Selen	µg	300
Cink	mg	100
Vitamin A	IU	9000
Vitamin D3	IU	5000
Vitamin E	IU	10
Vitamin K	mg	3
Tiamin-B1	mg	2
Riboflavin-B2	mg	6
Nikotinska kislina	mg	60
Pantotenska kislina	mg	15
Piridoks-B6	mg	3
Biotin	µg	100
Folna kislina	µg	1750
Vitamin-B12	µg	16

Iz vsake krmne mešanice smo odvzeli vzorce krme za določanje kemijske (preglednica 3) in maščobnokislinske (preglednica 4) sestave, prav tako smo določili oksidacijsko stabilnost krme (MDA) (preglednica 8).

Preglednica 3: Kemijska sestava krme (g/kg)

	Štarter			Finišer		
	KONT ¹	KONT_0,9 ¹	KONT_3,6 ¹	KONT ²	KONT_0,9 ²	KONT_3,6 ²
SS	901,97	901,51	906,28	898,21	905,21	908,38
SB	223,98	229,92	225,60	199,38	206,12	203,00
SM	93,01	93,25	92,38	94,20	91,29	89,39
SV	39,10	39,29	39,96	37,97	31,40	37,93
SP	65,68	66,46	66,13	53,69	53,68	57,69
BDI	480,20	472,59	482,21	513,00	522,72	520,37

KONT¹ – štarter kontrolna krma (PKM), KONT_0,9¹ – štarter z dodatkom 0,9 g hmelja/kg PKM, KONT_3,6¹ – štarter z dodatkom 3,6 g hmelja/kg PKM, KONT² – finišer kontrolna krma (PKM), KONT_0,9² – finišer z dodatkom 0,9 g hmelja/kg PKM, KONT_3,6² – finišer z dodatkom 3,6 g hmelja/kg PKM. SS-suha snov, SB-surove beljakovine, SM-surove maščobe, SV-surove vlaknine, SP-surovi pepel, BDI-brezdušični izvleček

Določili smo maščobnokislinsko sestavo osnovnih krmnih mešanic z različno koncentracijo hmelja in tudi hmelja.

Preglednica 4: Maščobnokislinska sestava krmnih mešanic in hmelja (g MK/100 g vsote MK)

MK	Štarter			Finišer			Hmelj
	KONT ¹	KONT_0,9 ¹	KONT_3,6 ¹	KONT ²	KONT_0,9 ²	KONT_3,6 ²	HM
C11:1 n-1							5,12
C12:0							1,93
C13:0							1,45
C13:1 n-1							7,88
C14:0	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,74
C15:0 iso							1,05
C16:0	7,65	7,91	7,81	7,91	7,79	7,71	11,15
Vsota C16:1	0,13	0,13	0,13	0,13	0,12	0,13	0,16
C17:0 iso							0,46
C17:0	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,59
C17:1 n-7	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,42

MK-maščobna kislina, KONT¹ – štarter kontrolna krma (PKM), KONT_0,9¹ – štarter z dodatkom 0,9 g hmelja/kg PKM, KONT_3,6¹ – štarter z dodatkom 3,6 g hmelja/kg PKM, KONT² – finišer kontrolna krma (PKM), KONT_0,9² – finišer z dodatkom 0,9 g hmelja/kg PKM, KONT_3,6² – finišer z dodatkom 3,6 g hmelja/kg PKM, HM – hmelj shranjen v hladilniku

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 4: Maščobnokislinska sestava krmnih mešanic in hmelja (g MK/100 g vsote MK)

MK	Štarter			Finišer			Hmelj
	KONT ¹	KONT_0,9 ¹	KONT_3,6 ¹	KONT ²	KONT_0,9 ²	KONT_3,6 ²	HM
C18:0	3,31	3,67	3,59	3,56	0,64	3,5	2,05
Vsota C18:1	17,64	18,41	18,10	18,91	18,44	18,43	6,5
C18:2 n-6 cc	25,50	25,64	25,23	26,74	25,38	25,57	31,61
C18:3 n-6							3,55
C19:1 n-9							0,15
C18:3 n-3	44,85	53,17	44,12	41,74	43,59	43,66	17,53
C18:4 n-3							0,97
C20:0	0,15	0,17	0,16	0,19	0,18	0,17	1,78
C20:1 n-9	0,15	0,16	0,17	0,17	0,16	0,16	0,30
C21:0	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,33
C22:0	0,12	0,15	0,14	0,15	0,16	0,15	2,74
C22:1 n-9	0,05	0,06	0,06	0,02	0,05	0,05	
C23:0	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,23
C24:0	0,09	0,10	0,09	0,10	0,10	0,10	0,92
C24:1 n-9	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	
NMK	11,50	12,15	12,00	12,10	12,04	11,80	25,49
ENMK	18,04	18,92	15,50	19,30	18,88	18,85	20,53
VNMK	70,46	68,92	69,50	68,60	69,08	69,34	53,98
n-3 VNMK	44,90	43,21	44,20	41,8	43,64	43,71	18,57
n-6 VNMK	25,57	25,71	25,30	26,80	25,45	25,64	35,41
n-6/n-3 VNMK	0,57	0,59	0,60	0,60	0,58	0,59	1,91

MK-maščobna kislina, KONT¹ – štarter kontrolna krma (PKM), KONT_0,9¹ – štarter z dodatkom 0,9 g hmelja/kg PKM, KONT_3,6¹ – štarter z dodatkom 3,6 g hmelja/kg PKM, KONT² – finišer kontrolna krma (PKM), KONT_0,9² – finišer z dodatkom 0,9 g hmelja/kg PKM, KONT_3,6² – finišer z dodatkom 3,6 g hmelja/kg PKM, HM – hmelj shranjen v hladilniku

3.1.3 Priprava dodatka

Za prehranski dodatek smo dodali hmelj, ki je bil pridelan na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Kot dodatek smo izbrali mešanico križancev hmelja 94/127 in 108/78 v razmerju 50:50. Križance smo izbrali glede na vsebnost beta kislin in glede na antioksidativno kapaciteto v maščobah (ACL) in v vodi topnih (ACW) antioksidantov. Sušeni hmeljevi storžki so bili zmleti na mlinu kladivarju in dodani osnovni krmni mešanici.

3.2 METODE

3.2.1 Izvedba poskusa

Poskus je trajal 37 dni. Dan stare piščance smo uhlevili tako, da smo jih razdelili v tri skupine, glede na poskusne krmne mešanice. Živali so bile uhlevljene v oddelke v talni reji. Za nastil smo uporabili žagovino. Večkrat na dan smo spremljali temperaturo in vlago v hlevu in jo po priporočilih za rejo piščancev ross 308, spreminjali glede na starost živali. Osvetlitev smo prav tako prilagajali priporočilom ross 308, tako smo prvih 7 dni piščancem zagotovili 23 ur svetlobe in uro teme, po sedmih dneh pa 20 ur svetlobe in štiri ure teme (Ross..., 2009). Skrbeli smo, da so imele živali svež nastil, tako smo preprečili razmnoževanje mikroorganizmov in povzročitev bolezni.

Na začetku poskusa smo vse piščance stehali, s štarerjem smo jih krmili do 20. dne, nato s finišerjem do 37. dne. V obdobju krmljenja s štarerjem smo tehtanje ponovili še 7. in 14. dan. Na podlagi dobljenih rezultatov smo odbrali 20 živali na skupino ter jih 21. dan individualno označili s kovinskim obročkom, na katerem je bila odtisnjena številka. Vse živali so bile krmljene po volji. Enkrat na teden smo pobrali ostanke krme in jih stehali, tako smo lahko ugotovili količino zaužite krme na skupino in izkoriščanje krme na skupino. Zadnji dan poskusa smo živalim krmo odvzeli in naključno odbrali 6 živali z vsakega oddelka oziroma 12 živali na skupino, za zakol.

Živalim smo na koncu poskusa odvzeli vzorce krvi iz perutne vene za izvedbo kometnega testa, ob zakolu pa vzorce krvi in prsno mišičnino za merjenje koncentracije MDA. Na prsni mišičnini smo naredili še dodatne meritve: merjenje barve, pH-ja, izceje in električne prevodnosti.

3.2.2 Zbiranje vzorcev in njihova priprava za analize

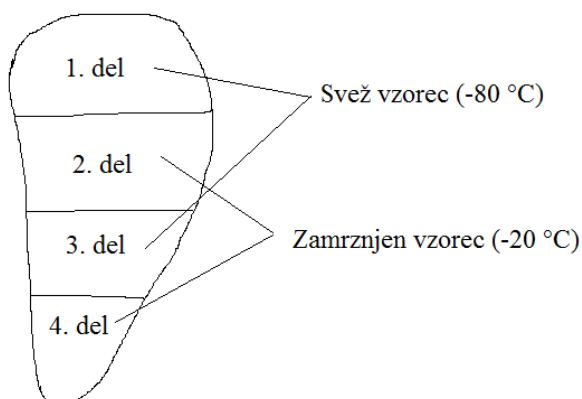
3.2.2.1 Odvzem vzorcev krvi

Kri za izolacijo limfocitov za kometni test smo odvzeli iz perutne vene s pomočjo metuljčkov Safety-Lok (0,8×19×304,8 mm, BD) v vakuumske epruvete. Ob zakolu smo odvzeli kri za določanje MDA v plazmi. Za določanje MDA smo uporabili epruvete BD 367864 (6 ml) za kometni test pa BD 368841 (2 ml). V obeh epruvetah je bil dodan

antikoagulant EDTK. Kri za določanje MDA smo centrifugirali 15 min pri 4 °C pri 1000 x g. Plazmo, ki smo jo dobili smo prenesli v 1,5 ml plastične Eppendorf epruvete in jo do nadaljnjih analiz hranili na -80 °C.

3.2.2.2 Odvzem vzorcev prsne mišičnine

Za določanje MDA v prsni mišičnini, smo živalim odvzeli prsno mišičnino s kostjo in kožo. Polovico prsne mišičnine smo izkostili in jo čim bolj enakomerno razdelili na štiri dele s prečnim prerezom. Del 1 in 3 (slika 6) smo zapakirali v plastične vrečke, označili, ga shranili pri -80 °C kot svež vzorec, saj so pri tako nizki temperaturi ustavljeni vsi biološki in kemični procesi. Del 2 in 4 smo prav tako zapakirali v plastične vrečke, ga označili in shranili pri -20 °C za 3 mesece.



Slika 6: Delitev vzorcev prsne mišičnine

Drugo polovico prsne mišičnine smo shranili v hladilnico pri 4-5 °C za 24 ur. Mišičnina je bila na vrhu pokrita s kožo, spodaj pa je bila zaščitena s kostjo, tako smo omejili izsuševanje. Po pretečenem času smo izmerili električno prevodnost in pH mišice. Nato smo vzorce mišičnine natančno izkostili in stehali, da smo lahko ocenili delež prsne mišičnine glede na telesno maso. Za nadaljnje analize smo vedno na enakem delu mišičnine odvzeli po dva približno 1 cm debela vzorca. Enega smo namenili merjenju barve, drugega smo najprej stehali nato namenili določanju izceje.

Preostanek druge polovice prsne mišičnine smo ustrezno zapakirali in označili ter za 6 dni shranili v hladilnik. Po šestih dneh smo vzorce mesa zamrznili pri -20 °C za 3 mesece.

Vzorci, namenjeni za določanje MDA, smo po treh mesecih v skrinji delno odtajali, zrezali na tanke lističe, prelili s tekočim dušikom in rahlo strli s terilnikom. Delno zdrobljen vzorec smo homogenizirali z napravo Retsch Grindomix GM 200. Dobljen zmlet vzorec smo zapakirali v ustrezno označene vrečke. Da ni prišlo do mešanja vzorcev ali netočnih rezultatov smo med vzorci pribor temeljito očistili. Vse homogenizirane vzorce smo ponovno shranili v skrinjo pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analiz.

