

## VPLIV DODATKA HMELJA NA OKSIDACIJO KRMNIH MEŠANIC IN OKSIDATIVNI STRES PIŠČANCEV PITANCEV

Vida REZAR<sup>1</sup>, Alenka LEVART<sup>2</sup>, Iztok Jože KOŠIR<sup>3</sup>, Andreja ČERENAK<sup>4</sup> in  
Janez SALOBIR<sup>5</sup>

Izvirni znanstveni članek / original scientific article

Prispelo / received: 20. oktober 2015

Sprejeto / accepted: 7. december 2015

### Izveček

Raziskali smo vpliv dodatka hmeljevih storžkov na oksidacijsko stabilnost krmnih mešanic med njihovim skladiščenjem in na oksidativni status pitovnih piščancev. V prehranskem poskusu smo 84 piščancev pitancev ross 308 razdelili v 3 poskusne skupine. S krmo so piščanci zaužili 7,5 % lanenega olja, ki je bogat vir večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) in s tem povzročili povečan oksidacijski stres. V krmne mešanice smo dodali nič (kontrolna skupina, KONT) oz. 0,9 (HMELJ\_0,9) ali 3,6 (HMELJ\_3,6) g hmelja/kg krmne mešanice. Poskus obstojnosti  $\alpha$ - in  $\beta$ -kislin v hmelju in krmnih mešanicah med staranjem je pokazal, da je zelo pomembna temperatura skladiščenja in sorta hmelja. Spremljali smo oksidacijo nenasičenih maščobnih kislin v krmnih mešanicah ter vpliv dodatka hmelja na oksidacijo lipidov v krvni plazmi piščancev, ki smo jo ovrednotili s spremljanjem koncentracije malondialdehida (MDA), sekundarnega produkta oksidacije večkrat nenasičenih maščobnih kislin. V krmnih mešanicah finišer smo izmerili višjo koncentracijo MDA kot v krmnih mešanicah štarter. Najvišjo koncentracijo MDA smo določili v skupini HMELJ\_3,6, kar je posledično vplivalo tudi na povečano oksidacijo lipidov in koncentracijo MDA v krvni plazmi piščancev. Glede na vsebnost MDA v krmnih mešanicah in v krvni plazmi piščancev smo ugotovili, da v krmnih mešanicah, obogatenih z VNMK, hmelj deluje prooksidativno.

**Ključne besede:** oksidativni stres / piščanci pitanci / hmelj / oksidacija / krmne mešanice

## INFLUENCE OF HOPS SUPPLEMENTATION ON FEED MIXTURES OXIDATION AND OXIDATIVE STRESS OF BROILERS

### Abstract

The influence of the addition of hop cones on oxidative stability of feed mixtures during their storage and on oxidative status of broilers was investigated. 84 chickens Ross 308 were divided in 3 experimental groups in the nutritional experiment. With feed the chickens consumed 7.5% linseed oil, which is a rich source of polyunsaturated fatty acids (PUFA), thereby causing an increase in oxidative stress. No hops (control group, KONT), 0.9 (HMELJ\_0,9) or 3.6 (HMELJ\_3,6) hops g/kg feed was added in feed mixtures. Stability testing of  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids in hops and feed mixtures during aging has

<sup>1</sup> Doc. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za prehrano, Groblje 3, 1230 Domžale, e-pošta: vida.rezar@bf.uni-lj.si

<sup>2</sup> Asist. dr., prav tam, e-pošta: alenka.levart@bf.uni-lj.si

<sup>3</sup> Doc. dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za agrokemijo in pivovarstvo, Cesta žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-pošta: iztok.kosir@ihps.si

<sup>4</sup> Doc. dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za rastline, tla in okolje, Cesta žalskega tabora 2, 3310 Žalec, e-pošta: andreja.cerenak@ihps.si

<sup>5</sup> Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za prehrano, Groblje 3, 1230 Domžale, e-pošta: janez.salobir@bf.uni-lj.si

shown that storage temperature and hop variety are very important factors. We monitored the oxidation of unsaturated fatty acids in feed mixtures and effect of hop addition on the oxidation of lipids in the chickens blood plasma, which was evaluated by monitoring the concentration of malondialdehyde (MDA), a secondary product of the oxidation of polyunsaturated fatty acids. In feed mixtures finisher higher concentration of MDA was measured in comparison to feed mixtures starter. The highest concentration of MDA was determined in the feed mixture HMELJ\_3,6, which induced oxidation of lipids and increased the concentration of MDA in the blood plasma of chickens. Depending on the content of MDA in feed mixtures and in the chickens' blood plasma, we found that in the PUFA enriched feed, hop acts as prooxidant.

