

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Karmen LUPŠINA

**VPLIV OLJČNIH LISTOV IN PULPE NA
ANTIOKSIDATIVNI STATUS KOKOŠI IN
OKSIDATIVNO STABILNOST JAJC**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Karmen LUPŠINA

**VPLIV OLJČNIH LISTOV IN PULPE NA ANTIOKSIDATIVNI
STATUS KOKOŠI IN OKSIDATIVNO STABILNOST JAJC**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**THE INFLUENCE OF OLIVE LEAVES AND PULP ON
ANTIOXIDATIVE STATUS OF LAYING HENS AND OXIDATIVE
STABILITY OF EGGS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2013

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 somentorja prof. dr. Janeza Salobirja.

Recenzent: doc. dr. Dušan Terčič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan ŠTUHEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

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

Recenzent: doc. dr. Dušan TERČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Karmen Lupšina

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 636.5.084/.087(043.2)=163.6
KG	perutnina/kokoši/nesnice/antioksidativni status/prehrana živali/oljčni listi/oljna pulpa/jajca/oksidativna stabilnost
AV	LUPŠINA, Karmen
SA	REZAR, Vida (mentorica)/SALOBIR, Janez (somentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2013
IN	VPLIV OLJČNIH LISTOV IN PULPE NA ANTIOKSIDATIVNI STATUS KOKOŠI IN OKSIDATIVNO STABILNOST JAJC
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	VIII, 47 str., 9 pregl., 4 sl., 90 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Narejenih je bilo že veliko raziskav, v katerih so znanstveniki preučevali vpliv dodatkov oljk in njihovih stranskih proizvodov ter vitamina E na zdravje ljudi, živali in zaščito njihovih proizvodov. V naši raziskavi nas je zanimalo ali dodatki oljčnih listov, pulpe in ekstrakta iz njih vplivajo na proizvodne lastnosti kokoši nesnic, na antioksidativni status kokoši in na fizikalne lastnosti jajc ter njihovo oksidativno stabilnost. Živali smo izpostavili oksidacijskemu stresu, katerega smo spodbudili z dodatkom 6 % lanenega olja v krmo in s spremembo temperature v času poskusa. V raziskavo smo vključili 94 kokoši nesnic, starih 40 tednov, katere smo individualno vhranili. Razdelili smo jih v 6 skupin, vsaka skupina je dnevno dobila svojo krmo. Krma za posamezno skupino je bila sestavljena iz osnovne krme, kateri so bili dodani različni dodatki: skupini Kont ni bilo dodano ničesar, Vit E je imela dodatek 150 IU/kg krme vitamina E, skupina Olive L 1 % posušenih in zmletih oljčnih listov, Olive Ex ekstrakt iz oljčnih listov, skupina Pulpa dodatek 1 % posušene in zmlete pulpe in skupina Pulpa Ex ekstrakt iz pulpe. Celotno poskusno obdobje je trajalo 4 tedne. V tem času smo beležili nesnost, zauživanje krme, telesno maso živali na začetku in na koncu poskusa ter vsakodnevno zbirali in tehtali jajca za potrebe analiz. Vpliv dodatkov na zdravje živali smo ovrednotili s kometnim testom in merjenjem koncentracije malondialdehida v krvni plazmi. Izmerili smo fizikalne lastnosti jajc, določili koncentracijo malondialdehida v rumenjaku ter maščobno-kislinsko sestavo. Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da dodatki vitamina E, oljčnih listov, pulpe in ekstraktov iz njih niso imeli vpliva na proizvodne lastnosti kokoši, prav tako niso vplivali na antioksidativni status kokoši. Pri fizikalnih lastnostih smo ugotovili statistično značilne razlike v barvi jajčne lupine in pri maksimalni sili potrebni, da se jajce stre. Dodatki niso imeli vpliva na oksidativno stabilnost svežih in 28 dni starih jajc, prav tako niso vplivali na maščobno-kislinsko sestavo rumenjakov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 636.5.084/.087(043.3)=163.6

CX poultry/layling hens/antioxidative status/animal nutrition/olive leaves/olive pulp/eggs/oxidative stability

AU LUPŠINA, Karmen

AA REZAR, Vida (supervisor)/SALOBIR, Janez (co-supervisor)

PP SI-1230 Domžale, Groblje 3

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science

PY 2013

TY THE INFLUENCE OF OLIVE LEAVES AND PULP ON ANTIOXIDATIVE STATUS OF LAYING HENS AND OXIDATIVE STABILITY OF EGGS

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO VIII, 47 p., 9 tab., 4 fig., 90 ref.

LA sl

Al sl/en

AB A lot of research has been made in which scientists have studied the impact of olives, their by-products and vitamin E on human and animal health and protection of their products. In our study we were interested in finding out whether the additives of olive leaves, pulp and their extract affect the performance of laying hens, their antioxidant status, physical characteristics of the eggs and their oxidative stability. The animals were exposed to oxidative stress, which we challenged with the addition of 6 % linseed oil in the feed and by changing the temperature during the experiment. The study included 94 laying hens, 40 weeks old, which were individually caged. Animals were divided into 6 groups, each group received its daily feed. The feed for each group was composed of a basic feed, with different supplements: group Kont received no supplement, Vit E had a vitamin E supplement of 150 IU / kg of feed, Olive L had 1% of dried and ground olive leaves, Olive Ex received extract from olive leaves, the Pulpa group had 1% of dried and ground pulp and Pulpa Ex had an extract from pulp. Experimental period lasted for 4 weeks, during that time we recorded laying performance, feed intake, weight of animals at the beginning and at the end of the experiment and daily collected and weighed the eggs for the purpose of analysis. The influence of supplements on animal health was evaluated by comet assay and by measuring the concentration of malondialdehyde in blood plasma. We measured the physical characteristics of the eggs, concentration of malondialdehyde in the yolk and fatty acid composition. Based on the results we found that supplementation of vitamin E, olive leaves, pulp and their extracts, had no effect on the performance of hens and did not affect the antioxidant status of the hens as well. Statistically significant differences were found in the color and breaking strength of the egg shell. We also found out that additives had no effect on the oxidative stability of fresh eggs and eggs stored for 28 days nor did they affect the fatty acid composition of the yolks.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OKSIDACIJSKI STRES	3
2.1.1 Malondialdehid (MDA).....	4
2.1.2 Poškodbe DNK - kometni test.....	4
2.2 TOPLOTNI STRES.....	5
2.3 ANTIOKSIDANTI.....	6
2.4 OLJKE IN STRANSKI PROIZVODI OLJKARSTVA KOT VIR NARAVNIH ANTIOKSIDANTOV	8
2.4.1 Oljčno olje	9
2.4.2 Ekstrakt oljčnih listov	9
2.4.3 Oleuropein.....	10
2.4.4 Oljke in njihovi proizvodi v prehrani ljudi in živali	10
2.5 OBOGATENO JAJCE KOT VIT ANTIOKSIDANTOV IN DRUGIH UČINKOVIN ZA PORABNIKA	12
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 MATERIAL	14
3.1.1 Zasnova poskusa.....	14
3.1.2 Sestava in hranilna vrednost krme	14
3.1.3 Priprava dodatkov.....	15
3.1.4 Izvedba poskusa.....	17
3.1.5 Zbiranje jajc in priprava vzorcev za analize	17
3.1.6 Odvzem vzorcev krvi.....	18
3.2 ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE FIZIKALNIH LASTNOSTI JAJC	18
3.2.1 Oblika jajca.....	18
3.2.2 Masa jajca	18

3.2.3	pH rumenjaka in beljaka	19
3.2.4	Barva lupine	19
3.2.5	Višina gostega beljaka	19
3.2.6	Haughove enote.....	19
3.2.7	Barva rumenjaka.....	19
3.2.8	Krvne in mesne pege	19
3.2.9	Trdnost lupine.....	20
3.2.10	Debelina lupine	20
3.2.11	Masa suhe lupine	20
3.3	ANALITSKA METODA ZA DOLOČANJE MAŠČOBNIH KISLIN	20
3.4	ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE MALONDIALDEHIDA.....	21
3.4.1	Določanje malondialdehida v jajcih.....	21
3.4.2	Določanje malondialdehida v krvni plazmi.....	21
3.5	KOMETNI TEST – DOLOČANJE POŠKODB DNK LIMFOCITOV.....	22
3.5.1	Izolacija limfocitov	22
3.5.2	Postopek kometnega testa	23
3.6	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	24
4	REZULTATI.....	26
4.1	PROIZVODNE LASTNOSTI KOKOŠI.....	26
4.2	REZULTATI MDA IN POŠKODB DNK (KOMETNI TEST).....	27
4.3	FIZIKALNE LASTNOSTI JAJC.....	28
4.4	OKSIDATIVNA STABILNOST JAJC	30
4.5	MAŠČOBNO-KISLINSKA SESTAVA RUMENJAKOV	31
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	33
5.1	RAZPRAVA.....	33
5.2	SKLEPI.....	40
6	POVZETEK.....	41
	ZAHVALA.....	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava osnovne krmne mešanice za kokoši nesnice	14
Preglednica 2: Sestava premiksa za skupino Kont in skupino Vit E (mg/kg krme).....	15
Preglednica 3: Analiza sestave krmne mešanice za kokoši nesnice	16
Preglednica 4: Maščobno-kislinska sestava krmnih mešanic (g MK/100 g vsote MK).....	16
Preglednica 5: Rezultati proizvodnih lastnosti kokoši (LSM ± standardna napaka).....	26
Preglednica 6: Rezultati analiz MDA in poškodb DNA levkocitov (LSM ± standardna napaka).....	27
Preglednica 7: Rezultati fizikalnih lastnosti jajc (LSM ± standardna napaka).....	28
Preglednica 8: Oksidacijska stabilnost jajc (MDA v nmol/g SS) (LSM ± standardna napaka).....	30
Preglednica 9: Ocenjena srednja vrednost in standardna napaka MK sestave rumenjakov svežih (zgornja vrstica) in 28 dni starih jajc (spodnja vrstica) v g MK/100g vsote MK.....	31

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Poškodovana jedrna DNK (Universität Würzburg, 2013)	4
Slika 2: Oljka (<i>Olea europea</i>) (Jardiland Création & Récréation, 2013).....	9
Slika 3: Oleuropein.....	10
Slika 4: Sistem osvetlitve	17

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BHA	- butilhidroksi anizol
BHT	- butilhidroksitoluen
DHA	- dokozaheksaenojska kislina
DMSO	- dimetilsulfoksid
DNK	- deoksiribonukleinska kislina
EDTA	- etilendiamintetraocetna kislina
ENMK	- enkrat nenasičene maščobne kisline
EOL	- ekstrakt oljčnih listov
EPA	- eikozapentaenojska kislina
GSH	- glutation
HDL	- high density lipoproteins (lipoproteini visoke gostote)
HPLC	- visokotlačna tekočinska kromatografija
HU	- Haughove enote
IO	- indeks oblike
LC VNMK	- dolgoverižne večkrat nenasičene maščobne kisline
LC n-3	- dolgoverižne omega 3 maščobne kisline
LC n-6	- dolgoverižne omega 6 maščobne kisline
LDL	- low density lipoproteins (lipoproteini nizke gostote)
LMP	- low melting point agarose (agaroza s tališčem pri nizki temperaturi)
MDA	- malondialdehid
MK	- maščobne kisline
MQ	- Milli Q voda
n-3 VNMK	- omega 3 maščobne kisline
n-6 VNMK	- omega 6 maščobne kisline
n-6/n-3	- razmerje med omega 6 in omega 3 maščobnimi kislinami
NADPH	- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMP	- normal melting point agarose (agaroza s tališčem pri običajni temperaturi)
OTM	- Olive tail moment (repni moment po Olivu)
PBS	- kalij-natrijev fosfatni pufer
NMK	- nasičene maščobne kisline
SOD	- superoksid dismutaza
TBA	- tiobarbiturna kislina
TCA	- triklorocetna kislina
TEP	- 1,1,3,3-tetraetoksipropan
VNMK	- večkrat nenasičene maščobne kisline

1 UVOD

V organizmu nastajajo različne snovi, ki jih organizem lahko proizvaja sam ali pa je njihovo nastajanje posledica delovanja različnih vplivov iz okolja. Ene izmed njih so tudi prosti radikali. Ti lahko povzročijo različne poškodbe celičnih membran, encimov in nukleinskih kislin. Pri daljšem delovanju prostih radikalov lahko pride do hitrejšega staranja, nastanka bolezni srca in ožilja, razvitja različnih vrst raka, diabetesa, Alzheimerjeve bolezni in drugih. Prav zaradi njihovega negativnega vpliva so organizmi razvili različne mehanizme, s katerimi se lahko zaščitijo pred oksidativnimi poškodbami in jih uspešno popravljajo. Vsi ti mehanizmi skupaj tvorijo tako imenovani antioksidativni sistem. Antioksidanti so lahko naravne ali sintetične snovi, ki že v majhni koncentraciji preprečijo ali zavrejo negativne oksidacijske procese in s tem poskrbijo, da ne pride do kakršnihkoli poškodb v bioloških sistemih (Salobir, 2000).

Frankič in Salobir (2007) navajata, da prosti radikali sami po sebi niso nevarne snovi, dokler ne pride do porušanja ravnovesja med njimi in antioksidanti. Kadar se ravnovesje nagiba v prid prostih radikalov, pride do oksidacijskega stresa, povečanega nastanka radikalov in poškodb v organizmu. Če pa je ravnovesje izenačeno ali v prid antioksidantov, potem antioksidanti poskrbijo za pretvarjanje prostih radikalov v stabilne spojine ali pa preprečijo njihov nastanek in tako ščitijo organizem.

Na ravnotežje med antioksidanti in prostimi radikali ne vplivajo samo mehanizmi znotraj organizma, ampak lahko na njih vplivamo tudi z zunanjimi vplivi. Eden izmed teh je vpliv prehrane. Tako lahko s prevelikim vnosom večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) povzročimo nastanek oksidacijskega stresa, ta pa vodi do lipidne peroksidacije. Na lipidno peroksidacijo lahko vplivajo tudi drugi, zunanji dejavniki. Pri tem pride do razcepa maščob v proste radikale, ki se povežejo s kisikom in nastanejo peroksidni radikali. Ti se naprej povežejo z novo maščobno kislino in ta reakcija vodi v nastanek hidroperoksida in prostih radikalov. Reakcija se nadaljuje in pri tem se še več maščob pretvori v hidroperoksidi, ki so primarni produkti lipidne peroksidacije. Ko se njihova koncentracija močno poveča, ti začnejo razpadati in vstopati v vrsto drugih reakcij pri čemer nastane še več prostih radikalov in stabilnih spojin, ki jih imenujemo sekundarni produkti (aldehidi, ketoni, alkoholi, itd.) in imajo negativen vpliv na organizem (Travnikar, 2009). Zato je potrebno v takšnem primeru organizmu omogočiti zaščito in to najlažje dosežemo z dodajanjem hranil, ki vsebujejo antioksidante.

Vir antioksidantov predstavljajo tudi oljke in njihovi proizvodi, pretežno so to fenolne spojine med katerimi je najbolj pomemben oleuropein. Prav zaradi vsebnosti teh snovi se še danes opravlja veliko raziskav, s katerimi znanstveniki poskušajo ugotoviti, kakšen vpliv imajo oljke na organizem. Do sedaj je znano, da naj bi zaradi svojega antioksidativnega delovanja ščitile pred nastankom raka, diabetesa, bolezni srca in ožilja (kar je povezano predvsem z zmanjševanjem koncentracije slabega holesterola v krvi), zniževale krvni tlak, krepile imunski sistem (pomembno predvsem pri ljudeh, ki so HIV pozitivni), pripomogle naj bi tudi pri zmanjšanju debelosti, preprečile prehitro staranje kože in pomagale pri degenerativnih boleznih kot so demenca, Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen (Therios, 2009).

Narejenih je bilo mnogo raziskav v katerih so znanstveniki preučevali kako vplivajo oljke in njihovi proizvodi na ljudi in živali. V eni izmed teh so preučevali vpliv oljčnih listov in dodatkov α -tokoferil acetata na meso prsne mišice pri puranih (Botsoglou in sod., 2010). V puranem mesu so dodatki v času shranjevanja v zamrzovalniku zmanjšali stopnjo lipidne oksidacije v prsni mišici, kljub temu pa je bilo to zmanjšanje nekoliko manjše kot pri dodatku 300 mg/kg α -tokoferil acetata v krmo.

Dve leti kasneje so Botsoglou in sod. (2012) poskušali ugotoviti, kako isti dodatki kot v raziskavi leta 2010 (puranje meso) vplivajo na lipidno oksidacijo jajc, ki so obogatena z omega 3 maščobnimi kislinami. Pri tem so ugotovili, da dodatki α -tokoferil acetata in oljčnih listov niso imeli pomembnega vpliva na maščobno-kislinsko sestavo in vsebnost MDA v svežih jajcih, kljub temu pa so vplivali na zmanjšanje koncentracije lipidnih hidroperoksidov.

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti ali:

- dodatki oljčnih listov in pulpe ter njunih ekstraktov v krmo vplivajo na proizvodne lastnosti kokoši nesnic,
- dodatki oljčnih listov in pulpe ter njunih ekstraktov vplivajo na antioksidativni status kokoši in tako varujejo njihovo zdravje,
- ali dodatki oljčnih listov in pulpe ter njunih ekstraktov vplivajo na fizikalne lastnosti jajc in na njihovo oksidativno stabilnost.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDACIJSKI STRES

Oksidacijski stres je posledica porušenega ravnovesja med prostimi radikali in antioksidanti, pri čemer se neravnovesje nagiba v korist oksidantov. Prosti radikali so zelo nestabilne in hitro reaktivne oblike atomov, molekul ali ionov, ki imajo vsaj enega ali več neparnih elektronov. V določeni meri organizem sam proizvaja proste radikale, saj se s tem ščiti pred nekaterimi mikroorganizmi, pomembni pa so tudi pri celičnem signaliziranju in v regulaciji apoptoze (Frankič in Salobir, 2007).

Na povečano nastajanje prostih radikalov in s tem na nastanek oksidacijskega stresa lahko vplivajo tudi drugi dejavniki, kot so kajenje in cigaretni dim, aktivni izbruhi iz aktiviranih makrofagov (Block in sod., 2002), sevanje (X, UV, ultrazvočno, mikrovalovno) (Sies, 1997), izpostavljenost težkim kovinam (Flora in sod, 2008), prekomerno uživanje alkoholnih pijač, raznih zdravil, izpostavljenost onesnaženemu zraku, toksinom, različnim stresnim dejavnikom ali mrazu (Kelly, 2003), preveliko uživanje hrane, ki vsebuje veliko količino VNMK. Najpogostejše tarče prostih radikalov so nukleinske kisline, lipidi in beljakovine (Block in sod., 2002), pri čemer lahko pride do napak, slabšega delovanja organov in sistemov ter številnih bolezenskih stanj.

Pri ljudeh se vpliv prostih radikalov kaže v povečanju dejavnikov tveganja in razvoja različnih bolezni in bolezenskih stanj. Za nekatere so znanstveniki že dokazali, da so posledica delovanja prostih radikalov, za druge pa to samo predvidevajo. Aruoma (1998) jih je navedel kar nekaj. Med njimi so bolezni živčevja (Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen), oči (sive mrene), srca in ožilja (ateroskleroza), ledvic (nefrotski sindrom), bolezni gastrointestinalnega trakta, različne vrste rakavih obolenj, bolezni pljuč in druge.

Vpliv oksidacijskega stresa se odraža tudi na živalih. Pri pitovnih piščancih so ugotovili slabši prirast, oksidacijski stres pa vpliva tudi na oksidativno stabilnost mesa. Slabša oksidativna stabilnost mesa lahko privede do žarkosti, kar vodi do poslabšanja kakovosti mesa. Takšno meso ima neprijeten vonj in okus, slabša je struktura, konsistenca in videz mesa, meso izgubi na hranilni vrednosti in je neprivlačno za porabnika (Fellenberg in Speisky, 2006). Zhang in sod. (2011) so v poskusu pitovne piščance krmili z oksidiranimi maščobami. Cilj njihovega poskusa je bil ugotoviti, kako takšna krma vpliva na kakovost mesa prsne mišice. Rezultati so pokazali, da ne glede na vrsto krme med skupinami ni bilo razlik v prirastu, zauživanju in izkoriščanju krme. Krmljenje z oksidiranimi maščobami pa je povzročilo oksidacijski stres pri piščancih, kar se je kazalo v povečani oksidaciji maščob in beljakovin tako v krvni plazmi kot v mesu prsne mišice. Meso je imelo po prvem dnevu shranjevanja tudi za 44 % večjo izcejo v primerjavi s kontrolno skupino, prav tako je imela skupina, ki je zauživala krmo z oksidiranimi maščobami slabšo zmožnost zadrževanja vode, ki so jo merili s centrifugiranjem pri veliki hitrosti. Izgube s kuhanjem se med skupinami niso razlikovale, prav tako se ni razlikovala barva mesa prsne mišice in pH, merjen 5 ur po zakolu.