3.2.3 Oksidativna stabilnost krme

3.2.3.1 Določanje malondialdehida v vzorcih krme

Za določanje MDA v krmnih mešanicah in hmelju smo v plastično epruveto s pokrovčkom odtehtali 100 mg vzorca, nato smo odpipetirali 0,5 ml raztopine BHT v metanolu in 1,0 ml 5 % raztopine TCK. Epruvete smo dobro zaprli in jih za 15 min namestili v vrtinčnik (vorteks), po mešanju smo jih za 15 min prenesli v centrifugo na 15000 obratih/min pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za derivatizacijo smo 0,75 ml supernatanta iz plastične epruvete prenesli v stekleno epruveto, kamor smo dodali še 1,5 ml 0,6 % raztopine TBK. Epruvete smo dobro zaprli in prenesli v grelni blok za 60 min pri $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po derivatizaciji smo epruvete ohladili z mrzlo vodo. Derivatizirane vzorce smo prefiltrirali skozi filter s porami 0,45 mm v steklene vialo in analizirali s HPLC.

3.2.4 Določanje malondialdehida v krvni plazmi in kometni test

3.2.4.1 Določanje malondialdehida v vzorcih krvne plazme

Pri določanju MDA v plazmi smo za vsak vzorec naredili tri vzporedne določitve. Za analizo smo uporabili tri reagente in sicer 0,44 M raztopino folne (V) kisline iz 85 % H_3PO_4 , 0,6 % raztopino 2-tiobarbiturne kisline (TBK) in 0,2 % raztopino BHT v etanolu. Vzorce krvne plazme smo predhodno odmrznili in v 1,5 ml plastične epruvete s pokrovčkom v naslednjem vrstnem redu odpipetirali: 200 μl 0,44 M raztopine H_3PO_4 , 20 μl 0,2 % raztopine BHT v absolutnem alkoholu in 200 μl plazme oziroma Milli Q vode za slepi vzorec. Tako pripravljene vzorce smo premešali na vrtičniku in pustili stati 15 min. Nato smo dodali 600 μl absolutnega etanola in ponovno premešali na vrtičniku ter centrifugirali 15 min pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 15000 x g. Standardov in slepih vzorcev nismo

centrifugirali. Po centrifugiranju smo v Hachove epruvete v naslednjem vrstnem redu odpipetirali 1,5 ml 0,44 M raztopino H_3PO_4 , 700 μ l centrifugiranega vzorca, 0,3 ml Milli Q vode in 0,5 ml 0,6 % raztopine TBK v Milli Q vodi. Tako pripravljene vzorce smo premešali in položili v termostatski blok za 60 minut pri 95 °C. Po pretečenem času smo vzorce ohladili v vodni kopeli z ledom. Ohlajene vzorce smo s pomočjo 5 ml brizg prefiltrirali skozi 0,22 μ m Milliporove filtre v 2 ml viala za avtomatski vzorčevalnik in analizirali s HPLC.

3.2.4.2 Ovrednotenje poškodb DNK limfocitov s kometnim testom

3.2.4.2.1 Izolacija limfocitov

Za izolacijo limfocitov smo sledili metodi, ki so jo opisali (Singh in sod., 1988) z manjšimi lastnimi modifikacijami. V centrifugirko smo odpipetirali 1,25 ml Histopaque – 1077. Tej snovi smo previdno dodali mešanico krvi in gojišča RPMI – 1640 v razmerju 1:1. Centrifugirke smo dobro zaprli in vzorce položili v centrifugo. Centrifugirali smo 25 minut pri sobni temperaturi in 300 x g. Za nadaljnji postopek smo si pripravili nove centrifugirke v katere smo odpipetirali 2,5 ml RPMI – 1640 medij. V te centrifugirke smo prenesli centrifugirane limfocite in še enkrat centrifugirali pod enakimi pogoji, le za krajši čas, 5 minut. Ta postopek smo ponovili dvakrat. Po zadnji ponovitvi je v centrifugirki nastal pelet in supernatant. Supernatant smo zavrgli, pelet pa suspendirali v 0,5 ml RPMI – 1640 medija. Postopek smo nadaljevali z mešanjem na vrtičniku, da smo pelet razbili in dodali v LMP agarozo v razmerju 1:5 (0,4 ml suspenzije limfocitov + 1,6 ml 0,6 % LMP agaroze).

3.2.4.2.2 Izvedba kometnega testa

Tudi postopek, ki smo ga uporabili pri kometnem testu sledi postopku po Singh in sod. (1988). V postopek smo vnesli nekaj sprememb, uporabili smo več slojev agaroze, daljši čas elektroforeze in nižjo koncentracijo etidijevega bromida. Limfocite, ki smo jih predhodno izolirali, smo vključili v agarozne gele. Vzporedno smo pripravili tudi pozitivno kontrolo, za katero smo minigele potopili v raztopino H_2O_2 , s tem smo povzročili poškodbe. Postopek smo nadaljevali s celično lizo, elektroforezo, nevtralizacijo, barvanjem z etidijevim bromidom in ponovnim spiranjem.

Za pridobitev rezultatov glede poškodb DNK smo uporabili fluorescentni mikroskop (Olympus CH 50, Japonska). Pomagali smo si z 200 – kratno povečavo, ekscitacijsko svetlobo z valovno dolžino med 515 in 560 nm in emisijskem filtrom 590 nm. Dobljeno sliko smo s pomočjo kamere Hamamatsu Orca 2 (Japonska) prenesli na računalnik. Z računalniškim programom Komet 5 (Single Cell Gel Electrophoresis, Kinetic Imaging Ltd., 2000 VB) smo ovrednotili poškodbe DNK v celici. Program deluje tako, da na sliki okoli jedra ustvari okence, ki zajema glavo in rep kometa, z ukazom s klikom na desni gumb potrdimo meritev in računalnik izračuna delež DNK v glavi in repu kometa ter parametre za vrednotenje poškodb.

V našem poskusu smo za vsak vzorec ocenili poškodbe 100-tih celičnih jeder. Ocene smo ovrednotili s pomočjo programa Microsoft Excel in prikazali kot % DNK v repu kometa in repnega momenta po Olivu (OTM; Olive in sod., 1992).

Odstotek repnega kometa izračunamo tako, da od celokupnega fluorescentnega signala odštejemo nastali signal v glavi kometa. OTM pa izračunamo tako, da najprej izračunamo razliko med centrom v repu in centrom v glavi kometa, rezultat pomnožimo z intenzivnostjo signala v repu nato pa delimo z intenzivnostjo signala celotnega kometa.

Enačba za OTM:

$$\text{OTM} = (\text{srednja vrednost deleža DNK v repu} - \text{srednja vrednost deleža DNK v glavi}) \\ \times (\% \text{ DNK repa}) \div 100 \quad \dots(1)$$

Večja kot je vrednost OTM, večje so poškodbe.

3.2.5 Oksidativna stabilnost in kakovost mesa

3.2.5.1 Določanje malondialdehida v vzorcih prsne mišičnine

Za določanje MDA v prsni mišičnini smo v 2 ml plastične epruvete s pokrovčkom odtehtali približno 0,3 g vzorca (med 0,2 in 0,4 g; na štiri decimalna mesta natančno), za vsak vzorec smo naredili dve vzporedni določitvi. Pri analizi smo uporabili dva reagenta in sicer 0,6 % raztopino 2-tiobarbiturne kisline (TBK) in 2,5 % raztopino triklorocetne kisline (TCK). V epico z vzorcem smo dodali 1,5 ml 2,5 % TCK (m/m) z avtomatsko pipeto. Za

slepi vzorec smo uporabili Milli (MQ) vodo, kateri smo dodali enake reagente kot v epice z vzorcem. Zmes smo dobro premešali na vrtičniku, počakali 10 min in še enkrat premešali. Nato smo epice zložili v centrifugo in centrifugirali 15 min pri 4 °C in 15000 obratov/min. Med centrifugiranjem smo pripravili epruvete z navojem in pokrovčkom za nadaljevanje analize. Po centrifugiranju smo 1 ml supernatanta odpipetirali v epruveto. Supernatantu smo dodali 1,5 ml 0,6 % TBK in 1 ml Milli Q (MQ) vode. Zmes smo premešali na vrtičniku in derivatizirali 60 min pri 90 °C. Pri segrevanju v kisli raztopini nastane rožnat kompleks, ki ga tvorijo molekule TBK in MDA. Po končani derivatizaciji smo vzorce ohladili v vodni kopeli z ledom. Ohlajene vzorce smo s pomočjo brizg prefiltrirali skozi 0,5 µm Milliporove filtre v vialo za avtomatski vzorčevalnik in analizirali s HPLC.

Za določevanje MDA s HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) smo uporabili aparat 1260 Infinity (Agilent Technologies). Aparat je opremljen s črpalko (1260 Infinity quaternary pump (Agilent)), avtomatskim vzorčevalnikom (1260 Infinity ALS) opremljenim s termostatom (1260 Infinity thermostat (Agilent)), z UV/VIS detektorjem (1260 Infinity VWD VL + (Agilent)) in detektorjem za merjenje fluorescence (1260 Infinity FLD (Agilent)). Podatke smo ovrednotili s programom Agilent openLab SDS ChemStation edition (Rev. C.01.05 (35)).

Ločevanje kompleksa MDA je potekalo na koloni HyperClone 5 µm ODS (C₁₈) 120A (4,6 x 150 mm; Phenomenex Inc., ZDA). Pretok mobilne faze skozi kolono je bil 1 ml/min, čas analize pa 8 min/vzorec. Pri analizi krme smo injicirali 20 µl vzorca, pri analizi plazme 100 µl vzorca in pri analizi mišičnine 50 µl vzorca. Temperatura vzorcev in kolone je bila enaka sobni temperaturi.

Za mobilno fazo pri analizi smo uporabili mešanico 50 mM kalijevega dihidrogen fosfatnega pufra (KH₂PO₄), pH je 6,9 in metanola (MeOH) v razmerju 65:35 (pufer: MeOH). pH raztopine pufra smo uravnavali z 1 M KOH. Pred uporabo smo pufer prefiltrirali skozi 0,45 µm Milliporov membranski filter.

Za umerjanje smo uporabili standardno raztopino tetraetoksiopropan (1,1,3,3-tetraetoksiopropan), ki v kislem razpade in nastane MDA.

Za določanje lastnosti kakovosti mesa smo uporabili pH meter, merilnik električne prevodnosti, merilnik barve in analitsko tehniko.

3.2.5.2 pH mesa

pH mesa smo merili z avtomatskim pH metrom z vbodno elektrodo, pri čemer smo konico elektrode potisnili v najdebelejši del prsne mišičnine in zabeležili izmerjeno vrednost pH. Med vsakim merjenjem smo konico sprali z destilirano vodo.

3.2.5.3 Barva mesa

Barvo mesa na vzorcih smo merili z Minolta CR 300 (Minolta camera, Osaka, Japonska), uporabili smo svetlobni vir C, barvo pa izrazili kot CIE vrednosti za svetel (L), rdeč (a) in rumen (b) odtenek. Vzorce za merjenje barve mesa smo shranjevali na petrijevkah v hladilnici pri 4 °C, pod konstantno UV lučjo. Barvo mesa smo merili sedem dni po zakolu.

3.2.5.4 Električna prevodnost in izceja mesa

Električno prevodnost prsne mišičnine smo merili dan po zakolu z napravo LF Star. Vzorce namenjene merjenju izceje smo pred začetkom analize stekali z analitsko tehniko. Nato smo vsak vzorec zaščitili z vrečko in obesili tako, da je vzorec v vrečki prosto visel. Po 48 urah smo tehtanje ponovili. Drugo meritev smo odšteli od prve in izračunali delež izgube.

3.2.6 Statistična obdelava podatkov

Dobljene podatke iz poskusa smo statistično obdelali s programsko opremo SAS 9.3. Za test normalnosti porazdelitve podatkov smo uporabili proceduro UNIVARIATE, za izračun statističnih parametrov pa smo uporabili proceduro MEANS. Podatke smo obdelali s proceduro GLM. Rezultate smo podali kot ocenjene srednje vrednosti (LSMEANS) ± standardna napaka. Razlike med skupinami smo ovrednotili s pomočjo kontrastov in Tukey-evega testa.