**Key words:** oxidative stress / broilers / hops / oxidation / feed mixtures

## 1 UVOD

Prehrana živali ima pomemben vpliv na njihovo zdravje in proizvodnost. Maščobe v krmo dodajamo predvsem kot vir energije. Uporabljamo zlasti rastlinska olja, ki so bogata tudi z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (VNMK). Še posebej veliko VNMK je v krmnih mešanicah piščancev pitancev in kokoši, ko želimo kreirati funkcionalna živila (meso ali jajca), obogatena s trikrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (n-3 VNMK). Neprimerno skladiščenje z n-3 VNMK obogatenih krmnih mešanic lahko vodi do oksidacije nenasičenih maščob v krmi. Pri tem nastajajo produkti, kot so lipidni peroksidi, aldehidi, ketoni idr., ki so za živali in ljudi toksični. Za zaščito krme in organizma pred oksidacijo dodajamo v krmne mešanice antioksidante. Pravilno razmerje med antioksidanti in prooksidanti v prebavnem traktu, plazmi in tkivih je namreč odločilno za vzdrževanje zdravja (Surai in Dvorska, 2002). Zaradi želje porabnikov po uporabi naravnih krmnih dodatkov, postaja uporaba rastlinskih učinkovin, različnih rastlinskih ekstraktov in čistih naravnih rastlinskih bioaktivnih snovi vse bolj zanimiva v primerjavi s sintetičnimi antioksidanti, ki jih nekateri potrošniki zavračajo. Kot vir antioksidativne in antimikrobne zaščite lahko morda uporabimo tudi hmelj. Ključno vlogo pri antioksidativnem delovanju hmelja imajo polifenoli (ksantohumol, izoksanthumol in prenilnaringenini), ki so znani po antioksidativnih, antimikrobnih, antimutagenih lastnostih, delujejo pa tudi protivnetno. Hmelj vsebuje tudi druge sekundarne metabolite, med katere štejemo grenčične  $\alpha$ - in  $\beta$ -kislino, za katere pa je znano antimikrobno delovanje (Cornelison in sod., 2006; Krofta in sod., 2008; Van Cleemput in sod., 2009). Medtem ko je antioksidativna in antimikrobna učinkovitost hmelja dobro poznana v pivu (Stavri in sod., 2004), pa je antioksidativno delovanje hmelja pri domačih živalih po našem vedenju popolnoma neraziskano. Jakovljević in sod. (2008) so pri miših, katerim so dodajali hmelj, ugotovili izboljšano antioksidativno zaščito jeter. Tudi ob dodatku etanola podganam se je ksantohumol izkazal kot učinkovita zaščita pred nastankom poškodb jeter (Pinto in sod., 2014). Antioksidanti hmelja imajo vlogo tudi pri zaščiti pred razvojem rakavih obolenj. Nekoliko več se pri domačih živalih ve o protimikrobnih učinkih hmelja; tako dodajanje grenčičnih kislin hmelja pri piščancih zmanjša prisotnost bakterije *Clostridium perfringens* v prebavilih (Tillman in sod., 2011). O vplivu hmelja na oksidativno stabilnost krme v literaturi nismo našli podatkov.

Namen raziskave je bil ugotoviti ali dodatek zmletih storžkov hmelja v krmne mešanice za piščance pitance v različnih koncentracijah (0,9 ali 3,6 kg/t krmne mešanice) vpliva na oksidativno stabilnost in maščobnokislinsko sestavo krmnih mešanic starter in finiše in kakšen je vpliv dodatkov na oksidativni status krvne plazme piščancev, ki smo ga spremljali z

merjenjem sekundarnega produkta oksidacije VNMK, malondialdehida. Istočasno smo želeli ugotoviti vpliv krme na stabilnost beta-kislin hmelja.