Narejenih je bilo že veliko raziskav na temo zaščite ljudi, živali in njihovih produktov pred negativnimi posledicami oksidacijskega stresa. Najlažja in najbolj učinkovita metoda je

zadostno uživanje antioksidantov, ki so že prisotni v hrani oziroma krmi ali pa jih vanjo dodamo. Najpogosteje se poslužujemo vitamina C in E, β – karotena, flavonoidov (Frei, 2004), ki jih Fellenberg in Speisky (2006) opredeljujeta kot naravne antioksidante, pridobljene iz različnih delov rastlin (listov, lubja, semen ali sadežev) in so z vidika zdrave prehrane bolj zaželeni kot sintetični antioksidanti.

2.1.1 Malondialdehid (MDA)

Kadar pride do lipidne peroksidacije ali do lipidne avtooksidacije, pri tem iz večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK), še posebej tistih, ki imajo več kot dve dvojni vezi, nastanejo različni produkti. Eden izmed sekundarnih produktov je tudi malondialdehid (MDA) (1,3 – propanenol).

Strukturna formula MDA:

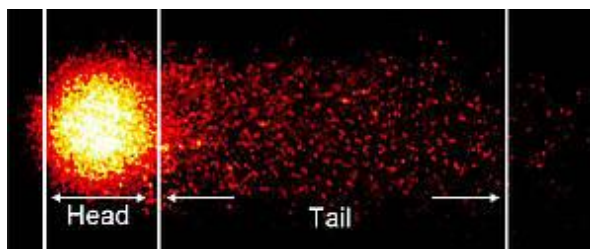


MDA je zelo reaktivna spojina, za katero so številne novejšje raziskave pokazale, da je citotoksičen, mutagen, karcinogen ter povzroča številne bolezni in starostne spremembe. Navzkrižno lahko reagira z beljakovinami, lipidi, inaktivira nekatere encime, se kovalentno veže z nukleinskimi kislinami. Prav zaradi vseh teh lastnosti malondialdehid v organizmih ni zaželen. V tkivih sesalcev sta glavna prekurzorja za nastanek MDA arahidonska in dokozaheksaenojska kislina. Najpogostejši vir za njegov nastanek predstavlja zauživanje nenasičene linolenske kisline, ki oksidira 10-15 – krat hitreje kot oleinska kislina (Ješe Janežič, 2001).

Možnosti za nastanek MDA lahko bistveno zmanjšamo, če zmanjšamo vpliv oziroma se izogibamo dejavnikom, ki povzročajo oksidacijski stres in s tem posledično lipidno peroksidacijo. Prav tako lahko organizem zaščitimo z zadostnim zauživanjem živil, ki vsebujejo antioksidante.

2.1.2 Poškodbe DNK - kometni test

Kometnemu testu drugače rečemo tudi elektroforeza posameznih celic ali angleško SCGE (single cell gel electrophoresis), kar pomeni, da ovrednotimo poškodbe DNK v posameznih celicah. Kometni test je metoda, ki je v primerjavi z ostalimi klasičnimi metodami za odkrivanje napak na DNK direktna, zelo natančna, občutljiva ter hitra in je zato uporabna tako v diagnostične, kot tudi eksperimentalne namene (Lah in sod., 2005). Ime metode izvira iz njenih rezultatov, pri čemer pri poškodovani DNK opazimo jedro, ki ima za sabo sled (rep) fragmentov DNK in zaradi tega spominja na komet.



Slika 1: Poškodovana jedrna DNK (Universität Würzburg, 2013)

Test lahko uporabimo za odkrivanje različnih poškodb DNK. Najpogosteje gre za enojne ali dvojne prelome vijačnice, navzkrižne povezave, alkalno labilna mesta (ta se kažejo kot enojni prelomi) ali pa za enojne prelome vijačnice, ki so lahko posledica nedokončanega popravljanja napake na DNK (Hartman in sod., 2003). Uporablja se lahko tudi na drugih področjih, kot je na primer biomonitoring, toksikološke študije, v farmacevtski industriji, medicinskih raziskavah, na kmetijskem in kemičnem raziskovalnem področju (Marinšek Logar in sod., 2006).

2.2 TOPLOTNI STRES

Na oksidacijski stres vplivajo različni zunanji dejavniki. Eden pomembnih okoljskih dejavnikov je visoka temperatura, ki pri živalih izzove toplotni oziroma vročinski stres. Toplotni stres je rezultat delovanja več komponent, med katerimi ima najpomembnejšo vlogo temperatura okolja, pri tem pa ne smemo zanemariti relativne zračne vlage, toplotnega sevanja in hitrosti gibanja zraka. S problemom toplotnega stresa so obremenjene predvsem živali, katerih reja poteka v okolju s toplejšim podnebjem. Težave bi lahko odpravili z ohlajanjem prostorov, vendar je ta ukrep iz ekonomskega vidika manj uporaben in se rejci pogosteje odločajo za spremembe in prilagoditve v prehrani (Sahin in sod., 2003).

Optimalna temperatura za kokoši nesnice naj bi po navedbah Lin in sod. (2006) znašala od 19 do 22° C, za pitovne piščance pa od 18 do 22° C. Dagher (2009) v raziskavi navajajo, da pitovni piščanci dosegajo najhitrejšo rast v temperaturnem območju od 10 do 22° C, medtem, ko najboljše izkoriščajo krmo pri temperaturi 27° C. Prekoračitev zgornje kritične temperature povzroči toplotni stres. Zaradi tega pride pri perutnini do povečanega izločanja kortikosterona in kateholaminov, sproži se lipidna peroksidacija v celičnih membranah (Sahin in sod., 2003), poveča se tvorba produktov oksidacije maščobnih kislin v telesu in zmanjša koncentracija vitamina E in C v plazmi (Lin in sod., 2006).

Vpliv toplotnega stresa se pri kokoših nesnicah odraža predvsem v zmanjšanju telesne mase, kar je posledica manjšega zauživanja krme, prav tako pa ima negativen vpliv na prirejo jajc, predvsem na njihovo maso, maso in debelino jajčne lupine in specifično maso (Mashaly in sod. 2004). Pri pitovnih piščancih so opazili slabši praprast in slabšo kakovost mesa. Poleg vpliva na proizvodne lastnosti toplotni stres vpliva tudi na povečan odstotek pogina v jatah, kar je posledica zmanjšane imunske odpornosti živali (Ciftci in sod. 2005).

Zaradi vseh negativnih vplivov toplotnega stresa na živali, so se številni znanstveniki odločili preučiti, kako različni dodatki predvsem vitamina A, C in E vplivajo na zmanjšanje toplotnega stresa. Visoka temperatura vpliva na slabšo imunsko odzivnost živali in povečan pogin, kar je posledica zmanjšane sinteze T in B limfocitov, poleg tega pa toplotni stres zavira tudi fagocitno aktivnost krvnih levkocitov (Mashaly in sod., 2004). Zato lahko že dodatek 8000 IU/kg krme vitamina A pozitivno vpliva na zmanjšanje negativnega vpliva toplotnega stresa in na povečanje imunske odpornosti (Lin in sod., 2002).

Po navedbah Lin in sod. (2006) dodatek askorbinske kisline v krmo zavira stres, kar se kaže v zmanjšanju kortikosterona v plazmi (Mckee in Harrison, 1995), prav tako zmanjša

koncentracijo oziroma zavira sintezo adenokortikotropnega hormona (Sahin in sod., 2003), ter povečujejo koncentracijo inzulina, trijodtironina (T_3) in tiroksina (T_4) (Sahin in sod., 2002). Zaradi tega se izboljša prireja jajc (Njoku in Nwazota, 1989), kakovost jajc in trdnost jajčne lupine saj vitamin C skupaj z aktivno obliko vitamina D skrbi za mobilizacijo kalcija iz kosti. David Peebles in Brake (1985) sta ugotovila, da dodajanje askorbinske kisline v krmo pozitivno vpliva na zmanjšanje pogina pitovnih piščancev. Podobno so ugotovili tudi Ciftci in sod. (2005). V poskusu so dodali 200 mg L-askorbinske kisline/kg krme. V primerjavi s kontrolo skupino se je statistično značilno zmanjšal pogin iz 6,25 % na 4,06 %. Dokazali so tudi, da sinergistično delovanje vitamina C in E pozitivno vpliva na povečanje telesne mase živali, na zmanjšanje pogina, na boljše izkoriščanje krme (g krme/g jajca), povečanje prireje jajc in večjo maso jajc. Podobno so pri japonskih prepelicah ugotovili tudi Sahin in sod. (2003). V skupini z dodatkom 250 mg/kg vitamina C in 250 mg/kg vitamina E v krmo so zabeležili najboljše proizvodne rezultate. Tudi dodatek vitamina E ima pozitiven vpliv na zmanjšanje toplotnega stresa. S povečevanjem količine vitamina E v krmi se povečuje njegova koncentracija v serumu in jetrih, ter se zmanjšuje koncentracija MDA, ki je pokazatelj oksidacijskega stresa (Sahin in sod., 2001).

Na zmanjšanje posledic toplotnega stresa ne vplivajo samo dodatki vitaminov v krmo, ampak tudi dodajanje vitaminov v pitno vodo. To so v raziskavi v toplem podnebj (Kambodži) dokazali Vathana in sod. (2002), ki so trem skupinam pitovnih piščancev v vodo dodajali različno količino vitamina C (0, 20 in 40 mg/žival/dan). Pri tem so ugotovili, da so imeli piščanci z največjim dodatkom vitamina večji dnevni prirast in manjši pogin.

2.3 ANTIOKSIDANTI

Zaradi izpostavljenosti prostim radikalom in njihovim negativnim vplivom so organizmi razvili vrsto obrambnih mehanizmov, s katerimi se lahko zavarujejo pred njimi. Med njih štejemo preventivne mehanizme, mehanizme, ki zagotavljajo popravilo, fizično obrambo in antioksidativno obrambo (Valko in sod., 2007). Antioksidanti so molekule, ki reagirajo s prostimi radikali in donirajo vodikov atom, s tem pa povzročijo stabilizacijo radikalov. Takšni radikali težje vstopajo v verižne reakcije zaradi česar se reakcija ustavi (Fellenberg in Speisky, 2006).

Dodajanje antioksidantov krmo ni pomembno samo zaradi pretvorbe prostih radikalov v stabilne spojine, oziroma za preprečitev njihovega nastanka, pač pa tudi za zaščito živalskih proizvodov pred oksidacijo, ohranitev njihove prehranske vrednosti in okusnosti, poleg tega pa živila s povečano vsebnostjo antioksidantov predstavljajo tudi dober vir le-teh za porabnika.

Antioksidante lahko delimo na več načinov. Prva delitev je na endogene in eksogene (Frankič in Salobir, 2007). Endogeni so tisti, ki jih lahko organizem proizvede sam, eksogene pa dobi preko zauživanja krme. Meja med obema skupinama je težje določljiva, saj mora organizem nekatere esencialne snovi (npr. selen) za izgradnjo endogenih antioksidantov dobiti s hrano.

Med prehranske oziroma eksogene antioksidante štejemo:

- askorbat (vitamin C),
- vitamin A in karotenoide (likopen, lutein, β -karoten in drugi),
- vitamin E (tokoferoli in tokotrienoli),
- Se in druge elemente potrebne za delovanje antioksidativnih encimov,
- fitokemijske spojine (flavonoidi, polifenoli),
- prehranske in druge dodatke (CoQ₁₀, glutation, lipoična kislina),
- prehranske antioksidante (BHA, BHT, propil galat, terciarni butil hidroksi kinon, rožmarinov ekstrakt in drugi).

Endogene komponente antioksidativnega sistema so:

- sečna kislina,
- lipoična kislina,
- hormoni (melatonin, estrogen in drugi),
- Mn, Cu, Zn-superoksid dismutaza (SOD),
- Fe-katalaza,
- NADPH,
- glutation (GSH), SE-glutation peroksidaza,
- ubikvinol-10 (reducirani koencim Q₁₀),
- beljakovine, ki vežejo kovine, vključno albumin (in nanje vezani tioli in bilirubin), beljakovine, ki vežejo Fe in Cu (transferin in celurop plazmin).

Drugi način delitve je na naravne in sintetične. Sintetični se zaradi svoje učinkovitosti in majhne cene najpogosteje uporabljajo kot konzervansi. Med njih štejemo predvsem tiste, ki izhajajo iz fenolne strukture: butilhidroksianizol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT), dodecil, propil galat, butilhidroksikinon (TBHQ) in oktil galat. Na drugi strani pa so naravni antioksidanti, ki se jih pridobiva predvsem iz različnih delov rastlin, kot so lubje, listi, plodovi in semena. Med njih štejemo vitamin C in vitamin E ter ostale molekule, ki imajo antioksidativne lastnosti: karoteni, (β -karoten, likopen, lutein, asta-, zeaxantin in canthaxantin) flavonoidi (katehini, epigalokatehini, kvercetin, rutin, morin) ter drugi ne flavonoidni fenoli (rosmanol) (Fellenberg in Speisky, 2006).

Najpogosteje v krmo dodajajo sintetično obliko vitamina E (all-rac-tokoferol) ali pa semi-sintetično obliko (α -tokoferil acetat), ki pa sta po svoji učinkovitosti slabša od naravne oblike α -tokoferola (Frankič in Salobir, 2007).

Naravne antioksidante najdemo tudi v nekaterih zeliščih in njihovih ekstraktih. Med takšna zelišča štejemo rožmarin, timijan, origano, zeleni čaj, ginko, kamilico, regrat in ognjič (Frankič in sod., 2008). Poleg teh pa Dimitrios (2006) navaja še različno sadje (jagode, češnje, grozdje, citrusi, jabolka, hruške, kivi), zelenjavo (jajčevci, artičoke, peteršilj, fižol, špinača), rdeče vino, kavo, čokolado, naravni pomarančni sok, ovseno, pšenično in rižovo moko.

Tako kot lahko ima oksidativni stres negativne posledice za organizem, imajo antioksidanti pri zaviranju le-tega pozitivne učinke. Pri ljudeh antioksidanti vplivajo na preprečevanje in zmanjševanje kompleksnih bolezni kot so ateroskleroza, kap, sladkorna bolezen, nevrodegenerativne bolezni kot so Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, različne vrste raka, revmatoidni artritis in druge (Devasagayam in sod., 2004).

Vplivi dodatkov vitamina C in E na živali so bili predmet raziskovanja mnogih raziskovalcev. Kirunda in sod. (2001) so v poskus vključili kokoši nesnice, katere so bile izpostavljene toplotnemu stresu in jim v krmo dodajali različno količino vitamina E (20, 60, 120 IU/kg krme). Že dodatek 60 IU vitamina E/kg krme vpliva na povečanje količine zaužite krme, povečano prirejo jajc, izboljšano trdnost vitelinske membrane, povečan delež trde snovi rumenjaka in beljaka, vpliva na obstojnost beljakove pene in prostornino belega angelskega kolača. Dodatek vitamina E ni statistično značilno vplival na maso jajca, zmogljivost emulzifikacije, barvo rumenjaka, indeks rumenjaka in njegovo viskoznost. Kljub dodatku vitamina E v krmo je njegova koncentracija v rumenjakih kokoši, ki so bile pod stresom, imela manjšo vrednost od rumenjakov kokoši iz kontrole skupine.

Ryu in sod. (2005) so poskusili ugotoviti, kakšen vpliv ima dodajanje različnih količin selena in α -tokoferola na lipidno oksidacijo in stabilnost barve mesa pri piščancih. Pri tem so ugotovili, da dodajanje selena ne vpliva na rast in maso piščancev, prav tako ni bilo vpliva na barvo mesa. Statistično značilne razlike so opazili pri obsegu lipidne oksidacije, kjer so imele živali, katerim je bil v krmo dodan selen, v primerjavi s kontrolo, nižjo koncentracijo malondialdehida v stegenski mišici in s tem boljšo oksidativno zaščito v času skladiščenja v hladilniku. Razlike so bile še posebej opazne pri kombiniranju 100 IU α -tokoferola/kg krme in 8 ppm selena. Podobno so ugotovili tudi v prsni mišici živali.

Antioksidanti niso pomembni samo v organizmu, ampak tudi zunaj njega. Potrebni so tudi za preprečevanje oksidativnega kvarjenja krme med samim skladiščenjem, zato jih pogosto dodajajo v krmo in krmne mešanice. Med skladiščenjem se najhitreje kvarijo maščobe, pri čemer nastajajo produkti, ki jih navadno ne srečamo v maščobah: peroksidi, aldehidi, kisline in drugi produkti, ki so za organizem toksični, poleg tega dajejo krmi neprijeten videz, okus in vonj.

2.4 OLJKE IN STRANSKI PROIZVODI OLJKARSTVA KOT VIR NARAVNIH ANTIOKSIDANTOV

Oljka (*Olea europaea*) je zimzeleno drevo, katerega že iz antičnih časov gojijo za potrebe pridobivanja oljčnega olja in namiznih oljk. Oljčna drevesa lahko zasledimo na vseh kontinentih, vendar se večina (97 %) nahaja v sredozemskem delu in sicer v Španiji, na Portugalskem, Grčiji, Italiji, Maroku, Tuniziji in Turčiji. Glavni proizvod oljčnih dreves so oljke, iz katerih pridelujemo oljčno olje, katerega kakovost je odvisna od talnih razmer, podnebja, nadmorske višine nasada dreves, časa in načina trgatve, obrezovanja dreves, gojenja in gnojenja (Doymaz in sod., 2004). Pri gojenju oljk in v industriji predelave oljk prihaja do proizvodnje velike količine stranskih proizvodov. V eni izmed raziskav so ugotovili, da na letni ravni z obrezovanjem enega drevesa proizvedejo do 25 kg odpada (vejice in listi), pri stiskanju in pridobivanju olja iz 100 kg oljk pa je približno 35 kg trdega odpada (oljčna pogača) in okoli 100 litrov odpadne vode. Vračanje takšne količine stranskih proizvodov nazaj v okolje bi lahko imelo negativne posledice, zato so se znanstveniki odločili poiskati alternativno rešitev – uporabiti stranske proizvode kot vir hranilnih snovi v prehrani živali (Molina Alcaide in Nefzaoui, 1996).



Slika 2: Oljka (*Olea europaea*) (Jardiland Création & Récréation, 2013)

2.4.1 Oljčno olje

Tako oljke kot oljčno olje sta pomemben sestavni del mediteranske prehrane. Že v stari Antiki so opazili pozitivne učinke oljčnega olja na zdravje in počutje ljudi, zato je pritegnil pozornost znanstvenikov, ki še danes preučujejo njegove učinke. Oljčno olje pozitivno vpliva na zmanjšanje bolezni srca in ožilja, preprečuje nekatere vrste raka, vpliva na imunski sistem in vnetne procese. Poleg tega je funkcionalno živilo, ki vsebuje velik delež enkrat nenasičenih MK, je vir polifenolov, flavonoidov, skvalena, β -karotenov in tokoferolov. Ekstra deviško oljčno olje je še posebej bogato z fenolnimi antioksidanti (Visioli in sod., 2002; Braun, 2005).