Vpliv skupine smo ocenjevali za proizvodne lastnosti piščancev (začetna masa (21. dan), končna masa (37. dan), prirast, masa polovice prsne mišičnine), lastnosti kakovosti mesa (pH, izceja, električna prevodnost in barva mesa), koncentracijo MDA (v krmi, plazmi in mesu) in poškodbe celic (DNK v repu in glavi kometa ter OTM).

$$y_{ij} = \mu + S_i + e_{ij} \quad \dots(2)$$

y_{ij} = opazovana vrednost

μ = srednja vrednost

S_i = vpliv i-te skupine (1,2,3)

e_{ij} = ostanek

4 REZULTATI

4.1 PROIZVODNE LASTNOSTI PIŠČANCEV

Živali so bile zdrave, v poskusnem obdobju nismo zaznali nobenih posebnosti. Piščance smo tehtali tedensko. Na dan tehtanja smo stehali tudi ostanke krme. Do 14. dne smo tedensko spremljali priraste in količino zaužite krme na skupino (28 piščancev na skupino) (Preglednica 5).

Preglednica 5: Telesne mase piščancev in zauživanje krme do 14. dne

	KONT	KONT_0,9	KONT_3,6
Masa ob uhlevitvi (g)	41,9	43,4	42,5
Masa na 7. dan (g)	143,2	148,0	142,6
Masa na 14. dan (g)	437,4	446,2	437,6
Zauživanje krme do 14.dne (g)	472,1	477,6	471,0

KONT – kontrolna krma (PKM), KONT_0,9 – krma z dodatkom 0,9 kg hmelja/t PKM, KONT_3,6 – krma z dodatkom 3,6 kg hmelja/t PKM

Živali so v času poskusa dobro priraščale. Na 7. in 14. dan so bile živali v skupini KONT_0,9 najtežje, sledili sta skupini KONT in KONT_3,6. Večjo maso živali v skupini KONT_0,9 lahko povežemo s količino zaužite krme, te živali so zaužile več krme kot živali v skupini KONT in KONT_3,6 (preglednica 5).

21. dan poskusa smo štiri najboljše in štiri najslabše piščance na skupino izločili, tako je bilo v nadaljevanju v poskus vključenih 20 piščancev na skupino. Te piščance smo označili in spremljali individualne priraste.

Zauživanje in izkoriščanje krme smo še vedno spremljali enkrat tedensko na skupino.

Preglednica 6: Proizvodni rezultati piščancev na koncu poskusa (37. dan)

	KONT	KONT_0,9	KONT_3,6
Zauživanje krme (g)	3572,7	3526,7	3417,5
Prirast (g)	2364,7	2347,8	2227,5
Izkoriščanje krme (kg/kg)	1,49	1,50	1,53

KONT – kontrolna krma (PKM), KONT_0,9 – krma z dodatkom 0,9 kg hmelja/t PKM, KONT_3,6 – krma z dodatkom 3,6 kg hmelja/t PKM

Živali so bile skozi celotno obdobje krmljene po volji. Največ krme so zaužile živali iz skupine KONT, najmanj pa iz skupine KONT_3,6. Ta podatek sovpadajo z rezultati prirasta. Živali iz skupine KONT_3,6 so morale zaužiti več krme za enoto prirasta kot KONT in KONT_0,9 (preglednica 6).

Na koncu poskusa smo iz vsake skupine naključno odbrali 12 živali in jih žrtvovali za nadaljnje analize. Individualno zbrane podatke smo statistično obdelali. Proizvodni rezultati piščancev so prikazani v preglednici 7. Za začetno maso štejemo 21. dan (prvo individualno tehtanje), končna masa predstavlja dan zakola (37. dan).

Preglednica 7: Telesne mase piščancev 21. in 37. dan poskusa ter masa polovice prsne mišičnine (LSM ± standardna napaka)

	KONT	KONT_0,9	KONT_3,6	p
Začetna masa, 21. dan (g)	1011,7 ± 22,9	981,8 ± 22,9	983,6 ± 22,9	0,5913
Končna masa, 37. dan (g)	2673,2 ± 64,0	2677,4 ± 64,0	2481,7 ± 64,0	0,0608
Prirast (g)	1661,5 ^a ± 54,5	1695,6 ^b ± 54,5	1497,9 ^c ± 54,5	0,0337
Masa polovice prsne mišičnine (g)	242,3 ± 9,4	263,0 ± 9,4	240,7 ± 9,4	0,1882

KONT – kontrolna krma (PKM), KONT_0,9 – krma z dodatkom 0,9 kg hmelja/t PKM, KONT_3,6 – krma z dodatkom 3,6 kg hmelja/t PKM

p – vrednost nam pove ali so razlike med skupinami statistično značilne ($p < 0,05$)

a,b,c – skupine z različnimi črkami so se med seboj statistično značilno razlikovale

V povprečju so bile živali v vseh skupinah na začetku individualnega spremljanja enako težke. Na koncu poskusa med kontrolno skupino in KONT_0,9 ni bilo razlike v končni telesni masi živali, nekoliko lažje živali so bile v skupini KONT_3,6, vendar med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik.

Statistično značilne razlike so bile v prirastu med skupinami. Najbolje je priraščala skupina z dodatkom 0,9 kg hmelja/t krmne mešanice, najslabše pa skupina z 3,6 kg hmelja/t krmne mešanice. Prirast se odraža tudi v masi polovice prsne mišičnine. Najtežjo (263,0 g) so imeli piščanci iz skupine KONT_0,9, najlažjo (240,7 g) pa piščanci iz skupine KONT_3,6, vendar razlike niso bile statistično značilne.

4.2 OKSIDATIVNA STABILNOST KRME

4.2.1 Koncentracija malondialdehida (MDA) v krmni mešanici in hmelju

Oksidativni status krme in hmelja smo merili s koncentracijo MDA (preglednica 8).

Preglednica 8: Rezultati analiz MDA v krmnih mešanicah in hmelju

Krmna mešanica / hmelj	MDA (nmol/g)
Štarter	
KONT ¹	106,42
KONT_0,9 ¹	134,96
KONT_3,6 ¹	134,63
Finišer	
KONT ²	59,70
KONT_0,9 ²	124,22
KONT_3,6 ²	154,08
Hmelj	
Sveži hmelj (-80)	40,43
Hmelj v hladilniku	65,10

KONT¹ – kontrolna krma (PKM), KONT_0,9¹ – štarter z dodatkom 0,9 g hmelja/kg PKM, KONT_3,6¹ – štarter z dodatkom 3,6 g hmelja/kg PKM, KONT² – finišer kontrolna krma (PKM), KONT_0,9² – finišer z dodatkom 0,9 g hmelja/kg PKM, KONT_3,6² – finišer z dodatkom 3,6 g hmelja/kg PKM

Krma z dodatkom hmelja je bolj oksidirala kot krma brez dodatka (preglednica 8). V štarterju se vsebnost MDA ni bistveno razlikovala med krmnimi mešanicami. Najmanjšo koncentracijo MDA je imela krma skupine KONT (106,42 nmol/g), med skupinama z dodatkom hmelja pa razlike skoraj nismo opazili (KONT_0,9 - 134,96 nmol/g; KONT_3,6 – 134,63 nmol/g). Velike razlike v koncentraciji MDA smo izmerili pri finišerju. Ta se je z vsebnostjo hmelja v krmi poviševala. V krmi brez dodatka smo izmerili 59,70 nmol/g, v krmi z dodatkom 0,9 kg hmelja/t krmne mešanice je bila vrednost dvakrat večja (124,22 nmol/g), v krmi z dodatkom 3,6 kg hmelja/t krmne mešanice pa celo za skoraj trikrat večja (154,08 nmol/g).

Tudi v hmelju smo izmerili koncentracijo MDA. V hmelju, ki smo ga hranili na -80 °C smo izmerili 40,43 nmol/g MDA. Drugi vzorec, ki smo ga hranili v hladilniku pa 65,10 nmol/g (preglednica 8).

4.3 OKSIDATIVNI STRES IN POŠKODBE DNK LIMFOCITOV

Oksidativni status pitovnih piščancev smo merili s koncentracijo MDA v krvni plazmi in poškodbo DNK limfocitov s kometnim testom.

Preglednica 9: Rezultati analiz MDA v plazmi in kometnega testa (LSM \pm standardna napaka)

	KONT	KONT_0,9	KONT_3,6	p
MDA_plazma (nmol/ml)	1 ^a \pm 0,60	2,06 ^b \pm 0,60	13,29 ^c \pm 0,60	< 0,001
DNK v repu (%)	22,02 ^a \pm 1,72	19,28 ^b \pm 1,72	15,17 ^c \pm 1,57	0,0333
OTM ¹	7,90 ^a \pm 0,80	6,13 ^b \pm 0,80	3,17 ^c \pm 0,73	0,0025

KONT – kontrolna krma (PKM), KONT_0,9 – krma z dodatkom 0,9 kg hmelja/t PKM, KONT_3,6 – krma z dodatkom 3,6 kg hmelja/t PKM

OTM¹ – repni moment po Olivu

p – vrednost nam pove ali so razlike med skupinami statistično značilne ($p < 0,05$)

a,b,c – skupine z različnimi črkami so se med seboj statistično značilno razlikovale

V preglednici 9 so prikazani rezultati koncentracije MDA v krvni plazmi. Pri skupini KONT_3,6 smo v plazmi izmerili 13,29 nmol/ml MDA, medtem ko pri kontrolni skupini le 1 nmol/ml. Dodatek 0,9 kg hmelja/t krmne mešanice je prav tako povečal koncentracijo MDA (2,06 nmol/ml). Razlike med rezultati vseh skupin so bile med seboj statistično značilne.

Dodatek hmelja je ugodno vplival na zaščito DNK v limfocitnih celicah. Odstotek DNK v repu je bil ob dodatku hmelja manjši (KONT_0,9 – 19,28 in KONT_3,6 – 15,17) kot v kontrolni skupini. Izračunali smo repni moment po Olivu, ki nam pove dejansko poškodbo DNK v celicah. Piščanci v kontrolni skupini brez dodatka so imeli najbolj poškodovane verige DNK (OTM 7,9), z dodatkom hmelja so se poškodbe zmanjšale. Tako so bile poškodbe v skupini KONT_0,9 manjše (OTM – 6,13), v skupini KONT_3,6 pa najmanjše (OTM – 3,17). Razlike med skupinami so bile statistično značilne (preglednica 9).

4.4 OKSIDATIVNA STABILNOST IN KAKOVOST MESA

4.4.1 Koncentracija MDA v prsni mišičnini

Oksidativni status mesa, smo prav tako merili s koncentracijo MDA.

Preglednica 10: Rezultati analiz MDA v prsni mišičnini (LSM \pm standardna napaka)

	KONT	KONT_0,9	KONT_3,6	p
MDA_sveže (-80 °C) nmol/g	17,64 ^a \pm 2,43	21,88 ^b \pm 2,43	26,36 ^c \pm 2,43	0,0523
MDA_20 nmol/g	15,93 \pm 3,76	13,93 \pm 3,76	19,37 \pm 3,76	0,5908
MDA_H20 nmol/g	25,64 \pm 4,41	27,71 \pm 4,41	34,42 \pm 4,41	0,3493

KONT – kontrolna krma (PKM), KONT_0,9 – krma z dodatkom 0,9 kg hmelja/t PKM, KONT_3,6 – krma z dodatkom 3,6 kg hmelja/t PKM

MDA_sveže (-80 °C) – vzorci prsne mišičnine shranjeni tri mesece pri -80 °C; MDA_20 – vzorci prsne mišičnine shranjeni za tri mesece pri -20 °C; MDA_H20 – vzorci prsne mišičnine shranjeni šest dni v hladilniku in nato za tri mesece pri -20 °C

p – vrednost nam pove ali so razlike med skupinami statistično značilne (p < 0,05)

a,b,c – skupine z različnimi črkami so se med seboj statistično značilno razlikovale

Koncentracijo MDA smo merili v svežem mesu, mesu skladiščnem pri -20 °C in mesu, ki smo ga najprej skladiščili 6 dni v hladilniku in nato 3 mesece pri -20 °C. Razlike v koncentraciji MDA med skupinami, katerih vzorce mesa smo hranili pri -80 °C, so bile na meji statistične značilnosti. Skupina z večjo vsebnostjo hmelja v krmi je imela višjo koncentracijo MDA v vzorcih mesa. Največjo koncentracijo MDA pri skladiščenju pri -20 °C so imeli vzorci mesa skupine KONT_3,6, najmanjšo pa skupina KONT, vendar so bile vrednosti manjše kot pri svežih vzorcih mesa (shranjenih pri -80 °C). Tudi v vzorcih mesa, ki je bilo predhodno shranjeno v hladilniku smo izmerili enak trend, največ MDA je bilo v skupini KONT_3,6 (34,42), najmanj pa v skupini KONT (25,64). Razlike med skupinami pod tema pogojeva niso bile statistično značilne (preglednica 10).