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 Sestava krmnih mešanic

Pripravili smo osnovne krmne mešanice (preglednica 1) za piščance pitance in sicer za prvo obdobje pitanja do 20. dne štarter in za drugo obdobje pitanja od 21. dne do zakola finišer. Obe krmni mešanici sta vsebovali 7,5 % lanenega olja in 10 IU vitamina E na kg (KONT). V krmni mešanici smo dodali 0,9 g (HMELJ\_0,9) oziroma 3,6 (HMELJ\_3,6) g hmelja na kg mešanice.

*Preglednica 1: Sestava poskusnih krmnih mešanic za pitovne piščance (g/kg)*

*Table 1: Experimental feed mixtures for broilers (g/kg)*

	Štarter (g/kg)			Finišer (g/kg)		
	KONT	HMELJ_0,9	HMELJ_3,6	KONT	HMELJ_0,9	HMELJ_3,6
Koruza	190,00	189,10	186,40	270,00	269,10	266,40
Pšenica	300,00	300,00	300,00	284,10	284,10	284,10
Sojine tropine	384,94	384,94	384,94	332,36	332,36	332,36
Laneno olje	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00	75,00
Apnenec	13,16	13,16	13,16	10,63	10,63	10,63
Monodikalcije vfosfat	20,87	20,87	20,87	16,46	16,46	16,46
Sol	4,35	4,35	4,35	4,36	4,36	4,36
L-liz.-HCl <sup>1</sup>	2,25	2,25	2,25	0,07	0,07	0,07
DL-metionin <sup>2</sup>	3,39	3,39	3,39	2,02	2,02	2,02
L-treonin <sup>3</sup>	1,04	1,04	1,04	-	-	-
Premiks	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Hmelj	-	0,90	3,60	-	0,90	3,60

<sup>1</sup> L-lizin-HCl je vseboval 78,8 % lizina; <sup>2</sup> DL-metionin je vseboval 98 % metionina; <sup>3</sup> L-treonin je vseboval 98 % treonina

Dodani premiks (mineralno vitaminski dodatek) smo pripravili po priporočilih za rejo piščancev ross 308 za krmne mešanice grover (Ross 308 Nutrition specification, 308). Količino vitamina E smo dodali po priporočilih NRC (1994), 10 IU/kg. Za vse skupine in obe popolni krmni mešanici (štarter, finišer) je bila sestava premiksa enaka. Iz vsake krmne mešanice smo odvzeli vzorce krme za določanje maščobnokislinske sestave (preglednica 2). Analizirali smo tudi hmelj, ki smo ga do analiz shranili v hladilniku.

**Preglednica 2:** Maščobnokislinska sestava krmnih mešanic in hmelja (g maščobne kisline/100 g vsote maščobnih kislin)

**Table 2:** Fatty acid composition of feed mixtures and hops (g fatty acid/100 g sum of fatty acids)

	Štarter			Finišer			Hmelj
	KONT	HMELJ_0,9	HMELJ_3,6	KONT	HMELJ_0,9	HMELJ_3,6	
C16:0	7,65	7,91	7,81	7,91	7,79	7,71	11,15
Vsota C18:1	17,64	18,41	18,10	18,91	18,44	18,43	6,5
C18:2 n-6	25,50	25,64	25,23	26,74	25,38	25,57	31,61
C18:3 n-6							3,55
C18:3 n-3	44,85	43,17	44,12	41,74	43,59	43,66	17,53
NMK	11,50	12,15	12,00	12,10	12,04	11,80	25,49
ENMK	18,04	18,92	15,50	19,30	18,88	18,85	20,53
VNMK	70,46	68,92	69,50	68,60	69,08	69,34	53,98
n-3 VNMK	44,90	43,21	44,20	41,8	43,64	43,71	18,57
n-6 VNMK	25,57	25,71	25,30	26,80	25,45	25,64	35,41
n-6/n-3 VNMK	0,57	0,59	0,60	0,60	0,58	0,59	1,91

## 2.2 Hmelj kot dodatek krmi

Kot dodatek krmnim mešanicam smo uporabili hmelj, ki je bil pridelan na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Izbrali smo mešanico križancev hmelja 94/127 in 108/78 v razmerju 50:50. Križance smo izbrali glede na vsebnost  $\beta$ -kislin in glede na antioksidativno kapaciteto v maščobah (ACL) in v vodi topnih (ACW) antioksidantov. Posušene storžke hmelja smo zmleli v mlinu kladivarju in jih vmešali v osnovni krmni mešanici.