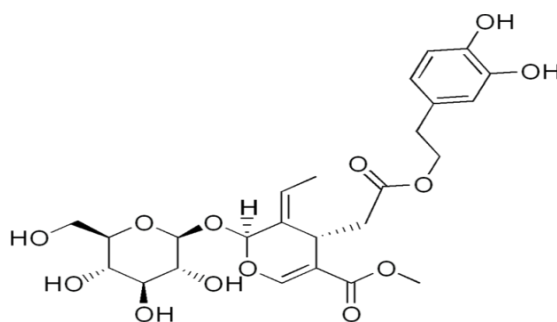
2.4.2 Ekstrakt oljčnih listov

Ekstrakt oljčnih listov (EOL) je naravni zeliščni ekstrakt, ki deluje protibakterijsko in protivirusno, je varen in ni toksičen za ljudi. Prvi ekstrakt so uporabljali že okoli leta 1800, s katerim so uspešno zdravili malarijo. Za večino pridelovalcev oljk oljčni ekstrakt predstavlja stranski proizvod. Vsebuje veliko elementov v sledovih kot so selen, železo, cink, krom, vitamin C, β -karotene in širok spekter aminokislin. Še bolj pomembni so zaradi velike vsebnosti fenolnih spojin, kot so oleuropein, hidroksitirozol, tirozol, rutin, luteolin, katehin in apigenin ter drugi. Za razliko od oljk in njihovih proizvodov, EOL ne vsebuje večje količine enkrat nenasičenih maščobnih kislin, oleinske kisline in skvalena, vendar pa ima kljub temu veliko sposobnost inaktivacije prostih radikalov. Rutin, katehin in luteolin imajo tudi do več kot 2,5 krat večji učinek kot vitamina C in E. Njihovo antioksidativno delovanje je večje tudi zaradi sinergije med fenoli, flavonoidi in veliko koncentracijo oleuropeina. Pri tem je pomembno omeniti, da vsi oljčni proizvodi vsebujejo fenolne spojine, pri čemer sta EOL (najbolj koncentrirani) in ekstra deviško oljčno olje najboljši vir le-teh (Braun, 2005).

2.4.3 Oleuropein

Glavni polifenol, ki prevladuje in sodeluje pri antioksidativni zaščiti je oleuropein, ki da oljkam značilni grenak in trpek priokus (zaradi česar oljke takoj po obiranju niso užitne) in je splošno poznan po svojem pozitivnem vplivu na organizem. Prvič sta ga iz oljk izolirala Bourquelot in Vintilesco, leta 1908. Od takrat je poznano, da ima oleuropein veliko sposobnost protibakterijskega, glivičnega in virusnega delovanja, kar se je že velikokrat izkazalo za koristno v primeru okužb z kvasovkami ali glivicami, virusom herpesa, pri kronični utrujenosti, alergijah, luskavici, poleg tega učinkovito deluje tudi kot naravni antibiotik v primeru gripe, prehlada ali okužbe zgornjih dihal in sinusov. Prav tako vpliva na zmanjševanje koncentracije krvnega sladkorja in tlaka, pomemben pa je tudi zaradi svoje antioksidativne sposobnosti saj v organizmu povečuje koncentracijo HDL in zavira oksidacijo LDL (Therios, 2009).

Vsebnost biofenolov in njihova sestava je zelo kompleksna in je odvisna tudi od sorte oljk, stopnje njihove zrelosti in načina predelave. Tako se s stopnjo zrelosti zmanjšuje delež oleuropeina v oljkah, povečujeta pa se delež tirosola in hidroksitirosola ter drugih derivatov oleuropeina, ki prevladujejo predvsem v dozorelih in črno obarvanih plodovih (Valenčič, 2010).



Slika 3: Oleuropein

2.4.4 Oljke in njihovi proizvodi v prehrani ljudi in živali

Prehrana lahko zelo pozitivno vpliva na zdravje in dobro počutje. To je predvsem opazno pri ljudeh, ki zauživajo tradicionalno sredozemsko hrano, v kateri so najpogostejše prisotni sadje, zelenjava, žita, stročnice, ribe, glaven vir maščob pa predstavlja oljčno olje. V manjši meri njihova prehrana vsebuje mleko in mlečne izdelke, poleg hrane pa zaužijejo tudi zmerno količino vina. Redko v njihovi prehrani zasledimo piščančje meso ali rdeče meso. S takšno prehrano v svoje telo vnašajo manjšo količino hranil, ki so za organizem nezaželena (nasičene maščobne kisline, trans-maščobne kisline, holesterol) in večjo količino hranil, ki so za zdravje koristna (vlaknina, ogljikovi hidrati, vitamini, minerali, enkrat nenasičene maščobne kisline), poleg tega pa takšna hrana vsebuje manj energije. Prav zaradi tega, raziskovalci priporočajo takšno vrsto prehrane, saj so ugotovili njen pozitiven vpliv na lajšanje in izboljšanje nekaterih bolezni kot so visok krvni tlak, sladkorna bolezen, debelost, bolezni srca in ožilja, ugotovili pa so tudi, da takšna prehrana igra vlogo pri preprečevanju nastanka nekaterih vrst raka (Wahrburg in sod. 2002).

Tako kot pri ljudeh so vpliv raziskali tudi pri živalih. Oljčno olje, ki so ga dodajali v krmo za japonske prepelice ni imelo vpliva na njihovo telesno maso, so pa živali imele večjo prirejo jajc kot ostale, jajca so bila težja, debelina lupine je bila nekoliko večja, prav tako je bila večja specifična masa jajc (Güclü in sod., 2008).

Nasprotno so ugotovili nekateri drugi raziskovalci. Oljčno olje sta v krmo dodajala tudi Balevi in Coskun (2000). Kljub dodatku ni bilo opaziti vpliva na proizvodne lastnosti in produktivnost kokoši nesnic. Do podobnih sklepov so prišli tudi Shafey in sod. (2003).

Rabayaa in sod. (2001) so raziskovali, kako različni odstotki dodatka oljčne pulpe vplivajo na telesno maso živali, zauživanje krme, prirast ter stroške prireje pri pitovnih piščancih. Pri tem so ugotovili, da dodatki niso vplivali na končno maso živali, razen pri skupini z največjim (10 %) dodatkom, kjer so bile živali najlažje. Manjša končna masa je bila najverjetneje posledica tudi manjšega zauživanja krme pri tej skupini, medtem ko se zauživanje pri ostalih skupinah ni razlikovalo. Podobno je bilo tudi pri prirastu. Kot vzrok za to raziskovalci navajajo, da pulpa vsebuje veliko vlaknine zaradi česar živali zaužijejo manj takšne krme, posledično s tem manj priraščajo in imajo manjšo telesno maso. Vpliv dodatka pulpe so pri kokoših nesnicah opazovali Zarei in sod. (2011), pri čemer so v krmo dodali 90 g pulpe/kg krme. Rezultati so pokazali, da dodatek skozi celotno poskusno obdobje ni imel statistično značilnega vpliva na prirejo jajc, na zauživanje krme, jajčno maso, nekoliko pa se je povečala masa jajc.

V prehrani živali ne uporabljamo samo oljčnega olja in pulpe, ampak se lahko poslužujemo tudi posušenih in zmletih oljčnih listov. Dodatek 10 g oljčnih listov/kg krme ni vplival na telesno maso in prirast puranov, je pa statistično značilno vplival na povečanje oksidativne zaščite prsne mišice (shranjene 12 dni pri 4° C), v primerjavi z ostalimi skupinami. Boljše rezultate so ugotovili samo še pri skupini z dodatkom 300 mg α – tokoferil acetata /kg krme (Govaris in sod., 2010).

Christaki in sod. (2011) so v krmo za japonske prepelice dodajali oljčne liste, janež in origano. Pri tem je dodatek oljčnih listov rahlo povečal prirejo jajc in lego barve rumenjaka na rdeče-zeleni osi v smeri rdeče barve (vrednost parametra a CIELAB sistema), ni pa vplival na zauživanje krme, pogin živali ter kakovost jajc (maso jajc, maso rumenjaka, odstotek beljaka, odstotek jajčne lupine).

O vplivu oljk, njihovih proizvodov in sestavin na zdravje in dobro počutje živali, predvsem ljudi, slišimo veliko. Zato se z njimi v raziskavah ukvarjajo številni znanstveniki in tudi Evropska agencija za varnost hrane (EFSA – European Food Safety Authority). Njihova naloga je predvsem ovrednotiti in podati znanstveno mnenje na podlagi prejetih podatkov raziskav. EFSA je v evropskem registru »Register on nutrition and health claims« potrdila, da zauživanje 5 mg hidroksitirosola in njegovih derivatov (oleuropein kompleksa in tirosola) na 20 g olivnega olja lahko pozitivno vpliva na zaščito krvnih lipidov pred oksidacijo. V tej objavi so tudi podali mnenje, da njihovo uživanje ne vpliva na uravnavanje krvnega tlaka pri ljudeh (EFSA, 2011).

2.5 OBOGATENO JAJCE KOT VIT ANTIOKSIDANTOV IN DRUGIH UČINKOVIN ZA PORABNIKA

Jajca so po prehransko-fiziološki vrednosti zelo kakovostno živilo in jih lahko obogatimo z dodajanjem različnih snovi v krmo za kokoši nesnice. V trgovini lahko med drugim kupimo jajca, ki so obogatena z omega 3 maščobnimi kislinami, to pa predvsem zato, ker v kontinentalni prehrani zaužijemo hrano, ki vsebuje dosti omega 6 MK premalo pa omega 3 MK. Z dnevnim zauživanjem enega ali dveh obogatenih jajc na dan lahko dobimo optimalno količino le-teh. Takšno zauživanje jajc seveda ni priporočljivo za osebe, ki imajo povišano raven holesterola v krvi. Če jajca obogatimo z maščobnimi kislinami, potem je smiselno, da jih obogatimo tudi z antioksidanti in s tem jajce zaščitimo oziroma povečamo njegovo oksidacijsko stabilnost in zmanjšamo možnosti za nastanek toksičnih produktov oksidacije maščob. Zato pogosto v krmo za nesnice dodajajo vitamin E. Vitamin E živali iz krme relativno dobro izkoriščajo in ga tudi hitro nalagajo v jajca, tako da njegova vsebnost v rumenjaku doseže svoj maksimum že v 14 dneh. Salobir in sod. (2000) navajajo, da se pri 18-kratnem povečanju koncentracije vitamina E v krmi, koncentracija le-tega v jajčnem rumenjaku poveča za 2,2-krat. Potrebe po vitaminu E se povečujejo, kadar je v prehrani veliko večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Kadar se zauživanje teh poveča za en gram je potrebno zaužiti 0,6 mg več vitamina E, da se zaščitimo pred peroksidacijo.

Vitamina E in C v različnih koncentracijah so v krmo za kokoši dodajali Franchini in sod. (2002), pri čemer so ugotovili, da je koncentracija vitamina E v rumenjaku odvisna od količine dodatka v krmo (100 ali 200 mg/kg krme), ter da je koncentracija vitamina E v rumenjaku za 5 do 8 mg/g rumenjaka večja, če zraven dodamo še 500 mg/kg vitamina C. Ugotovili so tudi, da je koncentracija vitamina E stabilna do 60. dneva shranjevanja, do 90. dneva je upadla za približno 40 % v vseh poskusnih skupinah.

Tako kot vitamin E se učinkovito v jajce nalaga tudi selen. Z dodatkom s selenom obogatenih kvasovk v krmo za nesnice bi lahko zneseno jajce vsebovalo okoli 30 µg selen in bi s tem pokrili 50 % priporočenega dnevnega vnosa (Surai in sod. 2003). Z dodajanjem različnih spojin bi lahko naredili jajca kot funkcionalno živilo, ki bi vsebovala vitamin E, selen, lutein in dokozaheksaenojsko kislino in bi z njim pokrili 50 % potreb po selenu (Surai in sod., 2003), 100 % potreb po dolgoverižnih n-3 VNMK, 150 % po vitaminu E in 1,91 mg luteina (Surai in Sparks, 2001).

Salobir in sod. (2000) so poskušal ugotoviti ali je možno s prehrano vplivati na povečanje koncentracije cinka v jajcu, saj je ta izrednega pomena in ga v hrani za ljudi pogosto primanjkuje. Kljub povečanju njegove koncentracije v krmi so ugotovili, da se njegova vsebnost v jajcu ne spreminja.

Jod je esencialna snov za ljudi in za živali. Potreben je predvsem za sintezo ščitničnih hormonov. Včasih je bila oskrba z njim zelo oslABLJENA, saj je bila njegova koncentracija v živilih odvisna od koncentracije v tleh, danes pa ga zaužijemo predvsem preko jodirane kuhinjske soli. Nekatere raziskave kažejo, da njegovo dodajanje v krmo pozitivno vpliva na njegovo koncentracijo v živalskih proizvodih kot so mleko, meso in jajca, kar so v raziskavi potrdili tudi Salobir in sod. (2000).

Bourre in Galea (2006) kokošim v krmi dala lutein, vitamin E, D3, B9, selen in jod. Rezultati so pokazali, da so bile snovi uspešno naložene v jajca, pri čemer je 100 g obogatenega jajca vsebovalo 6-krat več α -linolenske kisline, 3-krat več DHK, 3-krat več vitamina D, 6-krat več vitamina E, 6-krat več luteina in zeaksantina, 2,5-krat več joda in 4-krat več selena, kot navadno neobogateno jajce. Ker se delež omega 6 maščobnih kislin v času poskusa ni spreminjal, se je zaradi povečanja deleža omega 3 maščobnih kislin izboljšalo razmerje med njimi.

Poleg jajc so znanstveniki poskušali obogatiti tudi meso. Z dodatkom lanenega olja so izboljšali koncentracijo omega 3 maščobnih kislin v prsni (287mg n-3 PUFA/100 g tkiva) in stegenski mišici pri piščancih (537 mg n-3 PUFA/100 g tkiva). S tem bi lahko pokrili 70 % in 130 % potreb. Manj učinkovito je bogatenje z konjugirano linolno kislino. Z njenim dodatkom bi lahko pokrili le od 3,5 % (prsa) do 9 % (stegno) potreb. Veliko lažje je obogatiti meso z vitaminom E, pri čemer lahko pokrijemo 55 % potreb, kadar meso ni dodatno obogateno z omega 3 maščobnimi kislinami. V nasprotnem primeru se vitamin E porabi za zaščito mesa pred oksidacijo in lahko z njim pokrijemo manj kot 15 % potreb. Meso lahko prav tako kot jajca obogatimo s selenom. Z dodatkom 0,4 do 0,8 mg/kg krme lahko povečamo njegovo koncentracijo v mesu za 3,5-krat in s tem pokrijemo 60 % potreb. Bogatenje mesa ima lahko negativne posledice na senzorične lastnosti. Predvsem dodajanje maščobnih kislin, zaradi česar je meso bolj občutljivo na oksidacijo, dodatek ribjega olja pa vpliva tudi na sam vonj, kar pri porabnikih ni zaželeno (Grashorn, 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Zasnova poskusa

V poskus smo vključili 94 kokoši nesnic provenience Isa Brown, ki so ob vhlevitvi povprečno tehtale 2196 g in so bile stare okoli 40 tednov. Kokoši smo vhlevili individualno.

Živali so bile razdeljene v šest skupin. Vsaka skupina je bila krmljena z dnevno količino krme, ki jim je omogočila krmljenje po volji:

- skupina Kont (krma ni vsebovala dodatkov)
- skupina Vit E (krma je imela dodatek 150 IU/kg krme vitamin E)
- skupina Olive L (krma je imela dodatek 1 % posušenih, zmletih oljčnih listov)
- skupina Olive Ex (krma je imela dodatek ekstrakta iz oljčnih listov v količini 1 % mase krme)
- skupina Pulpa (krma je imela 1 % dodatek posušene, zmlete pulpe)
- skupina Pulpa Ex (krma je imela dodatek ekstrakta iz pulpe v količini 1 % mase krme)

3.1.2 Sestava in hranilna vrednost krme

Krmna mešanica, ki so jo živali zauživale je bila v vseh skupinah sestavljena iz enakih komponent, razlike so bile samo na račun dodatka pšeničnega škroba (preglednica 1), katerega količino smo ustrezno zmanjšali glede na količino dodatka listov, pulpe ali ekstraktov iz njih.

Preglednica 1: Sestava osnovne krmne mešanice za kokoši nesnice

	g/kg
Koruza, 8 % SB	250,00
Pšenica	252,53
Sončnične tropine, 37% SB	80,00
Sojine tropine, 45% SB	207,82
Laneno olje	60,00
Pšenični škrob	10,00
Monodikalcijev fosfat	15,05
Sol	3,90
Apnenec	56,80
Grobi kalcit	56,90
Lizin	0,10
Metionin	1,46
Barvilo Capsantal 30	0,43
Premiks	5,00

Premiks (preglednica 2) za poskusne krmne mešanice smo pripravili sami in sicer so skupine Kont, Olive L, Olive Ex, Pulpa in Pulpa Ex dobivale premiks Kont, medtem ko je skupina Vit E, dobila premiks Vit E. Premiks za Kont skupino in ostale skupine se je razlikoval od premiksa za skupino Vit E. Razlika je bila v količini vitamina E, saj so skupine Olive L, Olive Ex, Pulpa in Pulpa Ex imele dodatke oljčnih listov in pulpe, skupina Vit E pa je imela samo dodatek vitamina E.

Preglednica 2: Sestava premiksa za skupino Kont in skupino Vit E (mg/kg krme)

ELEMENT	ENOTE	Kont	Vit E
Mn	mg	70	70
Zn	mg	60	60
Fe	mg	60	60
I	mg	1	1
Cu	mg	8	8
Se	mg	0,25	0,25
Co	mg	0,15	0,15
A	IU	10000	10000
D3	IU	2500	2500
E	IU	10	150
K3	mg	3	3
Tiamin-B1	mg	2	2
Riboflav-B2	mg	5	5
Piridoks-B6	mg	5	5
B12	mg	0,015	0,015
Niacin, ni.ki, ni.amid.,B3,PP	mg	40	40
Pantot. ksl.-B5	mg	12	12
Folna ksl.-M	mg	0,75	0,75
Biotin – H	mg	0,05	0,05
Holin	mg	1400	1400

3.1.3 Priprava dodatkov

Kot dodatke smo dodali oljčne liste, oljčno pulpo ter ekstrakte iz njih. Dodatek oljčnih listov smo pripravili tako, da smo jih posušili in zmleli. Enako smo naredili tudi z oljčno pulpo, le da smo jo pred tem liofilizirali. Pri pripravi ekstraktov iz oljčnih listov smo te prav tako posušili in zmleli in jim dodali 70 % etanol za uporabo v prehrani. Tako pripravljene vzorce smo nato 4 dni stresali na stresalniku. Po končanem stresanju smo gosti del stisnili skozi gazo, tekoči ostanek pa smo dali v peščeno kopel in odpareli etanol do stopnje, da nam je ostala gosta tekočina. To tekočino smo nato do uporabe shranili na - 20° C. Enako smo naredili tudi pri pripravi ekstrakta iz oljčne pulpe. Tako pripravljene dodatke ekstraktov smo vmešali v laneno olje in nato dodali v krmo.

Vsebnost hranil v obroku smo določili z Weendsko analizo (preglednica 3).

Preglednica 3: Analiza sestave krmnih mešanic za kokoši nesnice

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

Kont – kontrolna krma, Vit E – krma z dodatkom 150 IU vit. E, Olive L – krma z dodatkom 1 % oljčnih listov, Olive Ex – krma z dodatkom ekstrakta izoliranih listov, Pulpa – krma z dodatkom 1 % oljčne pulpe, Pulpa Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčne pulpe

Določili smo tudi maščobno-kislinsko sestavo krmnih mešanic (preglednica 4).