4.4.2 Kakovost mesa

Po zakolu smo ovrednotili lastnosti kakovosti mesa. Ovrednotili smo pH, električno prevodnost, izcejo in barvo. Barvo mesa smo dnevno spremljali sedem dni po zakolu (rezultati meritev na 1., 3., 5. in 7. dan so prikazani v preglednici 12).

Preglednica 11: Rezultati meritev fizikalnih lastnosti mesa (LSM ± standardna napaka)

	KONT	KONT_0,9	KONT_3,6	p
pH	5,94 ± 0,03	5,99 ± 0,03	5,92 ± 0,03	0,3229
Električna prevodnost (S/m)	2,68 ± 0,16	3,21 ± 0,16	3,03 ± 0,16	0,0819
Izceja (g)	0,30 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,7137

KONT – kontrolna krma (PKM), KONT_0,9 – krma z dodatkom 0,9 kg hmelja/t PKM, KONT_3,6 – krma z dodatkom 3,6 kg hmelja/t PKM

p – vrednost nam pove ali so razlike med skupinami statistično značilne ($p < 0,05$)

a,b,c – skupine z različnimi črkami so se med seboj statistično značilno razlikovale

Najvišji pH smo izmerili v mesu skupine KONT_0,9 (5,99), najnižjega v skupini KONT_3,6 (5,92). Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik. Razlik prav tako nismo beležili v izceji, katere vrednost se je gibala med 0,30 g in 0,32 g. Večje razlike, vendar statistično neznačilne so bile v električni prevodnosti. Najbolj prevodna je bila prsna mišičnina živali v skupini KONT_0,9, najmanj pa v kontrolni skupini brez dodatka hmelja (preglednica 11).

Preglednica 12: Rezultati merjenja barve mesa po dnevih (LSM \pm standardna napaka)

	KONT	KONT_0,9	KONT_3,6	p
1. dan				
L ¹	53,01 ^a \pm 0,61	50,24 ^b \pm 0,61	52,96 ^a \pm 0,61	0,0034
a ²	0,93 \pm 0,21	1,26 \pm 0,21	1,14 \pm 0,21	0,5336
b ³	5,57 ^a \pm 0,29	3,57 ^b \pm 0,29	1,87 ^c \pm 0,29	< 0,001
3. dan				
L ¹	57,39 \pm 0,58	56,10 \pm 0,58	57,63 \pm 0,58	0,1612
a ²	0,58 \pm 0,18	0,67 \pm 0,18	0,76 \pm 0,18	0,7641
b ³	8,27 ^a \pm 0,37	6,14 ^b \pm 0,37	4,81 ^c \pm 0,37	< 0,001
5. dan				
L ¹	56,53 ^a \pm 0,62	54,33 ^b \pm 0,62	56,12 ^a \pm 0,62	0,0391
a ²	0,42 \pm 0,16	0,98 \pm 0,16	0,66 \pm 0,16	0,0677
b ³	7,86 ^a \pm 0,40	5,77 ^b \pm 0,40	4,43 ^c \pm 0,40	< 0,001
7. dan				
L ¹	55,88 ^a \pm 0,54	53,83 ^b \pm 0,54	54,87 ^c \pm 0,54	0,0378
a ²	0,28 ^a \pm 0,12	0,80 ^b \pm 0,12	0,48 ^c \pm 0,12	0,0162
b ³	8,32 ^a \pm 0,39	6,15 ^b \pm 0,39	4,52 ^c \pm 0,39	< 0,001

KONT – kontrolna krma (PKM), KONT_0,9 – krma z dodatkom 0,9 kg hmelja/t PKM, KONT_3,6 – krma z dodatkom 3,6 kg hmelja/t PKM

L¹- določa svetlost, večje vrednosti pomenijo bolj svetlo, a² določa rdeč odtenek (+) ali zelen odtenek (-), b³ – določa rumen odtenek (+) in moder odtenek (-)

p – vrednost nam pove ali so razlike med skupinami statistično značilne (p < 0,05)

a,b,c – skupine z različnimi črkami so se med seboj statistično značilno razlikovale

Barvo mesa smo spremljali sedem dni, podatke smo ovrednotili na 1., 3., 5. in 7. dan. Po zakolu smo na sveži prsni mišičnini izmerili parametre svetlosti ter rdečega in rumenega odtenka. Dan po zakolu so imele najbolj svetlo meso so imele živali skupine KONT (53,01), skoraj enako kot živali skupine KONT_3,6 (52,96). Temnejši odtenek mesa je imela skupina KONT_0,9 (50,24) in se tako značilno razlikovala od ostalih skupin. Tretji dan je meso vseh treh skupin postalo svetlejše in bolj izenačeno v svetlosti. Peti dan skladiščenja je začelo meso postajati temnejše, kar se je nadaljevalo do sedmega dne. Tudi razlike med skupinami so se povečale. Kljub temnenju mesa je bila intenzivnost svetlosti višja kot prvi dan. Najsvetlejše meso na sedmi dan je bilo v skupini KONT (55,88), sledila je skupina KONT_3,6 (54,87), najtemnejše meso pa je imela skupina KONT_0,9 (53,83) (preglednica 12).

Rdeč odtenek mesa (a) se je s trajanjem skladiščenja in med skupinami spreminjal. Prvi dan je imela najmočnejši rdeč odtenek skupina KONT_0,9 (1,26), sledila je skupina KONT_3,6 (1,14) in nato KONT (0,93). S trajanjem skladiščenja se je zmanjševala intenzivnost rdečega odtenka v vzorcih mesa. Tretji dan so bile vrednosti bistveno manjše vendar se glede na skupine, tako kot prvi dan, niso bistveno razlikovale. Peti dan je intenzivnost rdečega odtenka še vedno padala, razen pri skupini KONT_0,9 kjer smo zabeležili povišanje rdečega odtenka (iz 0,67 (dan 3) na 0,98 (dan 5)). Sedmi dan smo ugotovili statistično značilne razlike med vsemi skupinami, odtenek rdeče barve je bil v skupini KONT_0,9 izrazito večji (0,80) kot v skupini KONT_3,6 (0,48) in skoraj trikrat večji kot v skupini KONT (0,28) (preglednica 12).

V prsni mišičnini piščancev prevladuje rumen odtenek (b). Že prvi dan smo med skupinami izmerili statistično značilne razlike v intenzivnosti rumenega odtenka. Ta je prevladoval v skupini KONT (5,57), z dodatkom hmelja se je intenziteta rumene barve manjšala, tako je imela skupina KONT_0,9 vrednost rumenega odtenka 3,57, skupina KONT_3,6 pa 1,87. S skladiščenjem se je intenzivnost rumenega odtenka povečevala. Peti dan so se vrednosti začele zmanjševati pri vseh skupinah in sicer pri skupini KONT iz 8,27 (dan 3) na 7,86 (dan 5), KONT_0,9 iz 6,14 (dan 3) na 5,77 (dan 5) in pri skupini KONT_3,6 iz 4,81 (dan 3) na 4,43 (dan 5). Sedmi dan se je intenzivnost rumenega odtenka spet začela povečevati, beležili smo podobne rezultate kot na tretji dan. Tako je rumen odtenek še vedno prevladoval v skupini KONT (8,32), z nižjo vrednostjo je sledila skupina KONT_0,9 (6,15), najnižjo pa je imela KONT_3,6 (4,52) (preglednica 12).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali dodatek hmelja pri pitovnih piščancih vpliva na rast, oksidativni stres ter oksidativno stabilnost in kakovost mesa.

Zaradi ekonomskih razlogov je želja rejcev po čim hitrejšem obratu jate. Tako intenzivna reja predstavlja stres za živali. Eden od dejavnikov stresa je tudi oksidacijski stres, ki nastopi ob neravnovesju med prostimi radikali in antioksidanti. Pitovni piščanci imajo velike potrebe po energiji, zato se v krmo dodaja večjo količino maščob z veliko vsebnostjo VNMK, ki so na oksidacijo zelo občutljive. Živali izpostavljene stresu se slabše počutijo, so bolj podvržene razvoju različnih bolezni, zaužijejo manj krme in posledično slabše priraščajo. Oksidacijski stres posledično vpliva tudi na kakovost piščančjega mesa. Takšno meso hitreje postane žarko, je neprijetnega vonja in okusa (Fellenberg in Speisky, 2006; Lykkesfeldt in Svendsen, 2007).

V prehranskem poskusu smo živalim v krmo dodali 7,5 % laneno olje z namenom spodbuditve oksidacijskega stresa. Maščobne kisline, ki prevladujejo v lanenem olju so α – linolenska kislina (55 %), linolenska kislina (13 %), oleinska kislina (19 %) in palmitinska kislina (6 %). Zaradi velike vsebnosti α – linolenske kisline, ki spada v skupino VNMK, je laneno olje dober vir le-teh (Zuk in sod., 2015). Laneno olje, ki smo ga uporabili v našem poskusu, je v povprečju vsebovalo (71,19 % VNMK, od tega 55,6 % omega-3 VNMK, razmerje med omega-3 in omega-6 MK pa je znašalo 1:4. Organizem potrebuje α – linolensko kislino, saj predstavlja prekursor za dokozaheksaenojsko kislino, ki spada v skupino omega-3 MK (Voljč, 2012). Esencialne MK organizem potrebuje, vendar so te zelo občutljive na oksidacijo in lahko ob prevelikem zauživanju povzročijo oksidacijski stres. Prav zaradi velike vsebnosti VNMK in drugih komponent kot so flavonoidi, tanini, β - karoteni in γ - tokoferol (5,7 mg/g olja) (Souci, 2008) laneno olje znanstveniki uporabljajo v raziskavah, kjer želijo obogatiti meso (López – Ferrer in sod., 2001), jajca (Galobart in sod., 2001) ali le spremeniti razmerje med MK v prid VNMK (Nuernberg in sod., 2005). Zauživanje živil, ki so bogata z VNMK, je za porabnika pomembno, saj

pozitivno vplivajo na zdravje. Zauživanje omega-3 MK zmanjša tveganje za razvoj raka, kardiovaskularnih bolezni in zmanjša vnetne procese (Zuk in sod., 2015).

Za zaščito živali pred oksidacijskim stresom smo v krmo dodali tudi vitamin E. Je eksogeni vitamin, topen v maščobah in velja kot najboljši antioksidant za zaščito VNMK pred lipidno oksidacijo. Veliko raziskav opisuje njegove pozitivne učinke na zaščito mesa in drugih živalskih proizvodov ter zaščito pred oksidacijo lipidov. Lipidi so prisotni v membranah vseh celic, zato je vredno omeniti, da poleg celic tkiv vitamin E ščiti tudi celice imunskega sistema (nevtrofilci, makrofagi, imunoglobulini). Znano je tudi, da spodbuja produkcijo protiteles in s tem imunski odziv (Ebeid in sod., 2013). Vitamin E je esencialen antioksidant tudi v prehrani ljudi. Optimalna vsebnost vitamina E zdravih odraslih oseb v plazmi je med 15 in 30 mg (Biesalski in sod., 1997). Bogato krmo z maščobami, ki je namenjena pitovnim piščancem in morebitne dodatke, ki vsebnost VNMK v krmi še povečajo, je potrebno zaščititi. V našem poskusu smo v vse krmne mešanice dodali 10 IU vitamina E na kg krme (NRC 1994). Zaradi dodatka lanenega olja, ki ima veliko vsebnost VNMK, te pa so oksidativno zelo nestabilne, je v krmo nujno potrebno dodati antioksidant. Priporočila o vsebnosti vitamina E v krmi se med avtorji razlikujejo. Vsebnost vitamina E v krmi vpliva na njegovo prisotnost v mesu (Voljč in sod., 2011). Avila-Ramos in sod. (2013) navajajo, da je za učinkovito zaščito kuhanega in nato zamrznjenega piščančjega mesa bolje dodati več kot 10 IU vitamina E/kg krme, prav tako večji vnos vitamina E v krmo za zaščito mesa pred oksidacijo priporočajo Voljč in sod. (2011). V našem poskusu smo se držali priporočil NRC (1994), ker nas je zanimalo kakšna je antioksidativna zaščita hmelja in koliko bo doprinesla k zaščiti pred oksidacijo. Priporočila za rejo pitovnih piščancev ross 308 navajajo 50 IU.