## 2.3 Prehranski poskus

V prehranski poskus smo vključili 84 en dan starih pitovnih piščancev petelinčkov provenience ross 308. Ob vhlevitvi smo jih stehtali in razdelili v tri skupine po 28 živali. Živali smo ves čas poskusa (37 dni) krmili s poskusnimi krmnimi mešanicami (preglednica 1) po volji.

## 2.4 Oksidativna stabilnost krme, določanje malondialdehida v vzorcih krme

Za določanje MDA v krmnih mešanicah in hmelju smo v plastično epruveto s pokrovčkom odtehtali 100 mg vzorca, nato smo odpipetirali 0,5 ml raztopine dibutilhidroksitoluena (BHT) v metanolu in 1,0 ml 5 % raztopine triklorocetne kisline (TCA). Epruvete smo dobro zaprli in jih za 15 min namestili v vrtničnik (vorteks), po mešanju smo jih za 15 min prenesli v centrifugo in centrifugirali pri 15000 obratih/min in 4 °C. Za derivatizacijo smo 0,75 ml supernatanta iz plastične epruvete prenesli v stekleno epruveto, kamor smo dodali še 1,5 ml raztopine tiobarbiturne kisline (TBA). Epruvete smo dobro zaprli in prenesli v grelni blok za

60 min pri 90 °C. Po derivatizaciji smo epruvete ohladili z mrzlo vodo. Derivatizirane vzorce smo prefiltrirali skozi filter s porami 0,45 mm v steklene vialne in analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

## 2.5 Določanje malondialdehida v vzorcih krvne plazme

Na koncu poskusa smo živali žrtvovali in odvzeli vzorce krvi. Za določanje MDA v krvni plazmi smo uporabili metodo, ki jo navajajo Wong in sod. (1987), z modifikacijami po Chirico (1994) in Fukunaga in sod. (1995) in lastnimi modifikacijami.

## 2.6 Določitev vsebnosti $\alpha$ - in $\beta$ -kislina v hmelju in krmnih mešanicah med shranjevanjem

Obstojnost hmelja smo spremljali zaradi pridobitve primerjalnih vrednosti staranja čistega hmelja glede na dodatek hmelja v krmni mešanici, ter s tem na možnost ocene vpliva same krme na stabilnost  $\beta$ - in  $\alpha$ -kislina.

Izbrali smo dve sorti hmelja (Aurora in Dana) ter dva križanca iz žlahtniteljskega programa z oznakama 94/127 in 108/78, ki smo jih uporabili tudi v poskusnih krmnih mešanicah.

Izbor sort in križancev je bil narejen:

- na osnovi višjih vsebnosti  $\beta$ -kislina (izbrana je bila sorta Dana ter mešanica dveh križancev z oznako 94/127 in 108/78) in
- na osnovi zadostnih proizvedenih količin oz. trenutnih zalog v Sloveniji (sorta Aurora), v primeru da bi hmelj tudi v praksi začeli uporabljati v prehrani živali.

Vsebnost  $\beta$ - in  $\alpha$ -kislina je bila določena s tekočinsko kromatografijo (HPLC), po Analytica-EBC 7.7 (2005). Vlaga v vzorcih je bila določena z metodo po Analytica EBC 7.2 (1997).

Obstojnost  $\beta$ - in  $\alpha$ -kislina smo spremljali v krmnih mešanicah, pripravljenih v razmerju hmelj:mešanica = 1:4, pri čemer so bile mešanice shranjene v idealnih skladiščnih pogojih pri 4 °C in pri temperaturi okolja pri 20 °C. Hkrati s krmnimi mešanicami, ki smo jim dodali hmelj, smo spremljali tudi obstojnost hmeljnih smol v čistem hmelju, da smo dobili verodostojno primerjavo rezultatov analiz. V vseh primerih je bil vzorcem omogočen dostop zraka.