Preglednica 4: Maščobno-kislinska sestava krmnih mešanic (g MK/100 g vsote MK)

MK	Kont	Vit E	Olive L	Olive Ex	Pulpa	Pulpa Ex
C14:0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
C15:0	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
C16:0	7,80	7,76	7,49	7,91	7,98	7,79
C16:1 n-7	0,14	0,14	0,14	0,14	0,16	0,14
C17:0	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07
C17:1 n-7	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
C18:0	3,67	3,67	3,69	3,62	3,64	3,67
ΣC18:1*	19,48	19,40	19,45	19,48	20,77	19,51
C18:2 n-6	25,82	25,62	24,46	26,54	25,73	25,73
C18:3 n-3	42,20	42,51	43,86	41,37	40,79	42,20
C20:0	0,19	0,19	0,19	0,19	0,20	0,19
C20:1 n-9	0,16	0,18	0,18	0,18	0,19	0,19
C22:0	0,17	0,14	0,17	0,18	0,15	0,20
C24:0	0,13	0,13	0,13	0,14	0,14	0,13
NMK	12,13	12,07	11,84	12,20	12,28	12,15
ENMK	19,86	19,80	19,84	19,89	21,20	19,92
VNMK	68,01	68,13	68,32	67,91	66,52	67,93
n-3 VNMK	42,20	42,51	43,86	41,37	40,79	42,20
n-6 VNMK	25,82	25,62	24,46	26,54	25,73	25,73
n-6/n-3 VNMK	0,61	0,60	0,56	0,64	0,63	0,61

Kont – kontrolna krma, Vit E – krma z dodatkom 150 IU vit. E, Olive L – krma z dodatkom 1 % oljčnih listov, Olive Ex – krma z dodatkom ekstrakta izoliranih listov, Pulpa – krma z dodatkom 1 % oljčne pulpe, Pulpa Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčne pulpe

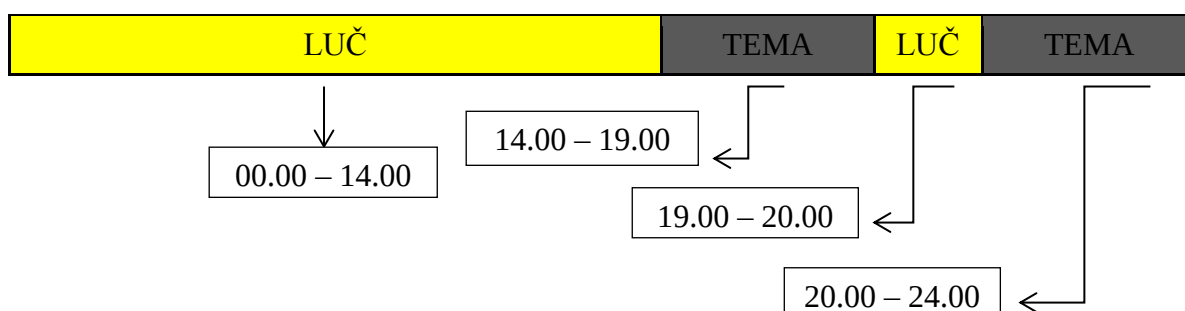
Σ C18:1* - vsota izomer oktaedecenojske kisline

3.1.4 Izvedba poskusa

Celoten poskus je trajal 6 tednov. Pri tem je bil prvi teden namenjen vhlevitvi kokoši in prilagajanju na krmo ter vhlevitveni sistem (obdobje prilagajanja). V tem obdobju so bile vse živali krmljene s krmo Kont. Naslednje štiri tedne, v poskusnem obdobju, smo kokoši krmlili s krmo po skupinah (Kont, Vit E, Olive L, Olive Ex, Pulpa, Pulpa Ex). Živali so bile krmljene po volji. Zadnji teden smo 12 živali iz vsake skupine zaklali.

Živali smo stehali ob vhlevitvi na začetku predposkusnega obdobja, ob koncu poskusa smo stehali samo živali, ki so šle v zakol.

Kokoši nesnice, vključene v poskus, smo kupili na perutninskem obratu na Duplici, kjer so bile vhljevljene v skupinske obogatene kletke in so imele ustaljen režim osvetlitve, ki smo ga uporabili tudi v našem poskusu.



Slika 4: Sistem osvetlitve

Vlaga v hlevu je znašala okoli 61 %. Nihanja vrednosti med posameznimi dnevi in znotraj posameznega dneva so bila verjetno posledica zadrževanja vode v pladnjih z iztrebki, saj so nekatere kokoši namerno puščale vodo iz napajalnikov. Temperaturo v hlevu smo skozi celotno trajanje poskusa spremenili. Začetna temperatura v hlevu je prvih 22 dni znašala povprečno 24°C. Z visoko temperaturo v hlevu smo želeli pri kokoših spodbuditi oksidacijski stres. Tako visoko temperaturo so nekatere živali komaj prenašale, zato smo jo kasneje znižali na 22 °C.

Vsakodnevno smo pobirali jajca, enkrat na teden smo pobrali ostanek krme, da bi lahko izračunali količino zaužite krme. Zadnji teden poskusa smo kokoši zaklali in odvzeli vzorce abdominalne maščobe, jeter in krvi.

3.1.5 Zbiranje jajc in priprava vzorcev za analize

V predposkusnem obdobju smo pobirali jajca in na podlagi nesnosti v tem obdobju in zauživanja krme izločili kokoši, ki so slabše zauživale krmo in slabo nesle. V poskusnem obdobju smo vsakodnevno jajca pobrali, jih stehali in označili za potrebe analiz, tako da smo vedeli kateri kokoši pripada katero jajce in kdaj je bilo zneseno. Za analize fizikalnih lastnosti jajc smo uporabili sveža jajca. Analize smo opravili v treh ponovitvah, kar pomeni, da smo si izbrali tri naključne dneve v katerih smo zjutraj pobrali jajca in opravili meritve. Za pripravo vzorcev svežih in tudi 28 dni starih jajc (ki smo jih skladiščili na

sobni temperaturi) smo tri jajca vsake kokoši strli in ločili rumenjake od beljakov. Vzorce smo z mešanjem homogenizirali in izmerili pH. Del vzorca smo shranili v Eppendorf epruvete, del v 12 ml epruvete, preostali del pa v petrijevke. Vzorec, ki smo ga dali v petrijevke smo liofilizirali. Po liofilizaciji smo vzorce shranili v majhne vrečke, ki so bile ustrezno označene, pred samo analizo pa smo jih zdrobili v drobne delce.

Po tri sveža jajca vsake kokoši smo tudi skuhal. Po kuhanju smo jim z napravo Minolta izmerili barvo rumenjaka, ločili rumenjake in beljake in jih homogenizirali. Homogenizacija je potekala z napravo Retsch Grindomix GM 200. Pred tem smo po 3 rumenjake ali beljake posamezne kokoši zalili s tekočim dušikom in jih rahlo strli s terilnikom. Tako pripravljene vzorce smo nato dali v ustrezno označene vrečke za potrebe analiz.

3.1.6 Odvzem vzorcev krvi

Zadnji dan poskusa smo 12. živalim iz vsake skupine (skupaj 48 živalim) pred zakolom odvzeli kri za kometni test. Kri smo odvzeli iz krilne vene s pomočjo metuljčkov Safety-Lok (0,8×19×304,8mm, BD) v vakumske epruvete. Takoj po zakolu smo odvzeli tudi kri za določanje MDA v plazmi. Za kometni test smo uporabili epruvete BD 368841 (2 ml), za MDA pa BD 367864 (6 ml). Obe vrsti epruvet sta vsebovali antikoagulant EDTA. Kri za določanje MDA smo centrifugirali 15 minut pri 4°C pri 1000 x g. Plazmo smo nato prenesli v 1,5 ml plastične Eppendorf epruvete in jih do analiz hranili na -70°C.

3.2 ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE FIZIKALNIH LASTNOSTI JAJC

Za določanje oziroma ocenjevanje fizikalnih lastnosti jajc smo uporabili digitalni kljunasti merilnik, mehanski mikrometer, elektronko napravo INSTRON ter napravo, ki jo sestavljajo reflektometer, tripodni mikrometer, kolorimeter in mikroprocesor s tiskalnikom.

3.2.1 Oblika jajca

Obliko jajca izražamo z indeksom oblike. Da smo lahko indeks izračunali smo posameznemu jajcu z digitalnim kljunastim merilom izmerili višino in širino. Jajce tipične oblike ima indeks med 70 in 74. Pri podolgovatih jajcih je indeks nekoliko manjši, pri bolj debelih pa nekoliko večji. Jajca, ki imajo večja odstopanja od tipičnega indeksa so nezaželeni tako pri porabnikih kot tudi pri proizvajalcih, saj so bolj podvržena lomom in drugim poškodbam med samim transportom in pakiranjem (Holcman in sod, 2004). Indeks oblike lahko izračunamo po naslednji formuli:

$$IO = (\text{širina jajca} \div \text{višina jajca}) \times 100 \quad \dots(2)$$

3.2.2 Masa jajca

Jajca smo tehtali vsakodnevno takoj po pobiranju s pomočjo analitske tehtnice. Jajca, ki smo jih uporabili za merjenje fizikalnih lastnosti smo še dodatno tehtali v procesu določanja fizikalnih lastnosti z elektronsko tehtnico, ki meri na 0,01 g natančno.

3.2.3 pH rumenjaka in beljaka

pH rumenjaka in beljaka smo merili z avtomatskim pH metrom, pri čemer smo elektrodo pomočili v beljak ali rumenjak in zabeležili izmerjeno vrednost. pH meter smo pred vsakim merjenjem umerili z raztopinami poznanih pH vrednosti.

3.2.4 Barva lupine

Za določanje barve lupine smo uporabili reflektometer. Ta deluje na principu merjenja odbite količine svetlobe od površine jajca. Pred začetkom merjenja smo reflektometer umerili s pomočjo dveh vzorčnih ploščic. Črna ploščica je imela 0,00 % odbite svetlobe, bela ploščica pa 82,10 %. Obe dve ploščici sta bili umerjeni po glavni beli površini, ki ima 100 % odboj, v državnem fizikalnem laboratoriju v Veliki Britaniji (Holcman, 1990). Barvo lupine smo vedno izmerili na topem delu jajca, ki ni smel biti umazan ali pa poškodovan. Večja kot je bila izmerjena vrednost, svetlejša je bila površina jajca in obratno.

3.2.5 Višina gostega beljaka

Višino gostega beljaka smo izmerili s pomočjo tripodnega mikrometra. Jajce smo najprej razbili na stekleno površino z zrcalno podlago. Višino merimo v milimetrih in sicer 1 cm od roba rumenjaka, na mestu, kjer ni prisotnih krvnih ali mesnih peg.

3.2.6 Haughove enote

Haughove enote so splošno merilo kakovosti beljaka. Njihov razpon sega od 0 do 100, v nekaterih primerih pa tudi več. Pri tem višja vrednost pomeni boljšo kakovost, nižja pa slabšo. Vrednost je višja predvsem na začetku nesnosti, kasneje pa upadajo. Tako vrednost nižja od 55 pomeni za porabnika nesprejemljivo kakovost, medtem ko je višja od 90 odlična (Holcman in sod., 2004).

Naprava, ki nam je avtomatsko zapisovala podatke o višini gostega beljaka in masi posameznega jajca, nam je avtomatsko sproti izračunavala in zapisovala tudi Haughove enote.

3.2.7 Barva rumenjaka

Barvo rumenjaka lahko subjektivno določamo s Rochevo pahljačo, v našem primeru pa smo jo objektivno določili z uporabo kolorimetra, ki prav tako intenzivnost obarvanosti podaja v Rochevih enotah. Barvna lestvica ima razpon od 1 do 15, pri čemer je rumenjak z najmanjšo vrednostjo tudi najmanj intenzivno obarvan, z največjo vrednostjo pa najbolj obarvan (Strelec, 2008).

3.2.8 Krvne in mesne pege

Krvne in mesne pege smo določili tako, da smo jajce previdno razbili na stekleno površino z zrcalno podlago. Ta nam je omogočila, da smo imeli pogled na celotno površino jajca,

tako od zgoraj, kot od spodaj. Pri jajcu, ki je vsebovalo katero od peg smo naredili zaznamek, ki se je avtomatsko beležil na končni izpis.

3.2.9 Trdnost lupine

Trdnost lupine smo merili z aparatom Instron. Aparat je povezan z računalnikom in sproti beleži rezultate in izrisuje krivuljo merjenja. Sestavljen je iz dveh vodoravno nameščenih plošč. Na spodnjo ploščo smo vodoravno postavili jajce na podstavek, proti kateremu se je nato počasi spuščala zgornja plošča. Ta je počasi pritiskala na jajce toliko časa dokler ni rahlo počilo, računalnik pa je zabeležil silo, ki je za to bila potrebna. Pri večini jajc smo pok lahko slišali, čeprav ga na jajcu ni bilo opaziti.

3.2.10 Debelina lupine

Debelino smo izmerili z mehanskim mikrometrom, ki meri do 0,01 mm natančno. Merili smo lupino, ki je bila čista, brez ostankov beljaka, vendar pa je morala imeti prisotni membrani. Prisotnost beljaka ali pa nečistost lupine lahko privede do napačne meritve. Debelino lupine smo izmerili na ekvatorialnem delu jajca, saj je tam debelina najmanj variabilna. Debelina jajčne lupine je na različnih delih jajca različna. Najtanjša je na ekvatorialnem delu, medtem, ko je na obeh polih najdebelejša (Holcman 1990). Merjenje smo opravili na treh mestih in nato izračunali povprečno vrednost.

3.2.11 Masa suhe lupine

Ko smo jajca razbili, smo izmerili fizikalne lastnosti njihove vsebine, jajčno lupino posameznega jajca pa smo skrbno odložili, da smo preprečili prekomerno lomljenje. Lupine smo nato nežno oprali, da smo odstranili ostanke beljaka in jih pustili na sobni temperaturi, da so se posušile. Lupine smo tehtali z elektronsko tehtnico, ki meri na 0,01 g natančno.

3.3 ANALITSKA METODA ZA DOLOČANJE MAŠČOBNIH KISLIN

Za določanje maščobno-kislinske sestave vzorcev smo uporabili plinski kromatograf Agilent 6890 Series GC Sistem. Vzorce rumenjakov, ki smo jih analizirali, smo predhodno liofilizirali in nato zmleli. V epruvete z navojem in zamaški smo odtehtali 0,25 g vzorca. Posameznemu vzorcu smo dodali 300 μl CH_2Cl_2 in 3 ml 0,5 M NaOH v metanolu. Epruvete smo prepihali z dušikom, jih dobro zamašili in segrevali v termičnem bloku na 90°C za 10 minut. Po segrevanju smo jih na hitro ohladili v mrzli vodi. V ohlajene epruvete smo nato odpipetirali še 3 ml 14 % BF_3 v metanolu, ponovno vse skupaj prepihali z dušikom in segreli v termičnem bloku. Po ohlajanju z mrzlo vodo smo dodali še 3 ml deionizirane vode in 1,5 ml heksana. Vsako epruveto smo stresali 1 minuto, temu pa je sledilo 10 minutno centrifugiranje na 2000 obratih na minuto. Po centrifugiranju smo previdno s Pasteurjevo pipeto odstranili zgornjo heksansko fazo in jo shranili v posodico za shranjevanje vzorcev, ki smo jo pred zapiranjem še prepihali z dušikom. Pripravljene vzorce smo nato analizirali s plinskim kromatografom (Park in Goins, 1994).

Vzorci smo zložili v avtomatski podajalec vzorcev (Agilent 7683 Series), injiciranje posameznih vzorcev na kolono (Omegawax 320, proizvajalca Supelco, dolžine 30 metrov, premera 0,32 mm in debelino stacionarne faze 0,25 μm) je potekalo s pomočjo avtomatskega injektorja (Agilent 7683 Series). Za ovrednotenje podatkov smo uporabili programsko opremo ChemStation.

3.4 ANALITSKE METODE ZA DOLOČANJE MALONDIALDEHIDA

3.4.1 Določanje malondialdehida v jajcih

Tako kot pri določanju maščobnih kislin, smo tudi za določanje malondialdehida (MDA) v epruvete z navojem in zamaški odtehtali 0,25 g vzorca rumenjaka v dveh ponovitvah. Dodali smo 2,5 ml 0,8 % butilhidroksitoluena (BHT) v heksanu in 5 ml 5 % trikloroacetne kisline (TCA), vse skupaj zmešali in 10 minut homogenizirali v ultrazvočni kopeli. BHT smo na začetku analize dodali zato, da smo preprečili oksidacijo vzorcev med postopkom, TCA pa zato, da smo sprostili molekule MDA vezane na druge molekule. Po končani homogenizaciji je sledilo 5 minutno centrifugiranje na 5000 obratih na minuto. Pri centrifugiranju se je na vrhu nabrala heksanska faza, v katero so se ekstrahirale maščobe. To fazo smo odstranili s Pasteurjevo pipeto in ponovili ekstrakcijo, tako da smo ponovno dodali 2,5 ml 0,8 % BHT v heksanu, vse skupaj homogenizirali in centrifugirali ter odstranili zgornjo heksansko fazo. Temu je sledil postopek derivatiziranja. Iz supernatanta, ki nam je ostal v epruveti smo odpipetirali 1,5 ml v sveže epruvete in dodali 1 ml 0,6 % tiobarbiturne kisline (TBA), vse skupaj pa postavili v termični blok in pol ure segrevali na 90°C. Pri segrevanju v kisli raztopini nastane svetlo rožnat kompleks, katerega tvorijo molekule TBA in MDA v razmerju 2:1. Po pol ure smo vzorce ohladili v mrzli vodi, jih s pomočjo brizg in Milliporovih filtrov prefiltrirali v vialo in dali v analizo v tekočinski kromatograf HPLC.

3.4.2 Določanje malondialdehida v krvni plazmi

Vzorci smo pripravili v 2 ponovitvah. Pri tem smo v 1,5 ml Eppendorf epruvete odpipetirali:

- 100 μl 0,44 M raztopine H_3PO_4
- 10 μl 0,2 % raztopine BHT v absolutnem etanolu
- 100 μl plazme oziroma Milli Q (MQ) pri slepem vzorcu.

Vsebinsko smo dobro premešali na mešalu in jih pustili stati 15 minut, potem smo dodali 300 μl absolutnega etanola, vse skupaj ponovno premešali in centrifugirali 15 minut pri 15.000 x g pri 4 °C. Slepkih vzorcev in standardov nismo centrifugirali. V Hachove epruvete smo odpipetirali:

- 1,5 ml 0,44 M raztopine H_3PO_4 ,
- 350 μl centrifugiranega vzorca,
- 500 μl 0,6 % raztopine TBA,
- 890 μl vode MQ.

Raztopine smo ponovno premešali na mešalu in jih postavili v termični blok za 60 minut na 95 °C. Po končanem segrevanju je tako kot pri določanju v rumenjaki sledilo hitro ohlajanje v mrzli vodi in filtriranje s pomočjo 5 ml brizg in 0,22 μm Milliporovimi

membranskimi filtri v 2 ml vial, katere smo nato vstavili v avtomatski vzorčevalnik v HPLC.

Za določevanje MDA s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) smo uporabili aparat Waters Alliance 2690 in Waters 474 Scanning fluorescenčni detektor ($\lambda_{vzb} = 515 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 553 \text{ nm}$). Podatke, ki so se avtomatsko beležili na računalnik, smo ovrednotili s programsko opremo Millenium³² Chromatography Manager.

Ločevanje kompleksa MDA - TBA₂ je potekalo na koloni HyperClone 5 μ m ODS (C₁₈) 120A (4,6 x 150 mm; Phenomenex Inc., ZDA) s predkolono C₁₈ ODS (4 mm x 3 mm; Phenomenex Inc., ZDA). Pretok mobilne faze skozi kolono je bil 1 ml/min, čas analize pa 6 min/vzorec. Pri analizi plazme smo injicirali 50 μ l vzorca, medtem ko smo pri analizi rumenjakov injicirali samo 20 μ l vzorca. Temperatura vzorcev je bila 4 °C, temperatura kolone pa 23°C.

Kot mobilno fazo smo uporabili mešanico metanola (MeOH) in 50 mM kalijevega dihidrogen fosfatnega pufra (KH₂PO₄; pH = 6,9). Mešanico smo pripravili v razmerju 35:65 (MeOH:puffer), za uravnavanje pH pufra pa smo uporabili 1 M KOH. Pred uporabo smo puffer prefiltrirali skozi filter s 0,45 μ m porami.

Za kvantitativno ovrednotenje dobljenih rezultatov smo uporabili umeritveno premico, ki smo jo izmerili s pripravljenimi standardi TEP (1,1,3,3-tetraetoksipropan) v koncentracijskem območju, ki je bil odvisen od koncentracije MDA v vzorcih.

3.5 KOMETNI TEST – DOLOČANJE POŠKODB DNK LIMFOCITOV

Za izvedbo kometnega testa je potrebno veliko reagentov in kemikalij. V našem primeru smo uporabili naslednje: Histopaque-1077 (Sigma H8889), tekoči medij RPMI-1640 (Sigma F2442), EDTA (etilendiamintetra očetna kislina) (Sigma E5134), Trizma Base (Sigma T8524), DMSO (dimetilsulfoksid) (Sigma D8779), Triton X-100 (Sigma T9284), N-lavriksarkozinat (Sigma L5777), Etidijev bromid, NaCl, KCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, Agarose Routine Use (SIGMA NMP agaroz) - agaroz s tališčem pri običajni temperaturi (Sigma A9539) in Agarose Low Melting Use (SIGMA LMP agaroz) - agaroz s tališčem pri nizki temperaturi (Sigma A9414).