Glavni prehranski dodatek v našem poskusu je bil hmelj oziroma hmeljevi storžki. Prehrana živali je zelo pomembna, vpliva na zdravje živali, kakovost njihovih proizvodov, posredno pa tudi na zdravje ljudi in zaščito okolja. To so razlogi, da v zadnjih nekaj letih porabniki usmerjajo vse več pozornosti k naravnim prehranskim dodatkom in njihovim učinkovinam. Živali je potrebno preventivno zaščititi pred mikroorganizmi, v ta namen so pri reji piščancev uporabljali nutritivne antibiotike. S prepovedjo njihove uporabe v EU, se še bolj intenzivno išče primerno nadomestno učinkovino, najbolje naravnega izvora.

Pridelava hmelja predstavlja pomembno kmetijsko panogo v Sloveniji. Zaradi razmer na globalnem trgu in novih načinov konzerviranja hmelja (sušenje, peletiranje, skladiščenje v neprodušno zaprtih embalažah) prihaja do presežkov le-tega pri hmeljarjih in v pivovarnah. Poleg tega pa se pri proizvodnji piva zmanjšuje poraba alfa kislin. Da bi se hmeljarstvo v Sloveniji ohranilo ali še bolje, širilo, je njegova uporaba v prehrani živali še kako smiselna (Pavlovič, 2011; Krofta in sod., 2008). Hmelj vsebuje fenolne skupine, grenčične kisline (α in β – kisline), ksantohumol, prenilnaringenine in druge učinkovine za katere je znano, da imajo antioksidativno in antimikrobno delovanje. Te sestavine so pomembne za normalno delovanje organizma, ter ugodnega vpliva na zdravje in počutje živali (Van Cleemput in sod., 2009). Hmeljevo antimikrobno delovanje opisuje kar nekaj avtorjev. Bortoluzzi in sod. (2015) opisujejo hmeljevo β – grenčično kislino kot sredstvo, ki ščiti pitovne piščance pred kokcidiozo.

Hmelj, ki smo ga uporabili v poskusu, je bil predhodno sušen. Med sušenjem hmelj izgubi na antioksidativni aktivnosti, vendar te izgube navadno ne presegajo 5 %. Sušen hmelj je kemično bolj stabilen zaradi manjše vsebnosti vlage (8-12 %). Tako je primeren za daljši čas skladiščenja vendar pri nizki temperaturi (Krofta in sod., 2008). Sušene hmeljeve storžke smo zmleli v mlinu kladivarju in dodali krmi.

Rezultati kažejo manjše razlike v količini zaužite krme, prirastu in izkoriščanju krme. Najmanj krme so zaužile živali v skupini KONT_3,6, te so tudi značilno slabše priraščale in nekoliko slabše izkoriščale krmo. Med skupinama KONT in KONT_0,9 očitnih razlik v teh lastnostih nismo beležili. Na meji statistične značilnosti so bile živali na koncu poskusa, kjer smo ugotovili razlike v končni masi. Najlažja je bila skupina KONT_3,6 medtem, ko med skupinama KONT in KONT_0,9 ni bilo razlik. Primerljivo z našimi ugotovitvami, Cornelison in sod. (2006) navajajo dober prirast piščancev v času pitanja od 35. do 42. dne, ob dodatku 0,227 g hmelja/kg krme v primerjavi s kontrolo brez dodatka.

V našem poskusu smo polovico prsne mišičnine natančno odstranili od pripadajočih kosti in stehali. Največjo maso smo izmerili pri skupini KONT_0,9 (263,0 g), najmanjšo pa pri skupini KONT_3,6 (240,7 g), vendar med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v masi prsne mišičnine. Iz rezultatov sklepamo, da dodatek hmelja v krmi ni vplival na maso prsne mišičnine.

Zaradi dodatka 7,5 % lanenega olja je bila krma bogata z VNMK. Z analizo maščobnokislinske sestave krme smo določili vsebnost VNMK (omega-3 in omega-6, ter razmerje med njima). Njena vsebnost je bila tako v starterju kot finiŕerju relativno enaka (med 68,6 in 70,46 g/100 g vsote MK) od teh je bil deleŕ omega-3 MK (med 41,8 in 44,9 g/100 g vsote MK) veŕji od omega-6 MK (med 25,3 in 26,8 g/100 g vsote MK). Tudi razmerje med njima je bilo ugodno v vseh krmnih meŕanicah in se ni bistveno razlikovalo med krmnimi meŕanicami (med 0,57:1 in 0,60:1). Maŕčobnokislinsko sestavo smo določili tudi v hmelju, ki smo ga hranili v hladilniku. Hmelj je bolj bogat z omega-6 kot z omega-3 MK, zato je tudi razmerje med njima veliko ŕirŕe kot v krmnih meŕanicah (1,91:1). Vsebuje tudi veliko drugih dolgoveriŕnih MK, ki imajo 20 ali veŕ ogljikovih atomov (preglednica 4).

Krma, ki jo krmimo ŕivalim ima kljuŕno vlogo pri ohranjanju zdravja ŕivali. Pravilno razmerje med vsemi hranilnimi snovmi omogoŕa ŕivalim pogoje, da izpolnijo priŕakovane proizvodne rezultate. Krma z veliko vsebnostjo maŕčob nudi ŕivalim dobro energijsko podporo, vendar pa je občutljiva na oksidacijo. Produkti oksidacije v krmi vplivajo tudi na zdravje ŕivali. Kot je bilo ugotovljeno v preŕšnjih raziskavah (Rezar in sod., 2006), lahko koncentracija sekundarnega oksidacijskega produkta (MDA) vpliva na njegovo koncentracijo v krvni plazmi ŕivali.

Oksidacija lipidov poteka neprestano. Zaradi velike vsebnosti maŕčob v krmi, ki smo jo uporabili v poskusu nas je zanimala njena oksidativna stabilnost. Določili smo koncentracijo MDA v vseh krmnih meŕanicah ter hmelju. Med krmnimi meŕanicami ŕarterja smo ugotovili manjŕe razlike v vsebnosti MDA. Najniŕjo koncentracijo je imela skupina KONT (106,42 nmol/g), med skupinama KONT_0,9 in KONT_3,6 (134,96 in 134,63 nmol/g) pa ni bilo razlik. Do drugaŕnih ugotovitev smo priŕli pri krmnih meŕanicah finiŕerja. Tu so bile razlike zelo velike. Krmna meŕanica skupine KONT je vsebovala najmanj MDA (59,7 nmol/g) skoraj dvakrat veŕ ga je vsebovala skupina KONT_0,9 (124,22 nmol/g), najveŕ pa skupina KONT_3,6 (154,08 nmol/g). Krma s staranjem oksidira. Kenda (2014) je izmerila veŕ s TBK reagirajoŕih spojin v starani krmi kot sveŕi. V poskusu so v krmo dodali 6 % laneno olje in 10 IU vitamina E, podobno kot mi. Za zaŕcito krme so uporabili razliŕne antioksidante (viŕjo koncentracijo vitamina E (150 IU),

sintetični antioksidant ter oljčne liste in pulpo). Na podlagi rezultatov navaja oljčne liste in pulpo kot najbolj obetajoč naravni antioksidant za zaščito krme. Tudi v hmelju je bila koncentracija MDA kar visoka. V svežem hmelju smo izmerili 40,43 nmol/g v hmelju skladiščenem v hladilniku pa 65,10 nmol/g. Slabšo antioksidativno sposobnost in zmanjšanje alfa kisline v hmelju so med skladiščenjem v hladnem okolju ugotovili tudi Krofta in sod. (2008). Razlog za to avtorji ugotavljajo v povečanem deležu vlage, ki je negativno vplivala na polifenolne molekule in s tem okrnila antioksidativno zaščito. Kot že omenjeno so hmeljeve kisline zelo občutljive na oksidacijo v času skladiščenja. Tako se struktura alfa in beta kislin spremeni, izgubijo izoprenilno verigo, poleg tega pa nastajajo tudi druge kemične spojine, katere vsebnost še ni dobro znana. Steenackers in sod. (2015) prav tako navajajo, da v hmelju v času skladiščenja hitro pride do avtooksidacije. Na podlagi rezultatov in že objavljenih del o hmeljevi občutljivosti na oksidacijo lahko sklepamo, da bi morali krmo z dodatkom hmelja bolje zaščititi z večjo količino antioksidantov.

Zdravje živali smo ovrednotili z merjenjem poškodb DNK v limfocitih, katere so posledica oksidacijskega stresa. Imunske celice so najpomembnejši del organizma, prisotne v krvi, prebavilih in drugih tkivih (timus, bezgavke, vranica). Njihova primarna naloga je ščititi organizem pred negativnimi vplivi iz okolja in metaboličnimi produkti, ki lahko oslabijo organizem, med te produkte štejemo tudi proste radikale, ki so posledica oksidacijskega stresa. Pri pitovnih piščancih je nastanek oksidacijskega stresa največkrat pogojen s krmo zaradi dodajanja VNMK. Rezar (2001) navaja večje poškodbe DNK limfocitov, kjer je prehrana bogata z VNMK. V našem poskusu kjer je bila krma obogatena z lanenim oljem, nas je zanimalo ali dodatek hmelja vpliva na poškodbe DNK limfocitov. Za ovrednotenje poškodb smo uporabili tehniko kometnega testa, ki je natančna in relativno lahka. Iz rezultatov DNK v repu kometa smo ugotovili, da je imela največ poškodovane DNK skupina KONT (22,02), nekoliko manj skupina KONT_0,9 (19,28), najmanj pa skupina KONT_3,6 (15,17). Razlike med skupinami so bile statistično značilne. Pozitivne učinke dodatka rastlin, ki vsebujejo veliko polifenolov na zaščito pred poškodbami DNK navaja več avtorjev. Tako so Voljč in sod. (2013) ugotovili, da dodatek taninov in vitamina E v krmo, obogateno z lanenim oljem zmanjša poškodbe DNK limfocitov pri piščancih. Kim in sod. (2012) so želeli ugotoviti, kako korejski rdeči ginseng vpliva na poškodbo DNK

limfocitov pri človeku. Ljudje so dodatek zauživali v obliki kapsul. Ugotovili so, da že manjša doza rdečega ginsenga (3 g dnevno) statistično značilno zmanjša poškodbe DNK tako pri kadilcih in uživalcih alkohola kot pri nekadilcih in osebah, ki ne uživajo alkohola. Nasproten učinek so ugotovili Kapiszewska in sod. (2005), ki so v poskusu z ekstraktom origana testirali stabilnost DNK limfocitov pred poškodbami induciranimi z vodikovim peroksidom. Ekstrakt origana ni zaščitil DNK limfocitov pri človeku.

Poleg poškodb DNK limfocitov smo za ovrednotenje oksidacijskega stresa merili tudi koncentracijo MDA v krvni plazmi. MDA je sekundarni produkt lipidne oksidacije, zato je zelo uporaben marker za merjenje oksidacijskega stresa (Nielsen in sod., 1997). Rezultati v našem poskusu so pokazali, da hmelj značilno poveča koncentracijo MDA v plazmi. Pri skupini KONT smo v plazmi izmerili 1,00 nmol/ml plazme, pri skupini KONT_0,9 smo izmerili 2,06 nmol/ml plazme, pri skupini KONT_3,6 pa kar 13,40 nmol/ml plazme. Tudi Voljč (2012) je ob enakem dodatku lanenega olja v krmo ugotovila povečanje koncentracije MDA v krvni plazmi. Koncentracija MDA v skupini z lanenim oljem (0,65) je bila v primerjavi s kontrolno skupino (0,13) značilno višja. Podobne vrednosti MDA v plazmi piščancev kot smo jih mi ugotovili pri skupini KONT_3,6, so ugotovili tudi Vossen in sod. (2010) ob dodatku ekstrakta rožmarina, paradižnika, zelenega čaja in pešk grozdja. Vrednosti so se gibale od 14,6 do 16,2 nmol/ml plazme. Iz rezultatov lahko sklepamo, da polifenoli v hmelju nimajo zadostne antioksidativne učinkovitosti ob dodatku lanenega olja (7,5 %), bogatega z VNMK v krmo. Omenjeni avtorji ugotavljajo podobno, tudi v njihovem poskusu so za obogatitev krme z VNMK uporabili laneno olje, vendar nižje vrednosti (4 %), pa vendar je bila koncentracija MDA visoka, kljub rastlinskim dodatkom.