Meritve smo izvajali 8 tednov (v razmiku 2 tednov), kolikor je tudi pričakovani čas skladiščenja krmnih mešanic v praksi.

## 2.7 Statistična obdelava podatkov

Za statistično obdelavo podatkov o koncentraciji MDA v plazmi smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS 8e, 2000, ZDA). S proceduro UNIVARIATE smo testirali normalnost porazdelitve podatkov, s proceduro MEANS pa smo izračunali statistične parametre. Za obdelavo podatkov s statističnim modelom smo uporabili proceduro GLM (General Linear Models). Razlike med skupinami smo ovrednotili s pomočjo linearnih kontrastov in Tukeyevega testa. Razlike so bile statistično značilne pri  $P \leq 0,05$ .

### 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Prehrana živali je zelo pomembna, saj vpliva na zdravje živali, kakovost njihovih proizvodov, posredno pa tudi na zdravje ljudi in zaščito okolja. Poznane so številne raziskave o učinkovitosti antioksidantov naravnega izvora, zato smo v naši raziskavi preizkusili učinkovitost hmelja, ki je bogat vir polifenolov in  $\alpha$ - ter  $\beta$ -kislín. Zaradi dodatka 7,5 % lanenega olja je bila krma bogata z n-3 VNМК. Te vrste maščobnih kislin so oksidacijsko zelo nestabilne. Hmelj, kot dodatek krmi, so v raziskavah na živalih preučevali predvsem zaradi njihovih antibakterijskih lastnosti (Stavri in sod., 2004; Cornelison in sod., 2006), medtem ko je o njegovi antioksidativni učinkovitosti pri živalih bolj malo znanega. Hmelj vsebuje terpene, grenčične kisline in halkone. Je tudi bogat vir flavonil glikozidov (kampferol, kvercetin, kvercitrin, rutin) (Sägesser in Deinzer, 1996) in katehinov (katehin galat, epikatehin galat) (Gorissen in sod., 1968). Njegova učinkovitost je seveda odvisna tudi od količine dodatka, v naši raziskavi smo uporabili dve koncentraciji in sicer 0,9 in 3,6 g/kg krme, ki smo ju izbrali glede na predhodne raziskave.