3.5.1 Izolacija limfocitov

Izolacija limfocitov je potekala po metodi, ki so jo opisali Singh in sod. (1988), v katero smo uvedli manjše spremembe. V 14 ml centrifugirke smo odpipetirali 1,25 ml Histopaque – 1077. Temu smo previdno in počasi dodali 4 ml mešanice krvi in RPMI – 1640 medija v razmerju 1:1. Pri tem sta nastala dva ločena sloja. V tem stadiju smo vzorce centrifugirali na sobni temperaturi pri 300 x g, 25 minut. Po končanem centrifugiranju smo limfocite prenesli v svežo centrifugirko, v katero smo predhodno odpipetirali 2,5 ml RPMI – 1640 medija ter vse skupaj ponovno centrifugirali pri isti temperaturi in vrtiljajih, vendar samo za 5 minut. Ta postopek se imenuje spiranje limfocitov in smo ga ponovili dvakrat. Po zadnji ponovitvi smo odstranili supernatant in pelet suspendirali v 0,5 ml RPMI - 1640 medija. Z

mešanjem na mešalcu smo pelet razbili na manjše delce in dodali v LMP agarozo v razmerju 1:5 (0,4 ml suspenzije limfocitov + 1,6 ml 0,6 % LMP agaroze).

3.5.2 Postopek kometnega testa

Kometni test smo izvedli po postopku, ki ga navajajo Singh in sod. (1988), v katerega smo vnesli manjše spremembe. Uporabili smo več slojev agaroze, daljši čas elektroforeze in manjšo koncentracijo etidijevega bromida. Limfocite, ki smo jih izolirali, smo vključili v agarozne gele, v postopku smo pripravili tudi pozitivno kontrolo, pri čemer smo minigele potopili v raztopino H_2O_2 in s tem povzročili poškodbe. Temu je nato sledila alkalna celična liza, elektroforeza, nevtralizacija in barvanje z etidijevim bromidom ter ponovno spiranje.

Za ovrednotenje poškodb DNK smo uporabili fluorescenčni mikroskop (Olympus CH 50, Japonska). Rezultate smo ovrednotili pod 200 – kratno povečavo in pri eksitacijski svetlobi valovnih dolžin med 515 in 560 nm in emisijskem filtru 590 nm. Za lažje ovrednotenje smo sliko s pomočjo kamere Hamamatsu Orca 2 (Japonska) prenesli na ekran računalnika, od koder smo potem z računalniškim programom Komet 5 (Single Cell Gel Electrophoresis, Kinetic Imaging Ltd., 2000, VB) ocenili poškodbe jedrne DNK. Program je zasnovan tako, da ima na ekranu posebno okence, ki se omeji na sliko posameznega jedra in zajame tako glavo kot tudi rep kometa. S klikom na desni gumb potrdimo meritev in računalnik izračuna delež DNK v glavi in repu kometa ter parametre za vrednotenje poškodb.

Pri vsakem poskusnem vzorcu smo ocenili poškodbe 100 naključno izbranih celičnih jeder. Ocene smo nato statistično ovrednotili s pomočjo posebej pripravljenih makrojev programa Microsoft Excel. Rezultat smo prikazali kot:

- % DNK v repu kometa
- repni moment po Olivu (OTM; Olive in sod., 1992).

Odstotek DNK v repu kometa predstavlja razliko med celokupnim fluorescenčnim signalom in signalom v glavi kometa.

OTM pa nam pove razliko med centrom v repu in centrom v glavi kometa, pomnoženo z intenzivnostjo signala v repu in vse skupaj deljeno z intenzivnostjo signala celotnega kometa.

Izračunamo ga po enačbi:

$$OTM = \frac{(\text{srednja vrednost deleža DNK v repu} - \text{srednja vrednost deleža DNK v glavi})}{\% \text{ DNK repa}} \div 100 \quad \dots(3)$$

OTM nima enot; večje vrednosti predstavljajo večje poškodbe.

3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS 9.3. Za ugotavljanje razlik med posameznimi skupinami smo uporabili proceduro GLM (General Linear Model) pri kateri smo po metodi najmanjših kvadratov razvili tri modele. V prvi statistični model smo vključili vpliv skupine, v drugega regresijo na končno maso kokoši in jajčno maso, v tretjega pa regresijo na končno in jajčno maso znotraj skupine. Rezultate smo namesto s srednjimi vrednostmi podali z ocenjenimi srednjimi vrednostmi (LSM) $\pm$ standardna napaka.

Statistični model 1 smo uporabili za lastnosti: zauživanje, masa jajc, začetna masa živali, končna masa živali, jajčna masa, nesnost, MDA v plazmi, DNA v glavi, OTM, IO, višina beljaka, HU, barva rumenjaka, barva lupine, masa lupine, debelina lupine, maksimalna sila, da se jajce stre, pH rumenjaka svežih in 28 dni starih jajc, pH svežega in 28 dni starega beljaka, L, a, b ter MDA v svežem in 28 dni starem rumenjaku.

$$y_{ij} = \mu + S_i + e_{ij} \quad \dots(4)$$

y_{ij}	= opazovana vrednost
μ	= srednja vrednost
S_i	= vpliv i-te skupine (i = 1, 2, 3, 4, 5, 6)
e_{ij}	= ostanek

Statistični model 2 smo uporabili za lastnosti: razlika (28 dni - svež) v vsebnosti plamitinske kisline in vsoti VNMK ter NMK.

$$y_{ij} = \mu + S_i + b_1x_{1ij} + b_2x_{2ij} + e_{ij} \quad \dots (5)$$

y_{ij}	= opazovana vrednost
μ	= srednja vrednost
S_i	= vpliv i-te skupine (i = 1, 2, 3, 4, 5, 6)
b_1	= regresijski koeficient za lastnost končna masa živali
x_{1ij}	= neodvisna spremenljivka končna masa
b_2	= regresijski koeficient za lastnost znesena jajčna masa (g/dan)
x_{2ij}	= neodvisna spremenljivka jajčna masa
e_{ij}	= ostanek

Statistični model 3 smo uporabili za lastnosti: koncentracije MK v svežih jajcih, koncentracije MK v 28 dni starih jajcih ter za razlike v koncentracijah MK (28 dni - sveže) (razen palmitinske in vsote VNMK ter NMK).

$$y_{ij} = \mu + S_i + b_{1i}x_{1ij} + b_{2i}x_{2ij} + e_{ij} \quad \dots (6)$$

y_{ij}	= opazovana vrednost
μ	= srednja vrednost
S_i	= vpliv i-te skupine (i = 1, 2, 3, 4, 5, 6)
b_{1i}	= regresijski koeficient za lastnost končne mase živali vgnezdene znotraj skupine
x_{1ij}	= neodvisna spremenljivka končna masa
b_{2i}	= regresijski koeficient za lastnost jajčne mase vgnezdene znotraj skupine
x_{2ij}	= neodvisna spremenljivka znesena jajčna masa (g/dan)
e_{ij}	= ostanek

Razlike med skupinami smo ovrednotili s pomočjo linearnih kontrastov in Tukey testa.

4 REZULTATI

4.1 PROIZVODNE LASTNOSTI KOKOŠI

Skozi celoten poskus smo vsakodnevno pobirali in tehtali jajca, enkrat tedensko smo zbrali in tehtali ostanke krme, s pomočjo katerih smo izračunali količino zaužite krme kokoši. Na podlagi zbranih podatkov smo izračunali še zneseno jajčno maso na dan in ovrednotili proizvodne lastnosti kokoši (preglednica 5).

Preglednica 5: Rezultati proizvodnih lastnosti kokoši (LSM $\pm$ standardna napaka)

	Kont	Vit E	Olive L	Olive Ex	Pulpa	Pulpa Ex	p
Zauživanje krme (g/dan)	109,35 $\pm 2,65$	113,50 $\pm 2,65$	108,84 $\pm 2,56$	110,83 $\pm 2,65$	104,04 $\pm 2,65$	114,81 $\pm 2,56$	0,0721
Nesnost na uhlevljeno število kokoši (%)	98,35 $\pm 1,25$	96,15 $\pm 1,25$	95,15 $\pm 1,20$	96,15 $\pm 1,25$	93,68 $\pm 1,25$	97,96 $\pm 1,20$	0,0919
Masa jajca (g)	64,27 $\pm 1,01$	64,49 $\pm 1,01$	62,85 $\pm 0,98$	63,67 $\pm 1,01$	62,62 $\pm 1,01$	64,50 $\pm 0,98$	0,6280
Jajčna masa (g/kokoš/dan)	63,21 $\pm 1,26$	62,00 $\pm 1,26$	59,75 $\pm 1,21$	61,27 $\pm 1,26$	58,64 $\pm 1,26$	63,23 $\pm 1,21$	0,0580
Začetna masa kokoši (g)	2271,7 $\pm 58,19$	2265,08 $\pm 58,19$	2186,14 $\pm 56,07$	2159,23 $\pm 58,19$	2130,00 $\pm 58,19$	2168,14 $\pm 56,07$	0,4163
Končna masa kokoši (g)	2105,67 $\pm 59,09$	2162,08 $\pm 59,09$	2062,58 $\pm 59,09$	2059,25 $\pm 59,09$	2013,67 ± 5 9,09	2092,42 $\pm 59,09$	0,6077

Kont – kontrolna krma, Vit E – krma z dodatkom 150 IU vit. E, Olive L – krma z dodatkom 1 % oljčnih listov, Olive Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčnih listov, Pulpa – krma z dodatkom 1 % oljčne pulpe, Pulpa Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčne pulpe

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

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

Povprečno so največ krme zaužile kokoši skupine, ki so imele dodatek ekstrakta iz pulpe (114,81 g/dan), najmanj pa kokoši, katerim smo v krmo dodali pulpo (104,04 g/dan). Količina zaužite krme ostalih posameznih skupin se je gibala med tema dvema vrednostma (preglednica 5).

Nesnost za posamezno skupino smo računali na kokoš, kar pomeni, da nismo upoštevali kokoši, ki smo jih morali izločiti ali pa tistih, ki so poginile. Najboljšo nesnost so imele kokoši skupine Kont (98,35 %), najslabšo pa kokoši skupine Pulpa (93,68 %) (preglednica 5).

Razlike v povprečni vrednosti mase jajc so bile med posameznimi skupinami minimalne (preglednica 5). Pri skupinah Pulpa in Olive L vrednost znaša okoli 63 g, temu sledi skupina Olive Ex z dobrimi 64 g, najtežja jajca pa so v povprečju nesle kokoši skupin Kont, Vit E in Pulpa Ex (približno 65 g).

Največ jajčne mase so znesle kokoši skupin Kont (63,21 g/dan) in Pulpa Ex (63,23 g/dan), najmanj pa skupina Pulpa 58,64 g/dan. Količina jajčne mase sovпада z nesnostjo. Skupina

Kont, je imela večjo nesnost in je znesla tudi največjo količino jajčne mase, enako je tudi pri najmanjši vrednosti. Živali iz skupine Pulpa z najmanjšo nesnostjo imajo tudi najmanjšo količino jajčne mase na dan (preglednica 5).

Živali smo tehtali na dan, ko smo jih vblevali in zadnji dan, pred zakolom. V povprečju so bile najtežje živali skupin Kont (2271,47 g) in Vit E (2256,08 g), najlažje pa živali skupine Pulpa (2130,00 g). Kasneje so živali zaradi prireje jajc nekoliko izgubile na telesni masi, vendar so kljub temu povprečno ostale najtežje živali skupin Kont in Vit E, najlažje pa skupine Pulpa. Rezultati so pokazali, da je razlika statistično značilna med začetno in končno maso, med skupinama Kont in Pulpa Ex ($p = 0,0395$).

V času poskusa smo skupno izločili šest kokoši. Po eno iz skupin Pulpa in Olive Ex, dve iz skupine Olive L in dve iz skupine Pulpa Ex. Zaradi pogina smo izločili samo eno kokoš in sicer iz skupine Pulpa Ex.

4.2 REZULTATI MDA IN POŠKODB DNK (KOMETNI TEST)

Oksidativni status kokoši smo merili s koncentracijo MDA v krvni plazmi ter s kometnim testom poškodbe DNK levkocitov.

Preglednica 6: Rezultati analiz MDA in poškodb DNA levkocitov (LSM $\pm$ standardna napaka)

	Kont	Vit E	Olive L	Olive Ex	Pulpa	Pulpa Ex	p
MDA v plazmi (nmol/ml)	1,66 $\pm 0,11$	1,49 $\pm 0,10$	1,57 $\pm 0,10$	1,39 $\pm 0,10$	1,47 $\pm 0,11$	1,58 $\pm 0,12$	0,5446
DNK v glavi (%)	79,47 $\pm 2,37$	76,41 $\pm 2,57$	79,59 $\pm 2,22$	80,58 $\pm 2,22$	76,44 $\pm 2,56$	80,56 $\pm 2,37$	0,6902
OTM ¹	6,02 $\pm 0,78$	6,89 $\pm 0,85$	5,43 $\pm 0,74$	5,27 $\pm 0,74$	7,37 $\pm 0,85$	5,79 $\pm 0,79$	0,3965

Kont – kontrolna krma, Vit E – krma z dodatkom 150 IU vit. E, Olive L – krma z dodatkom 1 % oljčnih listov, Olive Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčnih listov, Pulpa – krma z dodatkom 1 % oljčne pulpe, Pulpa Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčne pulpe

OTM¹ - repni moment po Olivu (Olive tail moment)

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

Največjo koncentracijo MDA v krvni plazmi je imela skupina, kateri smo krmili kontrolno krmo brez dodatkov (1,66 nmol/ml), najmanj pa je bilo MDA v plazmi kokoši skupine Olive Ex (1,39 nmol/ml). Razlike niso bile statistično značilne.

Rezultati poškodb DNK levkocitov so predstavljeni v preglednici 6. Najmanjše poškodbe DNK v levkocitih sta imeli skupini Olive Ex (80,58 %) in Pulpe Ex (80,56 %), največje poškodbe pa skupini Pulpa (76,44 %) in Vit E (76,41 %). Razlike med skupinami niso bile statistično značilne.

Razlike vrednosti repnega momenta po Olivu niso bile statistično značilne. Največji repni moment, največje poškodbe DNK, je imela ima skupina Pulpa (7,37), najmanjšega pa Olive Ex (5,27) (preglednica 6).

Pri statistični obdelavi podatkov nas je zanimalo ali so koncentracija MDA v plazmi, poškodbe DNK levkocitov ter OTM odvisni od količine jajčne mase. Ugotovili smo, da statistično značilne odvisnosti ni.

4.3 FIZIKALNE LASTNOSTI JAJC

Zunanjo kakovost jajc določajo njene zunanje lastnosti. V našem primeru smo se osredotočili na merjenje višine in širine (na podlagi teh dveh podatkov smo izračunali indeks oblike) jajca, barvo jajčne lupine, maso suhe jajčne lupine in debelino jajčne lupine (preglednica 7). Notranjo kakovost pa smo ocenili z meritvami višine beljaka, Haugovih enot (HU), z določanjem mesnih in krvnih peg, pH rumenjaka in beljaka (v svežih in 28 dni starih jajcih) ter barve rumenjaka tako v svežih kot v kuhanih jajcih.

Preglednica 7: Rezultati fizikalnih lastnosti jajc (LSM $\pm$ standardna napaka)

	Kont	Vit E	Olive L	Olive Ex	Pulpa	Pulpa Ex	p
IO ¹	78,81 $\pm 0,90$	76,98 $\pm 0,90$	76,22 $\pm 0,87$	76,87 $\pm 0,90$	75,45 $\pm 0,90$	75,70 $\pm 0,87$	0,1166
Višina beljaka (mm)	7,45 $\pm 0,28$	6,81 $\pm 0,28$	7,16 $\pm 0,27$	7,15 $\pm 0,28$	7,64 $\pm 0,28$	6,74 $\pm 0,27$	0,1853
HU ²	84,59 $\pm 1,87$	80,22 $\pm 1,87$	82,87 $\pm 1,81$	82,56 $\pm 1,87$	86,22 $\pm 1,87$	79,57 $\pm 1,81$	0,1118
Barva rumenjaka	7,97 $\pm 0,08$	7,99 $\pm 0,08$	8,06 $\pm 0,08$	8,06 $\pm 0,08$	7,97 $\pm 0,08$	8,00 $\pm 0,08$	0,9271
Masa suhe lupine (g)	6,10 $\pm 0,14$	6,22 $\pm 0,14$	6,16 $\pm 0,13$	6,09 $\pm 0,14$	5,94 $\pm 0,14$	6,25 $\pm 0,13$	0,6573
Debelina lupine (mm)	0,38 $\pm 0,01$	0,39 $\pm 0,01$	0,39 $\pm 0,01$	0,38 $\pm 0,01$	0,38 $\pm 0,01$	0,39 $\pm 0,01$	0,5822
Pege	1	1	1	1	1	1	/
Barva lupine (%)	34,02 ^{ab} $\pm 0,97$	34,26 ^{ab} $\pm 0,97$	32,04 ^{ab} $\pm 0,94$	30,81 ^a $\pm 0,97$	35,63 ^b $\pm 0,97$	32,45 ^{ab} $\pm 0,94$	0,0102
Maksimalna sila (N)	40,45 ^{ab} $\pm 1,58$	40,17 ^{ab} $\pm 1,58$	44,28 ^a $\pm 1,52$	39,70 ^{ab} $\pm 1,58$	36,12 ^b $\pm 1,58$	40,76 ^{ab} $\pm 1,52$	0,0226
L3	85,26 $\pm 0,88$	86,67 $\pm 0,88$	85,61 $\pm 0,88$	85,09 $\pm 0,80$	85,87 $\pm 0,88$	85,07 $\pm 0,88$	0,7749
a4	-6,87 $\pm 0,27$	-6,53 $\pm 0,27$	-6,58 $\pm 0,27$	-6,47 $\pm 0,25$	-6,65 $\pm 0,27$	-6,53 $\pm 0,27$	0,9258
b5	53,17 $\pm 1,02$	54,49 $\pm 1,02$	54,49 $\pm 1,02$	54,34 $\pm 0,93$	54,37 $\pm 1,02$	54,35 $\pm 1,02$	0,9375

Kont – kontrolna krma, Vit E – krma z dodatkom 150 IU vit. E, Olive L – krma z dodatkom 1 % oljčnih listov, Olive Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčnih listov, Pulpa – krma z dodatkom 1 % oljčne pulpe, Pulpa Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčne pulpe

¹ Indeks oblike

² Haughove enote

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

³L - parameter določa svetlost, ⁴b – parameter določa (+/-) rumeno do modro, ⁵a - parameter določa (+/-) rdeče do zeleno

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

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 7: Rezultati fizikalnih lastnosti jajc (LSM ± standardna napaka)

	Kont	Vit E	Olive L	Olive Ex	Pulpa	Pulpa Ex	p
pH rumenjaka	5,97 ±0,03	6,04 ±0,03	5,99 ±0,03	6,01 ±0,03	5,99 ±0,03	6,00 ±0,03	0,7686
pH beljaka	7,73 ^a ±0,04	7,88 ^{ab} ±0,04	7,90 ^b ±0,04	7,82 ^{ab} ±0,04	7,81 ^{ab} ±0,04	7,88 ^{ab} ±0,04	0,0543
pH 28 dni starega rumenjaka	6,46 ±0,03	6,43 ±0,03	6,42 ±0,03	6,49 ±0,03	6,47 ±0,03	6,38 ±0,03	0,1404
pH 28 dni starega beljaka	9,41 ±0,03	9,36 ±0,03	9,44 ±0,03	9,39 ±0,03	9,38 ±0,03	9,46 ±0,03	0,3957

Kont – kontrolna krma, Vit E – krma z dodatkom 150 IU vit. E, Olive L – krma z dodatkom 1 % oljčnih listov, Olive Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčnih listov, Pulpa – krma z dodatkom 1 % oljčne pulpe, Pulpa Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčne pulpe

¹ Indeks oblike

² Haughove enote

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

³L - parameter določa svetlost, ⁴b – parameter določa (+/-) rumeno do modro, ⁵a - parameter določa (+/-) rdeče do zeleno

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

Pri indeksu oblike (IO) jajca ni bilo večjih razlik med skupinami. Največji indeks oblike so imela jajca kontrolne skupine (78,81), najmanjšega pa skupina Pulpa (75,44) in Pulpa Ex (75,70) (preglednica 7).

Najvišji gosti beljak (7,64 mm) in najvišjo vrednost HU (86,22) smo zabeležili pri skupini Pulpa, najnižjega pa pri skupini Pulpa Ex, katerega vrednost je znašala 6,74 mm, vrednost HU pa 79,57 (preglednica 7). Razlika med najvišjim in najnižjim beljakom je znašala 0,9 mm.

Barva rumenjaka je bila pri vseh skupinah bolj ali manj enotna in je znašala okoli 8 (preglednica 7).