Humana prehrana, še posebno v razvitih državah vsebuje zelo malo VNMK. Vnos teh MK, še posebno iz skupine omega-3 je zelo pomembna z vidika zdravja. Za njih je znano, da zmanjšujejo tveganje za razvoj kardiovaskularnih in drugih bolezni. Najbogatejše živilo z VNMK so ribe in izdelki iz njih, ker pa je v nekaterih predelih sveta humana prehrana z ribami siromašna bodisi zaradi cenovne nedostopnosti ali drugih omejitev, je zelo smiselno s temi MK obogatiti živilo, ki je dostopnejše in velja za stalnico v prehrani, to je piščančje meso. Poraba piščančjega mesa v humani populaciji se povečuje in se bo po besedah Henschion in sod. (2014) še povečevala. Piščančje meso že samo po sebi vsebuje veliko

VNMK, vendar ta koncentracija ne zadošča potrebam človeku po teh MK, ki znaša 6-11 % zaužite energije (Elmadfa in Kornsteiner, 2009). Piščančje meso je živilo katerega MK sestavo lahko delno spremenimo s prehrano živali, tako meso spremenimo v funkcionalno živilo. V krmo dodamo sestavine z veliko vsebnostjo VNMK med katere štejemo laneno olje, ribje olje, oljčno olje, repično olje ter druge vire bogate z esencialnimi MK. Dodajanje ribjega olja v prehrano piščancev ima za posledico nezaželen priokus, zato je za obogatitev mesa bolj primerno laneno olje. Dodajanje VNMK v obliki lanenega olja v krmo piščancem se odraža v višji koncentraciji le-teh in zniževanju koncentracije NMK v mesu. Laneno olje vsebuje prekurzorje za tvorbo omega 3 MK (EPK, DHK) v piščančjem mesu (López-Ferrer in sod., 1999; López-Ferrer in sod., 2001; Grashorn, 2007). Slabost VNMK je da hitro oksidirajo, kar skupaj z mikrobno aktivnostjo poslabša lastnosti kakovosti mesa, meso postane žarko ter neokusno in neuporabno. Produkt oksidacije lipidov je MDA, katerega smo merili v naših poskusnih vzorcih mesa. Koncentracijo smo merili na vzorcih shranjenih pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za primerjavo smo del prsne mišičnine hranili šest dni v hladilniku in nato tri mesece v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rezultati so pokazali, da se je z vsebnostjo hmelja v krmni mešanici povečevala koncentracija MDA v vzorcih pri vseh skupinah. Statistično značilne razlike smo beležili le pri vzorcih svežega mesa, kjer je skupina KONT vsebovala 17,64 nmol/g, skupina KONT_0,9 21,88 nmol/g in skupina KONT_3,6 26,36 nmol/g. Ugotovili smo tudi, da se je največ MDA tvorilo v vzorcih, ki so bili pred zamrzovanjem v hladilniku, ti vzorci so bili pred zamrzovanjem izpostavljeni višji temperaturi, kar je pospešilo oksidacijo lipidov. Najmanj MDA pa se je tvorilo v vzorcih, hranjenih pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Razlike v koncentraciji MDA med skupinami pod tema pogojev niso statistično značilne. Razlog za povečano oksidacijo lipidov v vzorcih mesa piščancev krmljenih z dodatkom hmelja je verjetno v občutljivosti hmeljevih grenčičnih kislin na oksidacijo (Van Cleemput in sod., 2009). Oksidirane hmeljeve kisline imajo lahko okrnjeno antioksidativno sposobnost, prav tako pa lahko zaradi prisotnosti že nastalih prostih radikalov pospešijo oksidacijo že tako občutljivih VNMK v organizmu in vzorcih mesa. Prav tako ni dobro znano, katere kemijske spojine se tvorijo v času oksidacije hmeljevih kislin (Taniguchi in sod, 2013). Hmelj je znan po veliki vsebnosti polifenolov, za katere avtorji navajajo vrsto ugodnih vplivov. Na podlagi rezultatov MDA te lastnosti v našem poskusu niso prišle do izraza. Dobljeni rezultati niso bili v skladu z našimi pričakovanji. Predvidevali smo, da bo koncentracija v vzorcih mesa, ki so bili

shranjeni pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ najnižja, saj so biološki procesi pri tako nizki temperaturi ustavljeni in je to meso kot sveže. V nasprotju z našimi rezultati, je Voljč (2012) v svojem poskusu, kjer je primerjala različne koncentracije in oblike vitamine E na oksidativno stabilnost mesa, ugotovila najnižjo koncentracijo MDA v svežih vzorcih ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) pri vseh skupinah. Nekoliko višjo v vzorcih, ki so bili pred zamrzovanjem šest dni shranjeni v hladilniku, najvišjo koncentracijo MDA pa je izmerila v vzorcih mesa, ki so bili tri mesece shranjeni v zamrzovalniku ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Poleg hmelja imajo tudi druge rastline veliko vsebnost polifenolov, ki so v nasprotju z našimi rezultati, uspešno zmanjšale oksidacijo piščančjega mesa. Eden izmed njih je origano in dodatek le-tega v krmo. Botsoglou in sod., (2002) so v poskusu na pitovnih piščancih v krmo dodali 50 in 100 mg oranovega olja/kg krme z namenom, da bi ugotovili, kakšna je njegova antioksidativna sposobnost. Iz mesa so naredili polpete in jih skuhalo ter izmerili koncentracijo MDA. Rezultati so pokazali, da že 50 mg oranovega olja uspešno zniža koncentracijo MDA v polpetih, v primerjavi s kontrolno skupino, ki ni dobila dodatka. Večja vsebnost oranovega olja v krmi je bila še bolj učinkovita. Leto kasneje so isti avtorji z enakimi količinami oranovega olja v krmi ugotavljali antioksidativno zaščito zamrznjenega piščančjega mesa. Koncentracija MDA se je s časom shranjevanja poviševala, vendar je bilo v skupinah z dodatkom oranovega olja manj MDA v primerjavi s kontrolno skupino (Botsoglou in sod., 2003). Tudi lupina in peške grozdja so bogat vir polifenolov z antioksidativno aktivnostjo, zato je koncentrat iz tropin grozdja uporaben za zmanjševanje oksidacije lipidov. Omenjen dodatek krmi piščancev je učinkovito znižal koncentracijo MDA v vzorcih prsne mišičnine v primerjavi s kontrolno skupino, ki je bila krmljena brez dodatka (Brenes in sod., 2008). Bioaktivnost tropin grozdja potrjujejo tudi Chamorro in sod. (2014). Ugotovili so, da dodatek tropin grozdja v krmo piščancev statistično značilno zniža koncentracijo MDA v svežih vzorcih mesa piščančje bedrne mišičnine in tistih, ki so bili štiri dni shranjeni v hladilniku, v primerjavi s kontrolno skupino. Še učinkovitejša pri zniževanju koncentracije MDA je bila kombinacija tropin grozdja in vitamina E.

V nadaljevanju poskusa smo se osredotočili na fizikalne lastnosti mesa prsne mišičnine. Z merjenjem teh lastnosti in dobljenih rezultatov lahko ovrednotimo kakovost mesa in

ugotavljamo kaj se dogaja v času shranjevanja. Čas shranjevanja je pri svežih proizvodih zelo pomemben, saj vpliva na njihov videz, teksturo in senzorične lastnosti. Poslabšanje teh lastnosti ima za posledico manjši interes porabnika. Od fizikalnih lastnosti smo izmerili pH, električno prevodnost, izcejo in barvo mesa. pH smo izmerili v svežem mesu tik po zakolu. Vrednosti so bile tako rekoč enake pri vseh skupinah in so se gibale med 5,92 in 5,99. Tudi rezultati merjenja izceje so bili enaki pri vseh skupinah (0,3 g). Nekoliko večje razlike smo zabeležili pri merjenju električne prevodnosti, tu so se rezultati gibali med 2,68 S/m (KONT) in 3,21 S/m (KONT_0,9), razlike pri vseh treh lastnostih niso bile statistično značilne, saj so med seboj povezane.

Barvo mesa smo spremljali sedem dni po zakolu, merili smo parameter svetlosti (L) ter rdečega (a) in rumenega (b) odtenka. Med merjenjem smo opazili nekoliko več sprememb v posameznih parametrih po dnevih in skupinah. Statistično značilne razlike v svetlosti smo izmerili že prvi dan. S časom shranjevanja mesa v hladilniku so se razlike v svetlosti zmanjševale do petega dne, sedmi dan pa smo ponovno izmerili statistično značilne razlike med skupinami. Med shranjevanjem je imela najsvetlejšo meso skupina KONT. Pri merjenju rdečega odtenka v začetku poskusa nismo opazili razlik, s trajanjem shranjevanja mesa se je intenzivnost zmanjševala in se med skupinami sedmi dan merjenja tudi statistično značilno razlikovala. V piščančjem mesu prevladuje rumeni odtenek. Ta je med shranjevanjem nihal in se postopoma povečeval. Med skupinami se je intenzivnost rumenega odtenka značilno razlikovala. Največ rumenega odtenka je imela skupina KONT, najmanj pa skupina KONT_3,6. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je dodatek hmelja vplival na intenzivnost rumenega odtenka v prsni mišičnini. Potrebno bi bilo narediti še dodatne raziskave na kakšen način hmeljeve sestavine vplivajo na barvo mesa in kože. V nekaterih predelih sveta (Kitajska) je intenzivnejši rumen odtenek piščančjega mesa in kože priljubljen in pomemben dejavnik za porabnike, zato v prehrano dodajajo karotenoide različnega izvora (Hu in sod., 2012; Rajput in sod., 2013). Pri nas porabniki niso nagnjeni k intenzivnejši rumeni barvi mesa.

5.2 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov v raziskavi lahko sklepamo:

- Dodatek 3,6 kg hmelja/t krmne mešanice je negativno vplival na prirast živali, ni pa vplival na maso prsne mišičnine.
- Krma z dodatkom hmelja je imela višjo koncentracijo MDA kot krma kontrolne skupine. Hmelj lahko deluje kot prooksidant, vendar to področje še ni dobro raziskano.
- Dodatek 3,6 kg hmelja/t krmne mešanice je bolj zmanjšal poškodbe DNK limfocitov kot dodatek 0,9 kg hmelja/t krmne mešanice.
- Skupina z večjo vsebnostjo hmelja v krmi je imela višjo koncentracijo MDA v krvni plazmi.
- Večja vsebnost hmelja v krmi je imela za posledico višjo koncentracijo MDA v mesu, pri vseh načinih shranjevanja, razen pri vzorcih skupine KONT_0,9, ki so bili shranjeni pri -20 °C za 3 mesece.
- Koncentracija MDA v svežem mesu je bila višja od koncentracije MDA v shranjenem mesu, vendar nižja kot v mesu, ki je bilo pred zamrzovanjem shranjeno v hladilniku. V svežem mesu in mesu, ki je bilo shranjeno 6 dni v hladilniku in 3 mesece pri -20 °C skupine z dodatkom 3,6 g hmelja/kg smo izmerili višjo koncentracijo MDA kot v skupini z dodatkom 0,9 g hmelja/kg in kontrolni skupini, kjer je bila koncentracija najnižja. Najnižjo koncentracijo MDA je imelo meso shranjeno 3 mesece pri -20 °C, ne glede na vsebnost dodatka.
- Pri fizikalnih lastnostih mesa nismo ugotovili statistično značilnih razlik v pH, električni prevodnosti in izceji. Značilne razlike smo ugotovili le v barvi mesa, kjer je hmelj najbolj vplival na intenzivnost rumenega odtenka.

6 POVZETEK

V raziskavi smo preučevali ali ima dodatek hmelja vpliv na proizvodne lastnosti pitovnih piščancev in na antioksidativno zaščito živali. Zanimalo nas je tudi, kako vpliva na oksidativno stabilnost prsne mišičnine in fizikalne lastnosti mesa. Za spodbuditev oksidacijskega stresa smo živalim v krmo dodali 7,5 % laneno olje, ki je bogat vir VNMK.