#### 3.1 Oksidativna stabilnost krme, koncentracija MDA v krmni mešanici in hmelju

Krma z veliko vsebnostjo maščob nudi živalim dobro pokritje potreb po energiji, vendar je občutljiva na oksidacijo. Z dodajanjem antioksidantov upočasnimo kvarjenje in podaljšamo obstojnost krmnih mešanic, pri tem pa ostaja hranilna vrednost krmnih mešanic velika, ohranijo se barva, vonj in okus (Frankič in Salobir, 2007). Obseg oksidacije v krmnih mešanicah in hmelju smo merili s koncentracijo MDA. Določili smo koncentracijo MDA v vseh krmnih mešanicah na začetku poskusa ter v hmelju, ki je bil shranjen na dva načina, v zamrzovalniku pri - 80 °C in v hladilniku pri 4 °C. Med krmnimi mešanicami šarterja smo ugotovili manjše razlike v vsebnosti MDA. Najnižjo koncentracijo smo izmerili v skupini KONT (106 nmol/g oz. 7,6 mg/kg), med skupinama HMELJ\_0,9 in HMELJ\_3,6 (135 nmol/g oz. 9,7 mg/kg) ni bilo razlik. Do drugačnih ugotovitev smo prišli pri analizi krmnih mešanic finišerja. Krmna mešanica skupine KONT je vsebovala najmanj MDA (60 nmol/g oz. 4,3 mg/kg), skoraj dvakrat več ga je vsebovala krmna mešanica skupina HMELJ\_0,9 (124 nmol/g oz. 8,9 mg/kg), največ pa krma skupine HMELJ\_3,6 (154 nmol/g oz. 11,1 mg/kg). Če primerjamo rezultate vsebnosti MDA v krmnih mešanicah z analizami krmnih mešanic, obogatenih z n-3 VNМК iz drugih prehranskih poskusov, ki smo jih izvedli, so bile koncentracije primerljive. V krmi za piščance pitance z dodanimi 7 % lanenega olja so izmerili 118 nmol/g oz. 8,5 mg MDA/kg (neobjavljeni rezultati), v krmni mešanici za kokoši nesnice z dodanimi 6 % lanenega olja pa 53 nmol/g oz. 4,5 mg MDA/kg (Kenda, 2014). Krmne mešanice, predvsem z velikim deležem maščob, s staranjem lahko hitreje oksidirajo. Kenda (2014) je izmerila več s TBA reagirajočih spojin v starani krmi kot sveži. V poskusu so v krmo dodali 6 % laneno olje in 10 IU vitamina E. Za zaščito krme so uporabili različne antioksidante (višjo koncentracijo vitamina E (150 IU), sintetični antioksidant ter oljčne liste in pulpo). Na podlagi rezultatov navaja oljčne liste in pulpo kot najbolj obetajoč naravni antioksidant za zaščito krme. Tudi v zmletem hmelju je bila koncentracija MDA različna glede na način shranjevanja. V svežem hmelju (shranjenem na - 80 °C) smo izmerili 40,43 nmol/g oz. 2,9 mg/kg, v hmelju skladiščenem 3 mesece v hladilniku pri 4 °C pa 65,10 nmol/g oz. 4,7 mg/kg. Slabšo antioksidativno sposobnost in zmanjšanje vsebnosti  $\alpha$ -kislín v hmelju so med skladiščenjem v hladnem okolju ugotovili tudi Krofta in sod. (2008). Zmanjšanje avtorji pripisujejo povečanemu deležu vlage, ki negativno vpliva na polifenolne molekule in s



tem poslabša antioksidativno učinkovitost. Kot omenjeno, so hmeljeve kisline zelo občutljive na oksidacijo v času skladiščenja. Tako se struktura  $\alpha$ - in  $\beta$ -kislin spremeni, izgubijo izoprenilno verigo, poleg tega pa nastajajo tudi druge kemične spojine, katerih vsebnosti še niso dobro znane. Steenackers in sod. (2015) prav tako navajajo, da v hmelju v času skladiščenja hitro pride do avtooksidacije nenasičenih maščobnih kislin.

### 3.2 Spreminjanje vsebnosti $\alpha$ - in $\beta$ -kislin v hmelju in krmnih mešanicah med skladiščenjem

Iz meritev smo ugotovili, da je bil v primeru skladiščenja hmelja sorte Aurora, po dveh mesecih padec  $\alpha$ -kislin približno 10 % in padec  $\beta$ -kislin približno 6 %, ne glede na temperaturo skladiščenja. V primeru skladiščenja krmne mešanice z dodanim hmeljem pri temperaturi okolja (20 °C) je znašal padec  $\alpha$ - in  $\beta$ -kislin kar 33 % oziroma 30 %. V primeru skladiščenja krmne mešanice z dodanim hmeljem sorte Aurora pri 4 °C je bil padec  $\alpha$ - in  $\beta$ -kislin okoli 25 %.

Rezultati padca učinkovin pri sorti Dana so pokazali, da je bil delež zmanjšanja  $\alpha$ - in  $\beta$ -kislin v hmelju, skladiščnem pri 20 °C 13 %, medtem ko je bil ta delež pri hmelju hranjenem pri 4 °C, občutno manjši in je znašal samo 9 oziroma 6 %. Primerjalno je znašal ta padec v krmnih mešanicah med 23 in 25 % za  $\alpha$  in  $\beta$ -kisline, neodvisno od razmer pri skladiščenju.