Masa suhe lupine je bila največja pri skupini Pulpa Ex (6,25 g) in sorazmerno s tem je bila tudi vrednost debeline lupine največja (0,39 mm). Podobno smo ugotovili pri ostalih skupinah, ki so imele nekoliko večjo maso suhe lupine. Najlažjo lupino so imela jajca skupine Pulpa (5,94 g), ki so prav tako imela najtanjšo lupino (0,38 mm) (preglednica 7).

Že med postopkom določanja fizikalnih lastnosti jajc smo opazili, da veliko jajc vsebuje mesne ali pa krvne pege. Na podlagi zabeleženih podatkov in njihove analize smo ugotovili, da so v povprečju te prisotne v vseh skupinah.

Pri barvi lupine smo ugotovili, da so najtemnejša jajca nesle kokoši iz skupine Olive Ex (30,81 %), najsvetlejšo lupino pa so imela jajca skupine Pulpa (35,63 %), razlika med njima je bila statistično značilna ($p = 0,0099$).

Barva rumenjaka pri sveže kuhanih jajcih se tako kot pri svežih jajcih ni razlikovala med skupinami (preglednica 7).

Iz preglednice 7 lahko razberemo, da je bilo največ sile, da se jajce stre, potrebno uporabiti pri jajcih v skupini Olive L (44,28 N), najmanj pa pri skupini Pulpa (36,12 N), razlika med njima je statistično značilna ($p = 0,0210$).

pH rumenjakov svežih jajc je v povprečju znašal 6. Najnižjega je imela skupina Kont (5,97), najvišjega pa skupina Vit E (6,04). Jajce skupin Kont in Olive L sta se statistično značilno razlikovali v pH svežega beljaka ($p = 0,0482$). Tako kot pH v svežem rumenjaku se tudi pH v 28 dni starem rumenjaku in beljaku ni razlikoval. pH rumenjaka je bil največji pri skupini Olive Ex (6,49), najmanjši pa pri skupini Pulpa Ex (6,38). Pri pH beljaka pa je imela skupina Pulpa Ex največjo vrednost (9,46), skupina Vit E pa najmanjšo (9,36) (preglednica 7).

4.4 OKSIDATIVNA STABILNOST JAJC

V preglednici 8 je prikazana koncentracija MDA v rumenjakih jajc.

Preglednica 8: Oksidacijska stabilnost jajc (MDA v nmol/g SS) (LSM $\pm$ standardna napaka)

	Kont	Vit E	Olive L	Olive Ex	Pulpa	Pulpa Ex	p
MDA v svežem jajcu	2,29 $\pm 0,36$	2,30 $\pm 0,36$	2,79 $\pm 0,36$	3,01 $\pm 0,36$	2,58 $\pm 0,36$	2,20 $\pm 0,36$	0,5480
MDA v 28 dni starem jajcu	2,43 $\pm 0,41$	2,72 $\pm 0,41$	2,73 $\pm 0,41$	2,27 $\pm 0,41$	3,32 $\pm 0,41$	2,80 $\pm 0,41$	0,5691

Kont – kontrolna krma, Vit E – krma z dodatkom 150 IU vit. E, Olive L – krma z dodatkom 1 % oljčnih listov, Olive Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčnih listov, Pulpa – krma z dodatkom 1 % oljčne pulpe, Pulpa Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčne pulpe
p - vrednost nam pove ali so razlike med skupinami statistično značilne ($p < 0,05$)

Koncentracijo MDA smo določali v svežih in 28 dni starih rumenjakih. Pri svežih je bila največja koncentracija MDA v rumenjakih jajc kokoši skupine Olive Ex (3,01 nmol/g SS), najmanjša pa pri skupini Pulpa Ex (2,20 nmol/g SS). Pri 28 dneh starih jajcih smo ugotovili, da je bila koncentracija MDA največja v rumenjakih kokoši skupine Pulpa (3,32 nmol/g SS), najmanjša pa v rumenjakih skupine Olive Ex (2,27 nmol/g SS) (preglednica 8). Razlike med skupinami niso bile statistično značilne.

4.5 MAŠČOBNO-KISLINSKA SESTAVA RUMENJAKOV

Pri maščobnih kislinah smo se osredotočili na najbolj pomembne in te so prikazane v preglednici 9.

Preglednica 9: Ocenjena srednja vrednost in standardna napaka MK sestave rumenjakov svežih (zgornja vrstica) in 28 dni starih jajc (spodnja vrstica) v g MK/100g vsote MK

MK	Kont	Vit E	Olive L	Olive Ex	Pulpa	Pulpa Ex
C16:0	19,53 ^{ab} ±0,34 19,51 ^{abcd} ±0,31	18,43 ^a ±0,27 18,49 ^{abd} ±0,24	18,39 ^a ±0,27 18,55 ^{be} ±0,24	19,93 ^b ±0,30 19,94 ^c ±0,27	18,94 ^{ab} ±0,33 18,79 ^{abcd} ±0,29	18,81 ^{ab} ±0,28 18,56 ^{de} ±0,25
C18:0	8,40±0,28 8,50±0,29	8,52±0,22 8,47±0,23	8,91±0,22 8,90±0,23	8,39±0,24 8,38±0,25	8,72±0,27 8,81±0,28	8,83±0,22 8,71±0,23
vsota	39,92±0,91	38,97±0,72	38,47±0,72	38,14±0,79	38,64±0,88	37,76±0,73
C18:1*	39,98±0,87	39,26±0,69	38,75±0,69	38,34±0,76	39,04±0,84	37,68±0,70
C18:2	14,49±0,72	15,12±0,56	15,50±0,56	14,72±0,62	14,86±0,69	15,55±0,58
n-6	14,81±0,68	15,08±0,53	15,19±0,53	14,27±0,59	15,01±0,65	15,74±0,55
C18:3	9,53±0,68	11,13±0,53	10,96±0,53	10,47±0,59	10,72±0,65	11,02±0,54
n-3	9,18±0,61	10,82±0,48	10,85±0,48	10,72±0,53	10,38±0,59	11,20±0,49
EPA	0,19±0,02 0,17±0,01	0,21±0,01 0,20±0,01	0,19±0,01 0,20±0,01	0,19±0,01 0,21±0,01	0,23±0,01 0,22±0,01	0,23±0,01 0,22±0,01
DHA	1,98±0,14 1,97±0,14	1,66±0,11 1,66±0,11	1,75±0,11 1,72±0,11	1,93±0,12 1,91±0,12	1,88±0,13 1,85±0,13	1,87±0,11 1,87±0,11
NMK	28,54±0,43 28,63±0,41	27,59±0,34 27,62±0,32	27,96±0,34 28,11±0,32	29,00±0,38 28,97±0,36	28,31±0,42 28,24±0,40	28,30±0,35 27,94±0,33
ENMK	43,33±0,99 43,29±0,97	42,40±0,77 42,73±0,76	41,62±0,77 41,95±0,76	41,73±0,85 42,02±0,84	41,92±0,94 42,23±0,93	41,00±0,79 40,92±0,78
VNMK	28,13±1,13 28,08±1,07	30,01±0,89 29,65±0,84	30,41±0,89 29,93±0,84	29,26±0,98 29,00±0,93	29,77±1,08 29,53±1,03	30,70±0,91 31,14±0,86
n-3	12,30±0,72	13,62±0,57	13,54±0,56	13,25±0,62	13,51±0,69	13,75±0,58
VNMK	11,91±0,66	13,30±0,52	13,41±0,52	13,52±0,57	13,10±0,63	13,97±0,53
n-6	15,77±0,76	16,33±0,60	16,83±0,60	15,96±0,66	16,20±0,73	16,91±0,61
VNMK	16,13±0,74	16,30±0,58	16,48±0,58	15,44±0,64	16,38±0,71	17,12±0,59
n-6/n-3	1,29±0,08 1,36±0,07	1,20±0,06 1,23±0,06	1,26±0,06 1,24±0,06	1,21±0,06 1,14±0,06	1,20±0,07 1,25±0,07	1,24±0,06 1,24±0,06
LC	3,90±0,20	3,55±0,16	3,73±0,16	3,87±0,17	3,95±0,20	3,91±0,16
VNMK	3,88±0,19	3,53±0,15	3,67±0,15	3,81±0,17	3,90±0,18	3,96±0,15
n-3 LC	2,69±0,19	2,41±0,15	2,49±0,15	2,71±0,16	2,69±0,18	2,64±0,15
VNMK	2,65±0,17	2,39±0,14	2,46±0,14	2,71±0,15	2,63±0,17	2,67±0,14
n-6 LC	1,20±0,07	1,14±0,05	1,25±0,05	1,16±0,06	1,25±0,07	1,26±0,06
VNMK	1,23±0,07	1,14±0,05	1,20±0,05	1,09±0,06	1,27±0,06	1,29±0,05

Kont – kontrolna krma, Vit E – krma z dodatkom 150 IU vit. E, Olive L – krma z dodatkom 1 % oljčnih listov, Olive Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčnih listov, Pulpa – krma z dodatkom 1 % oljčne pulpe, Pulpa Ex – krma z dodatkom ekstrakta iz oljčne pulpe

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

* - vsota izomer C18:1

V rumenjaki je bilo največ izomer oktadecenojske kisline (C18:1), od 37,76 g/100 g MK v skupini Pulpa Ex, do 39,92 g/100 g MK pri Kont. Najmanj je bilo EPA (eikozapentaenojske kisline), pri čemer je bila njena vsebnost skoraj pri vseh skupinah bolj ali manj enaka (0,19 do 0,23 g/100 g MK). Če se osredotočimo na vsote posameznih

skupin maščobnih kislin ugotovimo, da prevladujejo ENMK, katerih je bilo največ v rumenjaku jajc iz skupine Kont (okoli 43 g/100 g MK), najmanj pa v skupini Pulpa Ex (okoli 41 g/100 g MK). Med VNMK je bilo nekoliko več n-6 maščobnih kislin v primerjavi z n-3 VNMK. Pri obdelavi podatkov smo ugotovili statistično značilno razliko (v odvisnosti od jajčne mase znotraj skupine) pri palmitinski kislini med skupinama Vit E in Olive Ex ($p = 0,0160$) ter med skupinama Olive L in Olive Ex ($p = 0,0128$) v svežih jajcih. 28 dni stara jajca pa so se razlikovala med skupinama Vit E in Olive Ex ($p = 0,0087$), Olive L in Olive Ex ($p = 0,0118$) ter med Olive Ex in Pulpa Ex ($p = 0,0142$).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali dodatki oljčnih listov in pulpe ter njihovih ekstraktov vplivajo na proizvodne lastnosti in zdravstveno stanje kokoši, na fizikalne lastnosti kokošjih jajc ter njihovo oksidativno stabilnost, kadar kokoši izpostavimo dejavnikom, ki povzročajo oksidacijski stres.

Izvedli smo prehranski poskus v katerem smo živali izpostavili oksidacijskemu stresu. Živalim smo v krmo dodali 6 % ekstra deviškega lanenega olja, med poskusom pa smo povišali tudi temperaturo v hlevu. Oksidacijski stres smo povzročili z namenom, da bi lahko izmerili kako vplivajo dodatki vitamina E, oljčnih listov, pulpe in ekstraktov iz njih na proizvodne lastnosti živali, na njihovo zdravstveno stanje, fizikalne lastnosti in oksidativno stabilnost jajc.

Laneno olje je bogat vir α – linolenske kisline, ki je prekurzor za nastanek dokozaheksaenojske kisline, katera spada v skupino omega 3 VNMK. Laneno olje, ki smo ga uporabili v našem poskusu je v povprečju vsebovalo 71,19 % VNMK, od tega kar 55,6 % omega 3 VNMK, razmerje med omega 3 in omega 6 VNMK pa znaša 1:4 (Voljč, 2012). V skupini omega 3 MK sta EPA in DHA pogojno esencialni MK, α – linolenska kislina pa je esencialna. Esencialne kisline organizem potrebuje, vendar pa so zaradi svoje kemijske sestave bolj podvržene oksidacijskim procesom in lahko v primeru večjega zauživanja povzročijo oksidacijski stres. Kljub temu znanstveniki laneno seme in olje v raziskavah uporabljajo za obogatitev mesa (López- Ferrer in sod., 2001) in jajc z omega 3 VNMK, ter za izboljšanje razmerja med omega 3 in omega 6 MK (Ferrier in sod., 1995). Jajca obogatena z omega 3 maščobnimi kislinami predstavljajo dober vir le-teh za porabnika, z zauživanjem takšnih jajc pa pozitivno vplivamo na zdravje. Omega 3 MK zmanjšujejo tveganje za razvoj srčnih bolezni, zavirajo rast in razvoj raka na prostati in dojkah, potrebne pa so tudi za normalen razvoj možganov in razvoj oči pri zarodku (Lewis in sod., 2000).

Kot prehranski dodatek smo uporabili oljčne liste in pulpo ter ekstrakta iz njih. Prehrana živali nima samo vpliva na zdravje in počutje živali ampak lahko z njo vplivamo tudi na kakovost njihovih proizvodov ter s tem posredno na zdravje porabnika in na zaščito okolja. Prav zaradi tega zadnja leta porabniki dajejo večjo prednost naravnim dodatkom pred sintetičnimi. Oljčni listi in pulpa so naravni dodatki, ki so proizvod stranske proizvodnje oljčnega olja. Liste pridobivajo predvsem v procesu obrezovanja dreves, nekaj malega pri ločevanju in čiščenju oliv, pulpa pa je ostanek, ki ga dobimo po odstranitvi koščic iz tropin (Molina in Nefzaoui, 1996). Vsebujejo veliko elementov v sledovih (selen, cink, krom, železo, vitamin C, β -karotene, aminokisline), pomembni pa so predvsem zaradi vsebnosti fenolnih spojin (oleuropeina, tirosoila, hidroksitirosoila, rutina, luteolina, apigenina, katehina in drugih), ki pozitivno vplivajo na zdravje in počutje živali ter ljudi (Braun, 2005). Pred uporabo smo oljčne liste in pulpo posušili ter zmleli. Paiva-Martins in sod. (2009) navajajo, da so tako pripravljeni dodatki kemično bolj stabilni tudi po 30 dneh shranjevanja pri sobni temperaturi. Po njihovem mnenju sušenje povzroči deaktivacijo

oksidativnih in hidrolitičnih encimov, ki bi v nasprotnem primeru uničili antioksidativne komponente in s tem spremenili kemično sestavo dodatka.

Kot dodatek smo uporabili tudi vitamin E (α – tokoferil acetat), ki je topen v maščobah in poznan kot odličen antioksidant, ki ščiti celice in tkiva pred negativnimi vplivi oksidacije. Kokoši ga v presnovi ne morejo sintetizirati, zato je nujno potrebno, da ga dobijo z zauživanjem krme. Različne raziskave dokazujejo njegov pozitiven učinek na zmanjšanje peroksidacije lipidov v jajcih in mesu, poleg tega varuje celice, ki sodelujejo pri imunskem odzivu (limfociti, makrofagi, plazemske celice) (Puthongsiriporn in sod. 2001). Pri nas smo ga poskusnim skupinam Kont, Olive L, Olive Ex, Pulpa in Pulpa Ex dodali 10 IU/kg krme po priporočilih NRC (Nutrient Requirements of poultry, 1994), za skupino Vit E pa 150 IU/kg krme. Laneno olje, ki smo ga uporabili v krmi za piščance, vsebuje velik delež VNМК, ki so oksidativno zelo nestabilne. Zato je potrebno zagotoviti v krmi zadostno količino antioksidantov, najpomembnejši antioksidant za zaščito VNМК je vitamin E. V literaturi lahko najdemo različna priporočila, koliko vitamina E je potrebno za zaščito pred oksidativnim stresom, ki je posledica povečanega vnosa VNМК, v naši raziskavi smo upoštevali priporočila po Muggli-ju (1994).

Živali v intenzivni reji so zelo izpostavljene stresu, kar lahko vpliva tako na zauživanje krme, prirejo kot tudi na počutje živali. Med dejavnike stresa prištevamo tudi oksidacijski stres, ki tudi lahko vpliva na proizvodne rezultate in slabše zdravstveno stanje živali (Lykkesfeldt in Svendsen, 2007). V našem poskusu so bile živali zdrave in niso kazale nikakršnih bolezenskih znakov.

V predposkusnem obdobju smo živali razdelili v šest poskusnih skupin, pri katerih smo spremljali nesnost in zauživanje krme. Na podlagi teh dveh lastnosti smo izločili kokoši, ki so zaužile manj krme in znesle malo jajc. Skupine smo tako izenačili, da med njimi ni bilo razlik, ki bi lahko vplivale na dobljene rezultate.

Živali smo krmili enkrat dnevno s pripadajočo krmo po skupinah. Krmljene so bile po volji. Rezultati zauživanja krme so pokazali manjše razlike med skupinami, vendar te niso bile statistično značilne. Vse živali so vsakodnevno dobile enako količino krme. Razlike so najverjetneje posledica razlik v količini zaužite krme med kokošmi. Pri obdelavi podatkov smo ugotovili, da so razlike v zauživanju krme na meji statistične značilnosti med skupinama Pulpa in Pulpa Ex. Ugotovili smo tudi povezavo med začetno in končno maso živali, pri čemer so bile kokoši, ki so že v začetku lažje, lažje tudi na koncu poskusa.

Pri proizvodnih lastnosti živali smo spremljali nesnost kokoši, maso jajc in dnevno zneseno količino jajčne mase (g/dan). Ugotovili smo, da pri posameznih lastnostih med skupinami ni statistično značilnih razlik. Iz tega smo sklepali, da dodatek oljčnih listov, pulpe in ekstrakta iz njih nima vpliva na te tri proizvodne lastnosti. Podobno sta v raziskavi ugotovila Balevi in Coskun (2000). Dodatek oljčnega olja ni vplival na nesnost in zauživanje krme kokoši, prav tako ni imel vpliva na maso in specifično težo jajc. Oljčno pulpo so v krmo za kokoši nesnice dodajali Zarei in sod. (2011) pri čemer so ugotovili, da dodatek skozi celotno poskusno obdobje ni imel vpliva na prirejo jajc, jajčno maso in zauživanje krme, se je pa nekoliko povečala masa jajc.

Za ugotavljanje oksidacijskega stresa v organizmu smo merili koncentracijo MDA v krvni plazmi kokoši. MDA je sekundarni produkt, ki nastane pri oksidaciji lipidov, zato ga lahko uporabimo kot učinkovit marker s katerim lahko zasledimo lipidno peroksidacijo v bioloških vzorcih. Rezultati so pokazali, da je bila največja koncentracija MDA v plazmi pri Kont skupini, pri vseh ostalih skupinah je bila koncentracija manjša. Kljub temu, da so imele skupine z dodatkom nekoliko manjšo koncentracijo MDA v plazmi med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik. Sahin in sod. (2010) so ugotovili, da je dodajanje resveratrola v krmo (ki ga najdemo predvsem v grozdju in deluje kot antioksidant) statistično značilno vplivalo na zmanjšanje koncentracije MDA v krvni plazmi in povečanje koncentracije vitamina E pri japonskih prepelich.

Oksidacijski stres ne povzroča samo nastajanje MDA v organizmu, ampak lahko povzroči tudi poškodbe DNK. Zanimalo nas je, kako dodatki oljčnih listov, pulpe in ekstraktov iz njih vplivajo na poškodbe DNK limfocitov. Za ovrednotenje poškodb smo uporabili metodo kometnega testa, ki je natančna, občutljiva ter dokaj enostavna. Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili, smo ugotovili, da se obseg poškodb DNK med skupinami statistično ni razlikoval. Glede na odstotek DNK v glavi sta največje poškodbe DNK imeli skupini Vit E (76,41 %) in Pulpa (76,44 %), najmanjše pa skupini Olive Ex (80,58 %) in Pulpa Ex (80,56 %). Fabiani in sod. (2008) so v raziskavi želeli ugotoviti kako vpliva oljčno olje in njegove sestavine na zaščito DNK celic človeka pred oksidacijo. Rezultati *in vitro* raziskave so pokazali, da ekstrakt iz deviškega oljčnega olja zmanjšuje poškodbe DNK v enojedrnih krvnih celicah periferne krvi in promielocitnih celicah, povzročene z vodikovim peroksidom. V našem poskusu nismo ugotovili statistično značilnega vpliva dodatkov na poškodbe DNK limfocitov.