V 37 dnevni poskus smo vključili 84 dan starih pitovnih piščancev. Piščance smo razdelili v tri skupine in jih tedensko tehtali. Živali so bile krmljene dnevno in po volji. Osnovna krmna mešanica je bila za vse skupine enaka, razlike so bile le glede na prisotnost in vsebnost dodatka. Skupini KONT nismo dodali nobenega dodatka. Osnovni krmni mešanici smo dodali 0,9 kg hmelja/t krmne mešanice in jo poimenovali KONT_0,9 ali 3,6 kg hmelja/t krmne mešanice z imenom KONT_3,6. Živalim smo na koncu poskusa odvzeli kri za določanje koncentracije MDA v plazmi in poškodb DNK limfocitov s kometnim testom. Ob zakolu smo odstranili prsno mišičnino, v kateri smo prav tako določali koncentracijo MDA ter ugotavljali vpliv dodatka na fizikalne lastnosti mesa. Koncentracijo MDA smo določali v svežem mesu, shranjenem pri -20°C za tri mesece in pri vzorcih mesa, katere smo pred zamrzovanjem šest dni hranili v hladilniku in nato še tri mesece pri -20°C .

Rezultati so pokazali, da je večja vsebnost hmelja vplivala na prirast živali v primerjavi s kontrolno skupino, ni pa vplivala na maso prsne mišičnine. Dodatek hmelja je povečal koncentracijo MDA, tako v štarterju kot v finiŝerju. Pri ovrednotenju parametrov zdravja živali smo ugotovili, da vsebnost hmelja v krmi ŝčiti DNK v limfocitih pred poŝkodbami. Pri oksidativni zaŝčiti živali in mesa se dodatek hmelja ni izkazal, saj je statistiĉno znaĉilno poviŝal koncentracijo MDA tako v plazmi kot v mesu, kar kaŝe na poveĉano oksidacijo VNMK v organizmu. Delno je poveĉanje vsebnosti MDA verjetno posledica oksidacije VNMK v krmi, za katero smo prav tako ugotovili viŝjo koncentracijo MDA ob prisotnosti hmelja. Shranjevanje mesa v hladilniku je koncentracijo MDA ŝe poveĉalo. Pri fizikalnih lastnostih mesa smo znaĉilne razlike opazili v barvi mesa, kjer se je med skupinami najbolj razlikovala intenzivnost rumenega odtenka. Dodatek hmelja je intenziteto rumene barve zmanjŝeval. V sedmih dneh merjenja barve smo nekaj znaĉilnih razlik med skupinami opazili tudi v svetlosti mesa, nekoliko manj razlik pa smo opazili v intenzivnosti rdeĉega

odtenka. Pri merjenju pH, električne prevodnosti in izceje nismo ugotovili statistično značilnih razlik.

Kar nekaj avtorjev navaja oksidativno nestabilnost in občutljivost hmeljevih kislin, sočasno pa navajajo njihovo antioksidativno in antimikrobno zaščito. Za izkoriščanje teh lastnosti bi bilo potrebno hmelj ali krmo z dodatkom hmelja ustrezno skladiščiti. Iz naših rezultatov je razvidno, da ima hmelj nekaj dobrih lastnosti, še posebno pri zaščiti zdravja živali, vendar bo za njegovo uporabo v živinoreji potrebno narediti še dodatne raziskave.

7 VIRI

- Abram V., Čeh B., Vidmar M., Hercezi M., Lazić N., Bucik V., Smole Možina S., Košir J. I., Kač M., Demšar L., Poklar Ulrih N. 2015. A comparison of antioxidant and antimicrobial between hop leaves and hop cones. *Industrial crops and products*, 64: 124-134
- Aruoma I. O. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American oil chemists' society*, 75: 199-212
- Avila-Ramos F., Pro-Martínez A., Sosa-Montes E., Cuca-García J. M., Becerril-Pérez C., Figueroa-Velasco J. L., Ruiz-Feria C. A., Hernández-Cázares A. S., Narciso-Gaytán C. 2013. Dietary supplemented and meat-added antioxidants effect on the lipid oxidative stability of refrigerated and frozen cooked chicken meat. *Poultry science*, 92: 243-249
- Beer statistics. 2014. Van de Walle M. (ur.). Brussels, The brewers of Europe: 36 str.
- Betti M., Schneider B. L., Wismer W. V., Carney V. L., Zuidhof M. J., Renema R. A. 2009. Omega-3-enriched broiler meat: 2. Functional properties, oxidative stability, and consumer acceptance. *Poultry science*, 88: 1085-1095
- Biesalski H. K., Böhles H., Esterbauer H., Fürst P., Gey F., Hundsdörfer G., Kasper H., Sies H., Weisburger J. 1997. Antioxidant vitamins in prevention. *Clinical nutrition*, 16: 151-155
- Bortoluzzi C., Menten J. F. M., Pereira R., Fagundes N. S., Napy G. S., Pedroso A. A., Bigaton A. D., Andreote F. D. 2015. Hops β -acids and zinc bacitracin affect the performance and intestinal microbiota of broilers challenged with *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. *Animal feed science and technology*, 207: 181-189
- Bošković A. 2009. Parametri oksidativnog stresa i ateroskleroza. SeminarSKI rad. Beograd, Farmaceutski fakultet: 13 str.
- Botsoglou N. A., Christaki E., Fletouris D. J., Florou-Paneri P., Spais A. B. 2002. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat science*, 62: 259-265
- Botsoglou N. A., Fletouris D. J., Florou-Paneri P., Christaki E., Spais A. B. 2003. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary *oregano* essential oil and α – tocopheryl acetate supplementation. *Food research international*, 36: 207-213

- Bozkurt M., Küçükyılmaz K., Çath A. U., Çinar M. 2009. Effect of dietary mannan oligosaccharide with or without oregano essential oil and hop extract supplementation on the performance and slaughter characteristics of male broilers. *South Africa journal of animal science*, 39, 3: 223-232
- Brenes A., Viveros A., Goñi I., Centeno C., Sáyago-Ayerdy S. G., Arija I., Saura-Calixto F. 2008. Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. *Poultry science*, 87: 307-316
- Chamorro S., Viveros A., Rebolé A., Rica B. D., Arija I., Brenes A. 2014. Influence of dietary enzyme addition on polyphenol utilization and meat lipid oxidation of chicks fed grape pomace. *Food research international*, 73: 197-203
- Collins A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 26: 249-261
- Cornelison J. M., Yan F., Watkins S. E., Rigby L., Segal J. B., Waldroup P. W. 2006. Evaluation of hops (*Humulus lupulus*) as an antimicrobial in broiler diets. *International journal of poultry science*, 5, 2: 134-136
- Cortés-Gutiérrez E. I., Dávila-Rodríguez M. I., Fernández J. L., López-Fernández C., Gosálbez A., Gosálvez J. 2011. New application of the comet assay: chromosome-comet assay. *Journal of histochemistry & cytochemistry*, 59, 7: 655-660
- Cortinas L., Barroeta A., Villaverde C., Galobart J., Guardiola F., Baucells M. D. 2005. Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: lipid oxidation. *Poultry science*, 84: 48-55
- Čerenak A. 2012. Slovenske sorte hmelja – včeraj, danes, jutri. *Hmeljar*, 74, 1-8: 15-18
- Delmulle L., Bellahcène A., Dhooge W., Comhaire F., Roelens F., Huvaere K., Heyerick A., Castronovo V., De Keukeleire D. 2006. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. *Phytomedicine*, 13: 732-734
- Dimitrios B. 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in food science & technology*, 17: 505-512
- Dorn C., Bataille F., Gaebele E., Heilmann J., Hellerbrand C. 2010. Xanthohumol feeding does not impair organ function and homeostasis in mice. *Food and chemical toxicology*, 48: 1890-1897

- Ebeid T.A., Zeweil H.S., Basyony M.M., Dosoky W.M., Badry H. 2013. Fortification of rabbit diets with vitamin E or selenium affects growth performance, lipid peroxidation, oxidative status and immune response in growing rabbits. *Livestock science*, 155: 323-331
- Elmadfa I., Kornsteiner M. 2009. Fats and fatty acid requirements for adults. *Annals of nutrition and metabolism*, 55: 56-75
- Fellenberg M. A., Speisky H. 2006. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. *World's poultry science journal*, 62, 1: 53-70
- Fiesel A., Gessner K. D., Most E., Eder K. 2014. Effects of dietary polyphenol-rich plant products from grape or hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and faecal microbiota of weaned pigs. *BMC Veterinary research*, 10: 196-207
- Frankič T., Salobir J. 2007. Antioksidanti v prehrani živali: pomen za živali in porabnike. V: Zbornik predavanj 16. posvetovanja o prehrani domačih živali »Zdravčevi – Erjavčevi dnevi«, Kapun S. in sod. (ur.), Radenci, 8. – 9. november 2007. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarski zavod: 27-40
- Frankič T., Voljč M., Rezar V., Salobir J. 2008. Rastlinski ekstrakti v prehrani živali. V: Zbornik predavanj – 17. mednarodno znanstveno posvetovanje o prehrani domačih živali: »Zdravčevi – Erjavčevi dnevi«, Čeh T. in sod. (ur.), Radenci 13. – 14. november 2008. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarski zavod: 10-22
- Galobart J., Barroeta A. C., Baucells M. D., Guardiola F. 2001. Lipid oxidation in fresh and spray-dried eggs enriched with ω 3 and ω 6 polyunsaturated fatty acids during storage as affected by dietary vitamin E and canthaxanthin supplementation. *Poultry science*, 80: 327-337
- Grashorn M. A. 2007. Functionality of poultry meat. *The journal of applied poultry research*, 16: 99-106
- Grueso I., De Blas J. C., Cachaldora P., Mendez J., Losada B., García-Rebollar P. 2013. Combined effects of supplementation of diets with hops and of a substitution of starch with soluble fiber on feed efficiency and prevention of digestive disorders in rabbits. *Animal feed science and technology*, 180: 92-100

- Guo Y., Tang Q., Yuan J., Jiang Z. 2001. Effects of supplementation with vitamin E on the performance and the tissue peroxidation of broiler chicks and the stability of thigh meat against oxidative deterioration. *Animal feed science and technology*, 89: 165-173
- Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R. R. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 18, 1: 45-51
- Hashizawa Y., Kubota M., Kadowaki M., Fujimura S. 2013. Effect of dietary vitamin E on broiler meat qualities, colour, water-holding capacity and shear force value, under heat stress conditions. *Animal science journal*, 84: 732-736
- Henchion M., McCarthy M., Resconi C. V., Troy D. 2014. Meat consumption: trends and quality matters. *Meat science*, 98: 561-568
- Hop report. 2013. European Commission, Agriculture and rural development: 3 str.
http://ec.europa.eu/agriculture/hops/reports/pdf/report-2013_en.pdf (21. jun. 2015)
- Hu C. H., Wang D. G., Pan H. Y., Zheng W. B., Zuo A. Y., Liu J. X. 2012. Effects of broccoli stem and leaf meal on broiler performance, skin pigmentation, antioxidant function, and meat quality. *Poultry science*, 91: 2229-2234
- Jakovljević V., Popović M., Rasković A., Sabo A., Vasić R. 2008. Effect of aroma and magnum hops extracts and paracetamol on antioxidant liver parameters in mice. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 4, 33: 205-209
- Ješe Janežič V. 2001. Koncentracija malondialdehida v krvni plazmi in seču kot indikator peroksidacije lipidov v prehranskih raziskavah. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 95 str.
- Jiang Z. Y., Jiang S. Q., Lin Y. C., Xi P. B., Yu D. Q., Wu T. X. 2007. Effects of soybean isoflavone on growth performance, meat quality and antioxidation in male broilers. *Poultry science*, 86: 1356-1362
- Kamboh A. A., Zhu W.-Y. 2013. Effect of increasing levels of bioflavonoids in broiler feed on plasma anti-oxidative potential, lipid metabolites, and fatty acid composition of meat. *Poultry science*, 92: 454-461
- Kapiszewska M., Sołtys E., Visioli F., Cierniak A., Zajac G. 2005. The protective ability of the mediterranean plant extracts against the oxidative DNA damage. The role of radical oxygen species and the polyphenol content. *Journal of physiology and pharmacology*, 56, 1: 183-197

- Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P. 2015. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology advances*, in press, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.009
- Karatas F., Karatepe M., Baysar A. 2002. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 311: 76-79
- Kenda N. 2014. Vpliv dodatkov oljčnih listov, pulpe ter njunih ekstraktov na oksidativno stabilnost krme za kokoši nesnice. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 60 str.
- Kim Y. J., Jin S. K., Yang H. S. 2009. Effect of dietary garlic bulb and husk on the physicochemical properties of chicken meat. *Poultry science*, 88: 398-405
- Kim Y. J., Park J. Y., Kang H. J., Kim O. Y., Lee J. H. 2012. Beneficial effect of Korean red ginseng on lymphocyte DNA damage, antioxidant enzyme activity, and LDL oxidation in healthy participants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition journal*, 11: 47-56
- Krofta K., Mikyška A., Haškova D. 2008. Antioxidant characteristics of hops and hop products. *Journal of the institute of brewing*, 2, 114: 160-166
- Lah B., Avberšek M., Gorjanc G., Marinšek Logar R. 2005. Toxic and genotoxic potential evaluation of soil samples by bioassays. *Acta agriculturae Slovenica*, 86, 1: 27-38
- Limón-Pacheco J., Gensebatt M. E. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation research*, 674: 137-147
- Loetscher Y., Kreuzer M., Messikommer R. E. 2013. Oxidative stability of the meat of broilers supplemented with rosemary leaves, rosehip fruits, chokeberry pomace, and entire nettle, and effects on performance and meat quality. *Poultry science*, 92: 2938-2948
- López-Ferrer S., Baucells M. D., Barroeta A. C., Grashorn M. A. 1999. n-3 enrichment of chicken meat using fish oil: alternative substitution with rapeseed and linseed oils. *Poultry science*, 78: 356-365
- López-Ferrer S., Baucells M. D., Barroeta A. C., Galobart J., Grashorn M. A. 2001. n-3 enrichment of chicken meat. 2. Use of precursors of long-chain polyunsaturated fatty acids: linseed oil. *Poultry science*, 80: 753-761

- Lykkesfeldt J., Svendsen O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The veterinary journal*, 173: 502-511
- Miranda C. L., Stevens J. F., Helmrich A., Henderson M. C., Rodriguez R. J., Yang Y.-H., Deinzer M. L., Barnes D. W., Buhler D. R. 1999. Antiproliferative and cytotoxic Effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and chemical toxicology*, 37: 271-285
- Miranda C. L., Stevens J. F., Ivanov V., McCall M., Frei B., Deinzer M. L., Buhler D. R. 2000. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. *Journal of agriculture and food chemistry*, 48: 3876-3884
- Narvaez N., Wang Y., Xu Z., McAllister T. 2011. Effects of hops *in vitro* ruminal fermentation of diets varying in forage content. *Livestock science*, 138: 193-201
- Nielsen F., Mikkelsen B. B., Nielsen J. B., Andersen H. R., Grandjean P. 1997. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical chemistry*, 43, 7: 1209-1214
- NRC. 1994. Nutrient requirements of poultry. 1994. 9 th revised edition. Washington, National Academy Press: 157 str.
[http://www.lamolina.edu.pe/zootecnia/biblioteca2012/NRC%20Poultry%201994\[1\].pdf](http://www.lamolina.edu.pe/zootecnia/biblioteca2012/NRC%20Poultry%201994[1].pdf)
(30. jun. 2015)
- Nuernberg K., Fischer K., Nuernberg G., Kuechenmeister U., Klosowska D., Eliminovska-Wenda G., Fiedler I., Ender K. 2005. Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and structure in pigs. *Meat science*, 70: 63-74
- Olive P. L., Wlodek D., Durand R. E., Banáth P. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental cell research*, 198: 259-267
- Pavlovič M. 2009. Ponudba hmelja v svetu v letih 2008 in 2009. *Hmeljar*, 71, 11-12: 91-92
- Pavlovič M. 2011. Ocena razmer na globalnem trgu s hmeljem v letih 2010 in 2011. *Hmeljar*, 73, 1-7: 35-38
- Pinto C., Cestero J. J., Rodríguez-Galdón B., Macías P. 2014. Xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus* L.), protects rat tissues against oxidative damage after acute ethanol administration. *Toxicology reports*, 1: 726-733

- Preston R. L., Vance R. D., Cahill V. R. 1973. Energy evaluation of brewers grain for growing and finishing cattle. *Journal of animal science*, 37: 174-178
- Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82: 513-523
- Rajput N., Naeem M., Ali S., Zhang J. F., Zhang L., Wang T. 2013. The effect of dietary supplementation with the natural carotenoids curcumin and lutein on broiler pigmentation and immunity. *Poultry science*, 92: 1177-1185
- Rezar V. 2001. Vpliv različnih virov vlaknine v obroku z velikim deležem maščob na oksidacijski stres pri prašičih. Magistrsko delo. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 130 str.
- Rezar V., Pajk Žontar T., Levart A., Salobir K., Krsnik M., Osredkar J., Salobir J. 2006. Relevance of meat fat content and fruit and vegetable intake for the oxidative status of pigs. *Annals of nutrition & metabolism*, 50, 1: 74-80
- Ross 308 Nutrition specification. 2007. Aviagen: 7 str.
http://www.natchix.co.za/pdf/nutrition_specifications.pdf (22. avg. 2015)
- Ross 308 Management manual. 2009. Aviagen: 114 str.
http://www.natchix.co.za/pdf/management_manual.pdf (22. avg. 2015)
- Sacakli P., Ergun A., Koksall B. H., Bayraktaroglu A. G., Sizmaz O. 2011. Effects of diets supplemented with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) products or/and hops (*Humulus lupulus*) on growth performance and intestinal morphology in broilers. *Revue de médecine vétérinaire*, 162, 11: 531-537
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82: 291-295
- Singh N.P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175: 184-191
- Siragusa G. R., Haas G. J., Matthews P.D., Smith R. J., Buhr R. J., Dale N. M., Wise M. G. 2008. Antimicrobial activity of lupulone against *Clostridium perfringens* in the chicken intestinal tract jejunum and caecum. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61: 853-858
- Skřivan M., Marounek M., Englmaierová M., Skřivanová E. 2012. Influence of dietary vitamin C and selenium, alone and in combination, on the composition and oxidative stability of meat of broilers. *Food chemistry*, 130: 660-664

- Souci S. W., Fachmann W., Kraut H. 2008. Food composition and nutrition tables, 7th revised and completed edition. Boca Raton, CRC Press; London, New York, Washington, Taylor & Francis: 1364 str.
- Stavri M., Schneider R., O'Donnell G., Lechner D., Bucar F., Gibbons S. 2004. The antimycobacterial components of hops (*Humulus lupulus*) and their dereplication. *Phytotherapy research*, 18: 774-776
- Steenackers B., De Cooman L., De Vos D. 2015. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing proces: a review. *Food chemistry*, 172: 742-756
- Stevens J. F., Page J. E. 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health. *Phytochemistry*, 65: 1317-1330
- Sun A. Y., Chen Y., James-Kracke M., Woxim P., Cheng Y. 1997. Ethanol-induced cell death by lipid peroxidation in PC12 cells. *Neurochemical research*, 10, 22: 1187-1192
- Surai P. F., Karadas F., Sparks N. H. 2003. The importance of antioxidants in poultry. Nineteenth Annual Carolina Poultry Conference.
http://www.researchgate.net/publication/236669474_The_importance_of_antioxidants_in_poultry (19. nov. 2014)
- SURS. 2015. Podatkovni portal SI-STAT, Pridelki in površina.
<http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/Saveshow.asp> (21. jun. 2015)
- Taniguchi Y., Matsukura Y., Ozaki H., Nishimura K., Shindo K. 2013. Identification and quantification of the oxidation products derived from α acids and β -acids during storage of hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 61: 3121-3130
- Tatum V. L., Changchit C., Chow K. C. 1990. Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Lipids*, 25: 226-229
- Tavárez M. A., Boler D. D., Bess K. N., Zhao J., Yan F., Dilger A. C., McKeith F. K., Killefer J. 2011. Effects of antioxidant inclusion and oil quality on broiler performance, meat quality, and lipid oxidation. *Poultry science*, 90: 922-930
- Tillman G. E., Haas G. J., Wise M. G., Oakley B., Smith M. A., Siragusa G. R. 2011. Chicken intestine microbiota following the administration of lupulone, a hop-based antimicrobial. *FEMS Microbiology ecology*, 77: 395-403

- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., T. D. Cronin M., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39: 44-84
- Van Cleemput M., Cattor K., De Bosscher K., Haegeman G., De Keukeleire D., Heyerick A. 2009. Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *Journal of natural products*, 72: 1220-1230
- Villalobos-Delgado L. H., Caro I., Blanco C., Bodas R., Andréa S., Giráldez F. J., Mateo J. 2015. Effect of the addition of hop (infusion or powder) on the oxidative stability of lean lamb patties during storage. *Small ruminant research*, 125: 73-80
- Voljč M., Frankič T., Levart A., Nemec M., Salobir J. 2011. Evaluation of different vitamin E recommendations and bioactivity of [alfa]-tocopherol isomers in broiler nutrition by measuring oxidative stress *in vivo* and the oxidative stability of meat. *Poultry science*, 90: 1478-1488
- Voljč M., Levart A., Žgur S., Salobir J. 2013. The effect of α -tocopherol, sweet chestnut wood extract and their combination on oxidative stress *in vivo* and the oxidative stability of meat in broilers. *British poultry science*, 54, 1: 144-156
- Voljč M. 2012. Vpliv kostanjevega tanina, *rrr*- α - in *all-rac*- α -tokoferola na zmanjšanje oksidacijskega stresa piščancev in izboljšanje oksidacijske stabilnosti njihovega mesa. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 86 str.
- Vossen E., Ntawubizi M., Raes K., Smet K., Huyghebaert G., Arnouts S., De Smet S. 2010. Effect of dietary antioxidant supplementation on the oxidative status of plazma in broilers. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 95: 198-205
- Wang Y., Chaves A. V., Rigby F. L., He M. L., McAllister T. A. 2010. Effects of hops on ruminal fermentation, growth, carcass traits and shedding of *Echerichia coli* of feedlot cattle. *Livestock science*, 129: 135-140
- Wong S. H. Y., Knight A. J., Hopfer M. S., Zaharla O., Leach N. C. Jr., Sunderman F. W. Jr. 1987. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical chemistry*, 33, 2: 214-220
- Zanoli P., Zavatti M. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of ethnopharmacology*, 116: 383-396

Zhang W., Xiao S., Lee E. J., Ahn D. U. 2011. Consumption of oxidized oil increases oxidative stress in broilers and affects the quality of breast meat. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59: 969-974

Zuk M., Richter D., Matuła J., Szopa J. 2015. Linseed, the multipurpose plant. *Industrial crops and products*, in press, doi: 10.1016/j.indscrop.2015.05.005

ZAHVALA

Na tem mestu bi se ob zaključku magistrskega študija rada zahvalila vsem, ki so mi kakorkoli pomagali v času študija in pri izdelavi magistrskega dela:

- mentorici doc. dr. Vidi Rezar za vso pomoč, strokovne nasvete, usmeritev v pravo razmišljanja in izredno prijaznost,
- somentorici asist. dr. Alenki Levart za nasvete, strokoven pregled naloge in prijaznost,
- recenzentu prof. dr. Janezu Salobirju in predsednici komisije prof. dr. Antoniji Holcman za strokoven pregled naloge in nasvete,
- tehničnim sodelavcem Anici Mušič, Nadi Novljan, Marku Kodri in ostalim, za pomoč med izvajanjem poskusa in pomoč pri laboratorijskem delu,
- vsem zaposlenim na Katedri za prehrano, Oddelka za zootehniko, da so me sprejeli in z mano delili praktično znanje,
- go. Jerneji Bogataj in vsem zaposlenim v knjižnici za pregled naloge, nasvete in pomoč pri navajanju virov,
- go. Sabini Knehtl, ki je poskrbela za vso potrebno dokumentacijo in za njene prijazne besede s katerimi me je opogumljala,
- svoji družini, mami Milici, očetu Francu in sestri Mateji, ki so mi študij omogočili, me v času študija podpirali in mi pomagali,
- svojemu življenjskemu sopotniku Andražu za vso podporo, nasvete, potrpežljivost in močno voljo ter prepričanje, da zmorem.