V primeru spremljanja  $\alpha$ -kislin pri vzorcu mešanice križancev z oznako 94/127 in 108/78 je prišlo do 4 oziroma 8 % padca, odvisno od temperature skladiščenja (4 °C oz. 20 °C). Zelo zanimivo pa je, da so ostale vsebnosti  $\beta$ -kislin, ne glede na režim skladiščenja v 2 mesecih praktično skoraj nespremenjene, kar kaže na zelo dobre skladiščne karakteristike križancev. V primeru skladiščenja krmnih mešanic pri 20 °C je prišlo do 36 % zmanjšanja  $\alpha$ -kislin in do 28 % padca  $\beta$ -kislin. Zelo zanimiv je rezultat, da pri skladiščenju pri 4 °C pride do komaj 13 % padca vsebnosti  $\alpha$ -kislin in samo 8 % zmanjšanja vsebnosti  $\beta$ -kislin.

### 3.3 Koncentracija MDA v krvni plazmi piščancev

Kot smo ugotovili že v naših prejšnjih raziskavah (Rezar in sod., 2006), lahko na koncentracijo MDA v plazmi vpliva tudi njegova koncentracija v krmi, kar ima lahko negativne posledice za zdravje živali. Poznano je, da  $\alpha$ - in  $\beta$ -kisline v hmelju med skladiščenjem zelo hitro oksidirajo, vendar je malo znanega o oksidacijskih produktih in vsebnostih med skladiščenjem, ker nastali kompleksi oksidativnih produktov motijo identifikacijo sestavin (Taniguchi in sod., 2013). Zato nas je v naši raziskavi zanimalo tudi ali dodatek hmelja v dveh različnih koncentracijah vpliva na oksidacijski stres v organizmu živali. Lipidno oksidacijo, ki je lahko posledica ali vzrok oksidacijskega stresa, smo merili z določanjem koncentracije malondialdehida (MDA) v krvni plazmi s HPLC (preglednica 3).

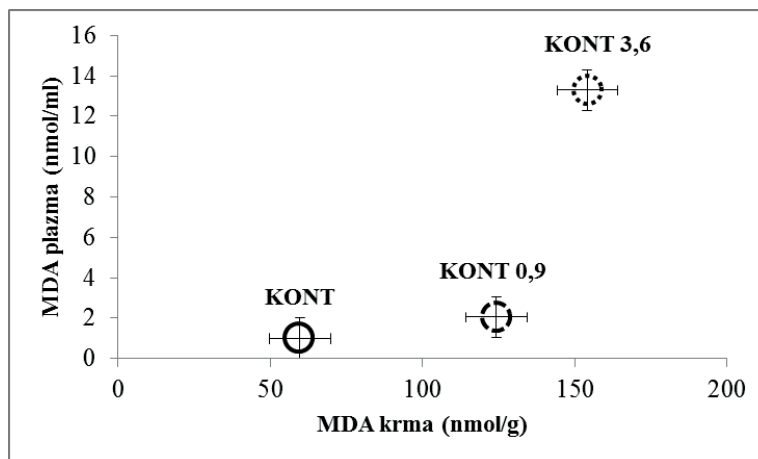
MDA je sekundarni produkt oksidativne razgradnje VNMK in biosinteze prostaglandinov. Določanje MDA je ena najpogostejših metod za ugotavljanje lipidne oksidacije v bioloških vzorcih (Nielsen in sod., 1997). Raziskave na prašičih (Rezar in sod., 2003) in piščancih (Voljč in sod., 2011) so pokazale, da prekomerno uživanje lanenega olja, ki je bogato z VNMK, poveča obseg lipidne oksidacije v organizmu. V naši raziskavi je bila koncentracija

MDA v plazmi, ki je dobivala najvišjo koncentracijo hmelja statistično značilno višja kot v kontrolni skupini in skupini, ki je dobivala dodatek 0,9 g hmelja/kg. Rezultati naše raziskave kažejo prooksidativno delovanje dodatka visoke koncentracije hmelja (3,6 g hmelja/kg). V literaturi nismo našli raziskav o vplivu hmelja na oksidacijski stres organizma. Če pogledamo povezavo med koncentracijo MDA v krmi in koncentracijo MDA v krvni plazmi (slika 1), vidimo, da koncentracija 0,9 g/kg hmelja v krmni mešanici ne povzroči bistvenega povečanja sekundarnih produktov oksidacije VNMK v plazmi, medtem ko je to povečanje bistveno višje pri dodani koncentraciji 3,6 g hmelja /kg krmne mešanice.