V našem poskusu so nas poleg proizvodnih lastnosti in oksidativne zaščite živali zanimale tudi fizikalne lastnosti jajc. Z merjenjem notranjih lastnosti lahko ovrednotimo kakovost jajca in na podlagi tega ugotovimo kakšne spremembe se dogajajo v času shranjevanja jajc, medtem ko so zunanje lastnosti pomembne predvsem za transport od proizvajalca do ponudnika in z vidika privlačnosti porabnikom. Pri indeksu oblike (IO) jajc, višini beljaka, HU, barvi rumenjaka, masi in debelini jajčne lupine nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Pri barvi rumenjaka so bile razlike minimalne, kar je bila verjetno posledica dodajanja barvila Capsantal 30 v krmo za kokoši. Vpliv dodajanja naravnih barvil v krmo so preučevali Galobart in sod. (2004) pri čemer so ugotovili, da umiljenje produktov paprike in ognjiča izboljša barvo rumenjaka pri namiznih jajcih in jajcih za industrijsko uporabo. Pri masi in debelini jajčne lupine nismo ugotovili statistično značilnih razlik med skupinami.

Poleg debeline jajčne lupine smo za ugotavljanje njene trdnosti in odpornosti na udarce merili koliko sile je potrebno, da jajce počí. Pri rezultatih maksimalne sile potrebne, da se jajce stre, smo ugotovili med skupinama Olive L in Pulpa statistično značilno razliko. Glede na raziskave Rataj in sod. (1999), lahko do nevidnih poškodb jajčne lupine pride zaradi padca in kotaljenja jajca iz kletke na tekoči trak in jajce v poskusu lahko hitreje počí. Odstotek poškodb je odvisen od naklona tal v kletki in od dolžine poti, po kateri se mora jajce skotaliti. Večji kot je naklon in daljša kot je pot, večjo hitrost pridobiva jajce in z večjo silo udari ob trak. Pri nas nismo zaznali, da bi naklon tal v kletkah imel vpliv na obseg poškodb jajčnih lupin, saj v času poskusa nismo imeli jajc s počeno oziroma

poškodovano lupino. Vpliv ima tudi masa jajca. Težja jajca pri nižjem naklonu dna kletke so bila bolj poškodovana. V raziskavi Rataj in sod. (1999) navajajo tudi, da je lahko vzrok za razlike v maksimalni potrebni sili, da se jajce stre, tudi v debelini jajčne lupine. V njihovi raziskavi so bile kokoši v kontrolni skupini krmljene s konvencionalno krmo za nesnice, medtem ko so bile ostale skupine krmljene s krmno mešanico, ki je vsebovala manjšo količino beljakovinskih krmil, sojinih tropin in ribje moke. Živali iz kontrolne skupine so imele za 0,001 mm debelejšo lupino in posledično s tem je bila potrebna tudi večja maksimalna sila. V našem poskusu nismo ugotovili statistično značilnega vpliva dodatkov oljčnih listov, pulpe in ekstraktov iz njih na debelino jajčne lupine.

Barva jajčne lupine je eden od pomembnih dejavnikov na podlagi katerega se porabniki odločajo za nakup. Zajec (1995) je z anketo v raziskavi ugotovila, da se kar 65 % porabnikov v Sloveniji odloča za jajca z rjavo lupino. Statistično značilne razlike pri barvi jajčne lupine smo ugotovili med skupinama Olive Ex in Pulpa ($p = 0,0099$), pri čemer je imela skupina Olive Ex najtemnejšo lupino, Pulpa pa najsvetlejšo. Holcman in sod. (2004) navajajo, da na barvo lupine vpliva predvsem dednost. Poleg te navajajo tudi druge vplive kot so starost kokoši, razne bolezni, zdravila, zadrževanje jajca v maternici in nesnost. V našem poskusu so živali bile mlade, na vrhuncu nesnosti, zdrave in niso prejemale zdravil, katera bi lahko vplivala na rezultate poskusa.

Oblika jajca, kakovost ter izgled lupine so lastnosti, ki jih lahko ocenimo že na pogled. Če želimo ugotoviti kakšna je notranja kakovost jajca je le - tega potrebno streti. Pri postopku določanja fizikalnih lastnosti smo pri večini jajc opazili, da ta vsebujejo krvne ali mesne pege. Po navedbah Holcman in sod. (2004) na nastanek teh vplivajo različni vplivi, med njimi tudi prehrana (pomanjkanje vitamina A in K, vsebnost toksinov v krmi zaradi plesni), stres ter sistem osvetlitve, ki pa ga mi v našem primeru nismo spremenili.

Poleg merjenja barve rumenjaka pri svežih jajcih, smo z kromometrom Minolta merili tudi barvo rumenjaka v kuhanih jajcih, pri čemer smo določili parametre L, a in b. Parameter L določa svetlost, pri čemer višja vrednost pomeni svetlejšo živilo. Parameter a nam kaže intenzivnost rdeče barve. Kadar je vrednost pozitivna je živilo bolj rdeče, če pa je vrednost negativna se kaže zeleni pigment. Parameter b v pozitivnem območju predstavlja intenzivnost rumene barve, v negativnem območju pa intenzivnost modre barve (Šenk, 2006). Rezultati so tako kot pri svežih jajcih pokazali, da med posameznimi skupinami ni razlik, kar je pričakovano, saj smo v krmo za kokoši dodajali barvilo Capsantal 30.

V naši raziskavi smo merili pH svežih in 28 dni starih jajc. Rezultati so pokazali, da se s staranjem zvišuje tako pH beljaka kot tudi rumenjaka. Ob ovipoziciji pH rumenjaka znaša nekje okoli 6, medtem ko je pH beljaka nekoliko višji in sicer okoli 7,6. Vzrok povečanja pH rumenjaka in beljaka v času staranja je posledica sprememb perivitelinske membrane, ki postane predvsem bolj elastična in šibka. Povečanje pH beljaka je predvsem na račun izhajanja ogljikovega dioksida iz jajca (Brake in sod., 1997).

Jajce je živilo katerega sestavo lahko do neke mere spreminjamo s prehrano kokoši nesnic. Po sedaj znanih raziskavah ga lahko z dodatki v krmo za kokoši obogatimo z omega 3 VNMK, selenom, jodom, vitaminoma C in E. S tem jajce postane pomemben vir teh snovi za porabnika, prav tako pa postane funkcionalno živilo, kar pomeni, da ima zaradi

vsebnosti biološko aktivnih snovi pozitiven vpliv na zdravje in počutje porabnika ter preprečuje nastanek nekaterih bolezni. Zaužívanje jajc, obogatenih z omega 3 VNMK lahko pozitivno vpliva na zmanjšanje pojavljanja bolezni srca in ožilja, na nastanek rakavih obolenj, avto imunskih in drugih bolezni (Surai in Sparks, 2001). Poleg vpliva na zdravje porabnika je pomembna tudi njihova oksidativna stabilnost. Oksidativna stabilnost jajca je pomembna predvsem z vidika prehranske vrednosti. Jajce, ki je oksidativno slabo zaščiteno, se med skladiščenjem hitreje kvari, kar vpliva na senzorične in tehnološke lastnosti živila, peroksidacija nenasičenih MK pa lahko ima negativen vpliv na zdravje porabnika (Surai in sod., 2003). Za določanje oksidativne stabilnosti jajc smo merili koncentracijo MDA v svežih in 28 dni starih rumenjakih jajc. Rezultati so pokazali, da ni bilo statistično značilnih razlik med posameznimi skupinami. Jajce predstavlja varno okolje in neke vrste inkubator za normalen razvoj in rast zarodka, zato je pomembno, da je zavarovano pred oksidacijo, saj bi ta negativno vplivala nanj v času razvoja in tudi po izvalitvi. Ptice delež antioksidantov, ki jih zaužijejo s krmo, v procesu nastanka locirajo v jajce (Møller in sod., 2008). Botsoglou in sod. (2012) so kokošim nesnicam v krmo dodali 10 g oljčnih listov/kg krme ali 200 mg α -tokoferil acetata/kg krme. Pri tem so, enako kot mi, ugotovili, da se začetna koncentracija MDA ni spremenila ne glede na dodatek v krmo niti glede na čas skladiščenja omega 3 obogatenih jajc (20 ali 40 dni pri 4° C). Pri daljšem skladiščenju (60 dni) se je povečala koncentracija MDA pri kontrolni skupini in skupni z dodatkom oljčnih listov (pri čemer je bilo povečanje večje pri kontrolni skupini), medtem ko je pri skupini z dodatkom α - tokoferil acetata skozi celotno obdobje ostala nespremenjena. Na podlagi rezultatov so ugotovili, da dodatek oljčnih listov v krmo zavira nastanek sekundarne lipidne oksidacije, da je zmanjšanje obsega večje kot pri kontrolni skupini, vendar še vedno manjše v primerjavi s skupino, kateri so v krmo dodali α -tokoferil acetat. Zmanjšanje obsega sekundarne lipidne oksidacije so pripisali sestavinam z antioksidativnim delovanjem v oljčnih listih, ki so bile preko metabolizma prenesene v jajce in so bile tam skladiščene.

V poskusu smo s plinskim kromatografom določili maščobno – kislinsko sestavo svežih in 28 dni starih rumenjakov. Namen določanja je bil predvsem ugotoviti ali je imel dodatek oljčnih listov, pulpe in ekstraktov iz njih vpliv na maščobno-kislinsko sestavo rumenjaka. Maščobe so sestavljene iz MK, ki imajo najpogostejše nerazvejano verigo in sodo število ogljikovih atomov. V živilih se pojavljajo predvsem MK s 16, 18, 20 in 22 ogljikovimi atomi. Najbolj pomembna skupina maščobnih kislin so VNMK, saj so esencialne in jih je potrebno v organizem vnesti s prehrano, poleg tega imajo pozitiven vpliv na preprečevanje bolezni srca in ožilja (zmanjšujejo koncentracijo LDL holesterola), zmanjšajo možnost za nastanek rakavih obolenj, potrebne so za razvoj možganov, živcev in očesne mrežnice pri zarodkih (Kure, 2006). Pri rezultatih analize maščobnih kislin svežih in 28 dni starih rumenjakov smo se osredotočili na prehransko najbolj pomembne kisline. Največ je bilo v rumenjakihi prisotne oleinske, palmitinske in linolenske kisline, najmanj pa DHA in EPA. Givens in Gibbs (2008) sta navedla, da bi moral odrasel človek v Veliki Britaniji dnevno pokriti potrebe po 200 mg DHA in EPA. V našem poskusu so jajca v povprečju vsebovala okoli 2,2 % DHA + EPA. Če to vrednost preračunamo na 60 g jajce bi to vsebovalo okoli 120 mg DHA in EPA, kar pomeni, da bi z zaužitjem enega ali dveh obogatenih jajc na dan lahko pokrili priporočene potrebe po teh dveh MK. Lewis in sod. (2000) so ugotovili, da lahko z dodatkom lanenega olja v krmo za kokoši nesnice proizvedejo jajce, ki vsebuje 30-krat večjo koncentracijo linolenske kisline in do 4-krat večjo koncentracijo DHA v

primerjavi z navadnim jajcem. Tudi Scheideler in Froning (1996) sta v krmo dodajala laneno olje. S tem sta jajca obogatila z omega 3 VNMK, katera so vsebovala skoraj 6-krat več VNMK in linolenske kisline ter 5-krat več DHA kot navadno jajce, zožalo se je tudi razmerje med omega 6 in omega 3 VNMK, ki je pri navadnih jajcih znašalo 13:1, pri obogatenih pa samo 2,6:1.

Podjetje Jata – Emona pri nas proizvaja in na trgu ponuja jajca pod oznako Omega Plus, ki jih obogatijo tako, da v krmo za kokoši nesnice dodajajo laneno seme, jod in vitamin E. V primerjavi z navadnimi (neobogatnimi) jajci, imajo ta jajca nekoliko bolj ugodno maščobno-kislinsko sestavo in jih zato štejejo med funkcionalna živila (Specifikacija za kokošja jajca Omega plus (višja kakovost), 2008). Če primerjamo sestavo jajc iz obeh poskusov v prehransko najbolj pomembnih MK, lahko ugotovimo, da imajo jajca iz našega poskusa nekoliko večjo koncentracijo EPA, omega 6 in omega 3 MK, boljše je bilo razmerje med njimi, ter da so imela ta jajca podobno koncentracijo DHA in ENMK in nekoliko manj NMK.

V naši raziskavi smo v osnovno mešanico za kokoši nesnice vključili 6 % lanenega olja. S tem smo vplivali na maščobno - kislinsko sestavo krme, pri čemer so prevladovala VNMK (približno 67 g/100 g vsote MK), znotraj njih pa je bilo nekoliko več omega 3 VNMK (42 g/100 g vsote MK) v primerjavi z omega 6 VNMK (25 g/100 g vsote MK). Pri maščobno – kislinski sestavi rumenjakov svežih in 28 dni staranih jajc smo ugotovili, da je največ ENMK, v skupini VNMK pa so prevladovala omega 6 VNMK. V svežih jajcih sta skupini Vit E in Pulpa imeli najožje razmerje med omega 6 in omega 3 MK (1,20:1), medtem ko je imela skupina Kont najširše (1,29:1). Skupina Kont je tudi pri 28 dni starih jajcih imela najširše razmerje (1,36:1), najožjega pa je imela skupina Olive Ex (1,14:1). Podobno so ugotovili tudi Botsoglou in sod. (2012). Živali kontrolne skupine so bile krmljene z osnovno krmo, ki je temeljila na koruzi in soji z dodatkom 40 g/kg lanenega olja. Ostali dve poskusni skupini sta imeli isto krmno mešanico, le da sta poleg lanenega olja imeli še dodatek 10 g posušenih oljčnih listov/kg krme (OL10) in 200 mg α – tokoferil acetata/kg krme (TOC). Jajca so shranjevali 20, 40 in 60 dni pri 4° C. Pri svežih jajcih je tako kot pri nas bilo največ palmitinske, stearinske, oleinske, linolne in α – linolenske kisline, najmanj pa DHA in EPA. Prav tako je bilo pri VNMK nekoliko več omega 6 VNMK. Kljub nekoliko večji količini α – linolenske kisline, ki je prekursor za dolgoveržne omega 3 VNMK, je bila vsebnost DHA in EPA majhna. Po njihovem mnenju je to lahko posledica nasičenosti encimov desaturaze, ki sodeluje v tej pretvorbi, poleg tega Aymond in Van Elswyk (1995) navajata, da so imele kokoši, ki so bile krmljene s krmo z dodatkom lana manjšo zmožnost pretvorbe α – linolenske kisline v DHA in EPA. Po 60 dneh shranjevanja so ugotovili, da se je pri kontrolni skupini zmanjšala koncentracija VNMK (tako omega 3 kot omega 6, zato se je izboljšalo razmerje med njima), vendar pa nekoliko povečala koncentracija ENMK. Za razliko od kontrolne skupine pa dodatka oljčnih listov in α - tokoferil acetata po 60 dneh shranjevanja nista imela vpliva na MK sestavo rumenjaka.

Z dodajanjem lanenega olja v krmo kokoši nesnic povečamo prehransko vrednost jajc. Jajca nesnic v poskusu so vsebovala 940 do 1100 mg α - linolenske kisline in 175 do 205 mg EPA+DHA v 100 g jajca, oziroma 610 do 700 mg α - linolenske kisline in 115 do 130 mg EPA + DHA v 100 kcal, kar jih uvršča med živila, ki jih lahko opremimo z naslednjimi prehranskimi in zdravstvenimi trditvami:

- vir maščobnih kislin omega 3 (vsebujejo vsaj 0,3 g α -linolenske kisline ali 40 mg EPA + DHA v 100 g in v 100 kcal),
- velika vsebnost maščobnih kislin omega 3 (vsebujejo vsaj 0,6 g α -linolenske kisline ali 80 mg EPA + DHA v 100 g in v 100 kcal)
- velika vsebnost nenasičenih maščob (vsaj 70 % maščobnih kislin je nenasičenih in zagotavljajo več kot 20 % energijske vsebnosti izdelka) (Uredba Komisije EU, 116/2010)
- α - linolenska kislina prispeva k vzdrževanju normalne ravni holesterola v krvi (vsebujejo vsaj 0,3 g α -linolenske kisline ali 40 mg EPA + DHA v 100 g in v 100 kcal)
- DHA ima vlogo pri delovanju možganov (vsebujejo vsaj 40 mg DHA na 100 g in na 100 kcal)
- DHA ima vlogo pri ohranjanju vida (vsebujejo vsaj 40 mg DHA na 100 g in na 100 kcal)
- EPA in DHA imata vlogo pri delovanju srca (vsebujejo vsaj 0,3 g α -linolenske kisline ali 40 mg EPA + DHA v 100 g in v 100 kcal) (Uredba Komisije EU, 432/2012).

Dodajanje oljčnih listov, pulpe in ekstrakta iz njih v krmo kokoši nesnic ni imelo vpliva na MK sestavo rumenjakov svežih jajc, zato med posameznimi poskusnimi skupinami ni bilo statistično značilnih razlik. Podobno kot pri svežih jajcih je bilo tudi v rumenjakih 28 dni starih jajc. Razlik med posameznimi poskusnimi skupinami ni bilo. Podobno so ugotovili Botsoglou in sod. (2012). Abd in sod. (2011) so v poskusu v krmo za kokoši nesnice dodajali različno količino oljčne pogače (0 g, 28,5 g in 57 g/kg), ki je bogata z ostanki olja. Pri tem so ugotovili, da je dodatek 28,5 in 57 g/kg krme zmanjšal koncentracijo NMK v rumenjaku jajc, prav tako je dodatek 28,5 g/kg zmanjšal koncentracijo ENMK, medtem ko jo je dodatek 57 g/kg povečal za 17,3 %. Dodatek oljčne pogače je vplival tudi na povečanje koncentracije vsote VNMK, povečala se je koncentracija omega 6 in omega 3 VNMK, pri čemer se je v primerjavi s kontrolno skupino zožilo razmerje med njima. V naši raziskavi smo ugotovili, da se pojavljajo statistično značilne razlike med skupinami v koncentraciji palmitinske kisline. Te se pojavljajo v odvisnosti od jajčne mase znotraj skupine tako pri svežih, kot pri 28 dni starih jajcih.

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili z raziskavo lahko podamo naslednje sklepe:

- Z dodatkom lanenega olja v krmo in s povišano temperaturo v hlevu smo spodbudili nastanek oksidativnega stresa pri kokoših.
- Dodatek vitamina E, oljčnih listov, pulpe in ekstrakta iz njih ni imel vpliva na proizvodne lastnosti kokoši.
- Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji MDA v plazmi ter poškodbah DNK levkocitov. Na podlagi tega lahko sklepamo, da dodatek vitamina E, oljčnih listov, pulpe in ekstrakta iz njih ni imel vpliva na oksidativno zaščito živali.
- Pri fizikalnih lastnostih jajc smo ugotovili statistično značilne razlike v barvi jajčne lupine in maksimalni sili potrebni, da se jajce stre. Pri ostalih lastnostih vpliva ni bilo.
- Dodajanje vitamina E, oljčnih listov, pulpe in ekstrakta iz njih ni imelo vpliva na koncentracijo MDA v svežih in 28 dni starih rumenjaki.
- Dodatek vitamina E, oljčnih listov, pulpe in ekstrakta iz njih prav tako niso imeli vpliva na MK sestavo svežih in 28 dni starih jajc.
- Lahko zaključimo, da je krma že sama po sebi ali zaradi dodatka 6 % ekstra deviškega lanenega olja, ki prav tako vsebuje antioksidante, dovolj zaščitena ali oksidacijski stres ni bil izzvan v dovolj veliki meri in zato dodatki vitamina E, oljčnih listov, pulpe in ekstraktov iz njih niso imeli vpliva.

6 POVZETEK

V naši raziskavi nas je zanimalo ali imajo dodatki oljčnih listov, pulpe in ekstraktov iz njih vpliv na proizvodne lastnosti kokoši nesnic, na antioksidativno zaščito živali ter na fizikalne lastnosti in oksidativno stabilnost svežih in 28 dni starih jajc. Za ugotavljanje učinkovitosti dodatkov smo živali izpostavili oksidacijskem stresu, katerega nastanek smo spodbudili z dodatkom 6 % ekstra deviškega lanenega olja v krmo in s spremembo temperature v hlevu v času poskusa. Rezultate smo prav tako primerjali s skupino, ki je imela dodatek vitamina E, katerega mnoge raziskave navajajo kot učinkovito sredstvo za zaščito pred oksidacijskim stresom.

V raziskavo smo vključili štiriindevetdeset kokoši nesnic, težkih povprečno 2196 g in starih 40 tednov. Živali smo individualno vhljevali, kar nam je omogočalo individualno krmljenje in zbiranje jajc. Za potrebe poskusa smo živali razdelili v 6 skupin, vsaka skupina je dnevno dobila svojo krmo. Osnovni obrok je bil pri vseh živalih enak, razlikoval se je samo na račun dodatka. Osnovnemu obroku je bil glede na skupino dodan različen dodatek: skupini Kont ni bilo dodano ničesar, skupina Vit E je imela dodatek 150 IU/kg krme vitamina E, skupina Olive L je imela dodatek 1 % posušenih in zmletih oljčnih listov, Olive Ex etanolni ekstrakt iz oljčnih listov, skupina Pulpa dodatek 1 % posušene in zmlete oljčne pulpe in skupina Pulpa Ex ekstrakt iz oljčne pulpe. Poskusno obdobje je trajalo 4 tedne, pri čemer so se prvi teden kokoši privajale na sistem vhljevitve in so bile vse krmljene samo s kontrolno krmo. Tako v predposkusnem kot v poskusnem obdobju smo beležili nesnost, enkrat tedensko smo pobrali ostanke krme. Živali smo pred začetkom in koncem poskusa stehali, vsakodnevno pa smo tudi pobirali in tehtali jajca za potrebe kasnejših analiz. Konec poskusa smo živali žrtvovali in jim pri tem odvzeli kri. Vpliv dodatkov na zdravstveno stanje živali smo ovrednotili z določanjem koncentracije MDA v krvni plazmi ter z določanjem poškodb DNK levkocitov s kometnim testom. Pri jajcih smo izmerili fizikalne lastnosti ter določili koncentracijo MDA in MK v rumenjakih svežih in 28 dni starih jajc.

Na podlagi pridobljenih rezultatov smo ugotovili, da dodatek ni imel vpliva na proizvodne lastnosti živali. Glede na koncentracije MDA v krvni plazmi in poškodbe DNK levkocitov smo ugotovili, da dodatek vitamina E, oljčnih listov, pulpe in ekstrakta iz njih prav tako ni imel vpliva na zdravstveno stanje živali, saj ni bilo statistično značilnih razlik med skupinami. Pri fizikalnih lastnostih smo statistično značilne razlike ugotovili pri barvi jajčne lupine in pri maksimalni potrebni sili, da se jajce stre, medtem ko jih pri ostalih lastnostih ni bilo. Dodatek ni imel vpliva na oksidativno stabilnost jajc, saj ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji MDA v rumenjakih tako svežih, kot tudi 28 dni starih jajc, prav tako razlik ni bilo v maščobno – kislinski sestavi rumenjaka.

Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da je krma najverjetneje že sama po sebi ali zaradi dodatka 6 % ekstra deviškega lanenega olja, ki vsebuje antioksidante, dovolj zaščiten in zato dodatki v krmo niso imeli vpliva na proizvodne lastnosti, zdravstveno stanje nesnic, fizikalne lastnosti in oksidativno stabilnost njihovih jajc.

7 VIRI

- Abd L. D., El Samee, Hashish S. M. 2011. Olive cake in laying hen diets for modification of yolk lipids. *Journal of agricultural science & technology A*, 1: 415
- Aruoma O.I. 1998. Free Radicals, Oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75: 199- 212
- Aymond W. M., Van Elswyk M. E. 1995. Yolk thiobarbituric acid reactive substances and n-3 fatty acids in response to whole and ground flaxseed. *Poultry science*, 74: 1358-1394
- Balevi T., Coskun B. 2000. Effects of some dietary oils on performance and fatty acid composition of eggs in layers. *Revue de médecine vétérinaire*, 151, 8-9: 847-854
- Block G., Dietrich M., Norkus E., P., Morrow J. D., Hudes M., Caan B., Packer L. 2002. Factors associated with oxidative stress in human populations. *American journal of epidemiology*, 156, 3: 274-285
- Botsoglou E., Govaris A., Christaki E., Botsoglou N. 2010. Effect of dietary olive leaves and/or α - tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food chemistry*, 121: 17-22
- Botsoglou E., Govaris A., Fletouris D., Botsoglou N. 2012. Lipid oxidation of stored eggs enriched with very long chain n-3 fatty acids, as affected by dietary olive leaves (*Olea europea L.*) or α - tocopheryl acetate supplementation. *Food chemistry*, 134: 1059-1068
- Bourre J.M., Galea F. 2006. An important source of omega- 3 fatty acids, vitamins D and E, carotenoids, iodine and selenium: a new natural multi- enriched egg. *The journal of nutrition, health & aging*, 10: 371-376
- Brake J., Walsh T.J., Benton C.E.JR., Petitte J.N., Meijerhof R., Peñalva G. 1997. Egg handling and storage. *Poultry science*, 76: 144-151
- Braun L. 2005. Olive-leaf extract *Olea Europea*. *Journal of complementary medicine*, 4, 3: 69-73
- Christaki E. V., Bonos E. M. Florou- Paneri P.C. 2011. Comparative evaluation of dietary oregano, anise and olive leaves in laying japanese quails. *Brazilian journal of poultry science*, 13, 2: 97-101
- Ciftci M., Ertas N., Güler T. 2005. Effects of vitamin E and vitamin C dietary supplementation on egg production and egg quality of laying hens exposed to a chronic heat stress. *Revue de médecine vétérinaire*, 156: 107-111
- Daghir N. J., 2009. Nutritional strategies to reduce heat stress in broilers and broiler breeders. *Lohmann information*, 44,1: 6-15
- David Peebles E., Brake J. 1985. Relationship of dietary ascorbic acid to broiler breeder performance. *Poultry science*, 64: 2041-2048
- Devasagayam T.P.A, Tilak J.C, Bloor K.K, Sane K.S, Ghaskadbi S.S, Lele R.D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of physicians of India*, 54: 794- 804
- Dimitrios B. 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in food science & technology*, 17: 505–512
- Doymaz I., Gorel O., Akgun N.A. 2004. Drying characteristics of the solid by-product of olive oil extraction. *Biosystems engineering*, 88, 2: 213–219
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of

- LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), "anti-inflammatory properties" (ID 1882), "contributes to the upper respiratory tract health" (ID 3468), "can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract" (3779), and "contributes to body defences against external agents" (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA journal, 9, 4: 2033
- Fabiani R., Rosignoli P., De Bartolomeo A., Fuccelli R., Servili M., Montedoro G., F., Morozzi G. 2008. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *The journal of nutrition*, 138: 1411–1416
- 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
- Ferrier L. K., Caston L. J., Leeson S., Squires J., Weaver B. J., Holub B. J. 1995. α -linolenic acid- and docosahexaenoic acid-enriched eggs from hens fed flaxseed: influence on blood lipids and platelet phospholipid fatty acids in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 62: 81-86
- Flora S.J.S., Mittal M., Mehta A. 2008. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian journal of medical research*, 128: 501-523
- Franchini A., Sirri F., Tallarico N., Minelli G., Iaffaldano N., Meluzzi A. 2002. Oxidative stability and sensory and functional properties of eggs from laying hens fed supranutritional doses of vitamins E and C. *Poultry science*, 81: 1744–1750
- Frankič T., Voljč M., Rezar V., Salobir J. 2008. Rastlinski ekstrakti v prehrani živali. V: Zbornik predavanj 17. posvetovanja o prehrani domačih živali "Zadravčevi – Erjavčevi dnevi", Radenci, 13. - 14. november 2008. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarski zavod: 10-22
- Frankič T., Salobir J. 2007. Antioksidanti v prehrani živali: pomen za živali in porabnike. V: Zbornik predavanj 16. posvetovanja o prehrani domačih živali "Zadravčevi – Erjavčevi dnevi", Radenci, 8. - 9. november 2007. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarski zavod: 27-40
- Frei B. 2004. Efficacy of dietary antioxidants to prevent oxidative damage and inhibit chronic disease. *American society for nutritional sciences. Journal of nutrition*, 134: 3196S–3198S
- Galobart J., Sala R., Rinco'n-Carruyo X., Manzanilla E. G., Vila B., Gasa J. 2004. Egg yolk color as affected by saponification of different natural pigmenting sources. *The journal of applied poultry research*, 13: 328-334
- Givens D. I., Gibbs R. A. 2008. Current intakes of EPA and DHA in European populations and the potential of animal - derived foods to increase them. *Proceedings of The nutrition society*, 67: 273–280
- Govaris A., Botsoglou E., Moulas A., Botsoglou N. 2010. Effect of dietary olive leaves and rosemary on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. *South African journal of animal science*, 40, 2: 145-155
- Grashorn M. A. 2007. Functionality of poultry meat. *The journal of applied poultry research*, 16: 99–106

- Güçlü B.K., Uyanık F., İşcan K.M. 2008. Effects of dietary oil sources on egg quality, fatty acid composition of eggs and blood lipids in laying quail. *South African journal of animal science*, 38, 2: 91-100
- 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
- Holcman A. 1990. Genetski parametri za nekatere lastnosti jajc. Doktorska disertacija. Domžale, Biotehniška fakulteta, VTOZD za živinorejo: 32-35
- Holcman A., Salobir J., Zorman-Rojs O., Kavčič S. 2004. Fizikalne lastnosti jajc. V: Reja kokoši v manjših jatah. Ljubljana, Kmečki glas: 100-106
- Jardiland Création & Récréation. Olea europea.
<http://www.jardiland.com/vente-en-ligne/pepiniere/944-olea-europaea.html>, (14. okt. 2013)
- 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
- Kelly F.J. 2003. Oxidative stress: Its role in air pollution and adverse health effects. *Occupational and environmental medicine*, 60: 612–616
- Kirunda D. F. K., Scheideler S. E., McKee S. R. 2001. The efficacy of vitamin E (DL- α -tocopheryl acetate) supplementation in hen diets to alleviate egg quality deterioration associated with high temperature exposure. *Poultry science*, 80: 1378–1383
- Kure V. 2006. Vsebnost maščobnih kislin v svežih in konzerviranih morskih ribah. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 71
- Lah B., Avberšek M., Gorjanc G., Marinšek Logar R. 2005. Vrednotenje strupenosti in genotoksičnosti vzorcev zemlje z biotesti. *Acta agriculturae slovenica*, 81, 1: 27-38
- Lewis N. M., Seburg S., Flanagan N. L. 2000. Enriched eggs as a source of N-3 polyunsaturated fatty acids for humans. *Poultry science*, 79: 971–974
- Lin H., Wang L. F., Song J. L., Xie Y. M., Yang Q. M. 2002. Effect of dietary supplemental levels of vitamin A on the egg production and immune responses of heat-stressed laying hens. *Poultry science*, 81: 458–465
- Lin H., Jiao H. C., Buyse J., Decuyper E. 2006. Strategies for preventing heat stress in poultry. *World's poultry science journal*, 62: 71-85
- 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
- Marinšek Logar R., Zrimec A., Berden zrimec M., Čepeljnik T., Tišler T. 2006. Ugotavljanje strupenosti in genotoksičnosti pitnih vod. V: Zbornik referatov, simpozij z mednarodno udeležbo, Vodni dnevi, Portorož, 18. - 19. oktober 2006. Ljubljana, Slovensko društvo za zaščito voda: 58-69.
http://www.sdzv-drustvo.si/si/vodni_dnevi/2006/referati/07-Marinsek.pdf (17. jul. 2012)
- Mashaly M. M., Hendricks G. L., Kalama M., A., Gehad A. E., Abbas A. O. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poultry science*, 83: 889- 894

- Mckee J. S., Harrison P. C. 1995. Effect of supplemental ascorbic acid on the performance of broiler chickens exposed to multiple concurrent stressors. *Poultry science*, 74: 1772-1785
- Molina Alcaide E., Nefzaoui A. 1996. Recycling of olive oil by-products: Possibilities of utilization in animal nutrition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38, 3-4: 221-235
- Møller Pape A., Karadas F., Mousseau A. T. 2008. Antioxidants in eggs of great tits *Parus major* from Chernobyl and hatching success. *Journal of comparative physiology B*, 178: 735-743
- Muggli R. 1994. Physiological requirements of vitamin E as a function of the amount of type of polyunsaturated fatty acids. *World review of nutrition and dietetics*, 75: 166-168
- Njoku P. C., Nwazota A. O. U. 1989. Effect of dietary inclusion of ascorbic acid and palm oil on the performance of laying hens in a hot tropical environment. *British poultry science*, 30: 831-840
- Nutrient requirements of poultry. 1994. 9th revised edition. Subcommittee on poultry nutrition, National research council.
<http://www.lamolina.edu.pe/zootecnia/biblioteca2012/NRC%20Poultry%201994%5B1%5D.pdf> (12. jul. 2012)
- Olive P. L., Wlodek D., Durand R. E., Banath J. P. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental cell research*, 198, 2: 259-267
- Paiva – Martins F., Barbosa S., Pinheiro V., Mourão J. L., Outor – Monteiro D. 2009. The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances of pigs and quality of pork meat. *Meat science*, 82, 4: 438-443
- Park P. W., Goins R. E. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of food science*, 59: 1262-1266
- Puthongsiriporn U., Scheideler S. E., Sell J. L., Beck M. M. 2001. Effects of vitamin E and C supplementation on performance, in vitro lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress. *Poultry Science*, 80: 1190-1200
- Rabayaa E., Omar A. J. M., Othman R. A. 2001. Utilization of olive pulp in broiler rations. *An - Najah University journal of research*, 15: 133-144
- Rataj V., Angelovičova M., Opath R. 1999. The effect of the feeding laying hens on egg mechanical properties. *Int. Agrophysics*, 13: 251-257
- Rezar V. 2001. Vpliv različnih virov vlaknine v obroku z velikim deležem maščob na oksidacijski sres pri prašičih. *Magistrsko delo*. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 130
- Ryu Y.C., Rhee M.S., Lee K.M., Kim B.C. 2005. Effects of different levels of dietary supplemental selenium on performance, lipid oxidation, and color stability of broiler chicks. *Poultry science*, 84: 809-815
- Sahin K., Sahin N., Onderci M., Yaralioglu S., Kucuk O. 2001. Protective role of supplemental vitamin E on lipid peroxidation, vitamin E, A and some mineral concentrations of broilers reared under heat stress. *Veterinarni medicina. – Czech*, 46, 5: 140-144
- Sahin K., Sahin N., Onderci M., Gursu F., Cikim G. 2002. Optimal dietary concentration of chromium for alleviating the effect of heat stress on growth, carcass qualities, and

- some serum metabolites of broiler chickens. *Biological trace element research*, 89: 53-64
- Sahin K., Sahin N., Onderci M., Gursu M. F., Issi M. 2003. Vitamin C and E alleviate negative effects of heat stress in Japanese Quails. *Food, agriculture & environment*, 1, 2: 244-249
- Sahin K., Akdemir F., Orhan C., Tuzcu M., Hayirli A., Sahin N. 2010. Effects of dietary resveratrol supplementation on egg production and antioxidant status. *Poultry science*, 89: 1190-1198
- Salobir K., 2000. Antioksidanti v živilih – vpliv na zdravje. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L.(ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 287-294
- Salobir K., Savski B., Stibilj V., Dermelj M., Salobir J. 2000. Uravnavanje hranilne vrednosti jajc s prehrano nesnic. V: *Zbornik predavanj 9. posvetovanja o prehrani domačih živali "Zdravčevi – Erjavčevi dnevi"*, Radenci, 9. - 10. november 2000. Pen A. (ur.). Murska Sobota, Živinorejsko – veterinarski zavod za Pomurje: 102-119
- Scheideler, S. E., Froning G. W. 1996. The combined influence of dietary flaxseed variety, level, form, and storage conditions on egg production and composition among vitamin E-supplemented hens. *Poultry science*, 75: 1221-1226
- Shafey T. M., Dingle J. G., McDonald M. W., Kostner K. 2003. Effect of type of grain and oil supplement on the performance, blood lipoproteins, egg cholesterol and fatty acids of laying hens. *International journal of poultry science*, 2, 3: 200-206
- 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
- Specifikacija za kokošja jajca Omega plus (višja kakovost). 2008. Ljubljana, Jata Emona. http://www.jata-emoni.si/specifikacija_omega.pdf (12. jul. 2013)
- Strelec A. 2008. Prireja in kakovost jajc slovenskih tradicionalnih pasem kokoši lahkega tipa. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 29-41
- Surai P. F., Sparks N. H. C. 2001. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in food science & technology*, 12: 7-16
- Surai P., Yaroshenko F., Dvorska J., Sparks N. 2003. Selenium - enriched eggs can improve the humane diet. *Feed mix*, 11: 32-34
- Šenk N. 2006. Vrednostenje medu: Zveza med barvo medu in antioksidativno aktivnostjo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 67
- Therios I.N. 2009 Olives. *Crop production science in horticulture*, 18: 303-317
- Travnikar T. 2009. Vpliv naravnega in sintetičnega vitamina E na oksidacijsko stabilnost piščančjega mesa. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 50
- Universität Würzburg. Department of toxicology. http://www.toxikologie.uni-wuerzburg.de/en/general_information/ (12. sept. 2013)
- Uredba Komisije (EU) št. 116/2010 z dne 9. februarja 2010 o spremembi Uredbe (ES) št. 1924/2006 Evropskega parlamenta in Sveta glede seznama prehranskih trditev. 2010. Uradni list Evropske unije, L37: 16-18.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:037:0016:0018:SL:PDF> (8. avg. 2013)

Uredba Komisije (EU) št. 432/21012 z dne 16. maja 2012 o seznamu dovojenih zdravstvenih trditev na živilih, razen trditev, ki se nanašajo na zmanjšanje tveganja za nastanek bolezni ter na razvoj in zdravje otrok. 2012. Uradni list Evropske unije, L136: 4-11.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:136:0001:0040:SL:PDF> (8. avg. 2013)

Valenčič V. 2010. Vpliv tehnoloških postopkov na kakovost namiznih oljk Slovenske Istre. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 91

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T.D., 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

Vathana S., Kang K., Loan C. P., Thinggaard G., Kabasa J. D., ter Meulen U. 2002. Effect of Vitamin C supplementation on performance of broiler chickens in Cambodia. V: Challenges to organic farming and sustainable land use in the tropics and subtropics. Book of abstracts. Deutscher Tropentag, Witzenhausen, 9. – 11. oktobar 2002. Deininger A. (ed.). Witzenhausen, University of Kassel, University Press: 156

Visioli F., Poli A., Galli C. 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. Medicinal Research Reviews, 22, 1: 65-75

Voljč M. 2012. Vpliv kostanjevega tanina, RRR- α in all-rac- α - tokoferola na zmanjšanje oksidacijskega stresa prašičev in izboljšanje oksidacijske stabilnosti njihovega mesa. Doktorska disertacija. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 86

Zajec M. 1995. Kakovost jajc na slovenskem tržišču. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 98

Zarei M., Ehsani M., Torki M. 2011. Productive performance of laying hens fed wheat based diets included olive pulp with or without a commercial enzyme product. African Journal of Biotechnology, 10, 20: 4303-4312

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

Wahrburg U., Kratz M., Cullen P. 2002. Mediterranean diet, olive oil and health. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 104: 698–705

ZAHVALA

Na tem mestu bi se rada zahvalila vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi magistrskega dela:

- mentorici doc. dr. Vidi Rezar za vso strokovno pomoč, nasvete, spodbudo pri delu in izredno prijaznost,
- somentorju prof. dr. Janezu Salobirju za strokovno pomoč in nasvete,
- recenzentu doc. dr. Dušanu Terčiču za njegovo strokovno mnenje,
- predsedniku komisije prof. dr. Ivanu Štuhcu,
- prof. dr. Antoniji Holcman za pomoč pri merjenju fizikalnih lastnosti jajc in njeno strokovno pomoč,
- asist. dr. Alenki Levart in Anici Mušič za uvajanje in pomoč pri laboratorijskem delu, njuno prijaznost in spodbudo,
- tehničnim sodelavcem Nadi Novljan in Marku Kodri ter mladim raziskovalkam Mojci Voljč, Tini Trebušak in Urški Tomažin za pomoč med samim izvajanjem poskusa in pri laboratorijskem delu,
- vsem ostalim zaposlenim na Katedri za prehrano, Oddelka za zootehniko, ki so mi kakorkoli pomagali in me v času mojega eksperimenta sprejeli medse,
- dr. Nataši Siard za tehnični pregled magistrskega dela,
- moji družini: mami Mariji in očetu Janezu, ki sta me tekom študija spodbujala, razumela in me tudi materialno podpirala, sestri Vanji in fantu Nikoli, ki sta me prav tako spodbujala in potrpežljivo prenašala.