**Preglednica 3:** Rezultati analiz MDA v plazmi (LSM ± standardna napaka)

**Table 3:** Results of MDA analyses in plasma (LSM ± standard error)

	KONT	HMELJ_0,9	HMELJ_3,6	p
MDA (nmol/ml)	1,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,1 <sup>b</sup> ± 0,6	13,3 <sup>c</sup> ± 0,6	< 0,001



**Slika 1:** Povezava med koncentracijo MDA v krmi in MDA v krvni plazmi petelinčkov provenience ross 308

**Picture 1:** Relation between the MDA concentration in feed and the MDA concentration in plasma

Rezultati analize sekundarnih produktov oksidacije VNMK v krmnih mešanicah z dodatkom hmelja kažejo, da hmelj vsebuje tudi snovi, ki v krmnih mešanicah z visoko vsebnostjo VNMK delujejo prooksidativno.

#### 4 SKLEPI

V raziskavi smo preučevali vpliv dodatka dveh koncentracij storžkov hmelja v krmo za piščance pitance. Oksidativni stres smo izzvali z dodatkom 7,5 % lanenega olja, ki je bogat vir VNMK. V krmni mešanici finišer je bila koncentracija MDA najvišja v skupini z dodano največjo količino hmelja 3,6 g/kg krmne mešanice, kar je verjetno vplivalo tudi na koncentracijo MDA v krvni plazmi živali, ki je bila v tej skupini tudi statistično značilno najvišja. Na podlagi rezultatov raziskave in že objavljenih raziskavah o hmeljevi občutljivosti



na oksidacijo lahko ugotovimo, da hmelj v krmnih mešanicah, ki so obogatene z VNMK deluje prooksidativno in poveča oksidativni stres pri piščancih. V tem primeru bi bilo priporočljivo krmo dodatno zaščititi z antioksidanti. Za potrditev povečanega oksidativnega stresa pri piščancih kot posledica slabše oksidativne stabilnosti krmnih mešanic z dodatkom hmelja bi bilo potrebno narediti dodatne raziskave oksidativne stabilnosti krmnih mešanic v katerih bi spremljali vsebnost primarnih (peroksidi) in sekundarnih produktov oksidacije maščob (aldehidi in ketoni) v različnih časovnih obdobjih med shranjevanjem krme.

Na osnovi pridobljenih podatkov *in vitro* raziskav lahko zaključimo, da je način skladiščenja krmnih mešanic (temperatura skladiščenja) zelo pomemben za uporabo hmelja v prehrani živali, saj so bile razlike med posameznimi sortami oz. križanci ter različnimi skladiščnimi pogoji statistično značilne. Izbor primernih sort hmelja ima zelo velik vpliv na obstojnost učinkovin hmelja. Tako lahko zaključimo, da je bila v *in vitro* poskusu, kot dodatek krmnim mešanicam za piščance pitance daleč najprimernejša mešanica dveh križancev z oznako 94/127 in 108/78, ki sta v primeru analiz vzorcev čistega hmelja pokazala, da imata zelo dobre skladiščne lastnosti, in kar je za postavljeni poskus še pomembnejše, se je kasneje potrdilo tudi v obliki krmnih mešanic, še zlasti če so bile te shranjene pri nižjih temperaturah. Pri sorti Dana temperatura ni imela bistvenega vpliva saj so bila znižanja  $\alpha$ -in  $\beta$ -kislina v obeh primerih primerljiva. Padci  $\beta$ -kislina so bili najopaznejši pri sorti Aurora.

## 5 VIRI

- Analytica – EBC,  $\alpha$ - and  $\beta$ -Acids in Hops and Hop Products by HPLC, EBC Analysis Committee-Nürnberg: Carl, Getränke – Fachverl Grundwerk, 2005.
- Analytica – EBC, Moisture Content of Hops and Hop Products, EBC Analysis Committee-Nürnberg: Carl, Getränke – Fachverl Grundwerk, 1997.
- Chirico S. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. V: Oxygen radicals in biological systems. Methods in Enzymology. 1st edition. Packer L. (ed.). San Diego, Academic Press. 1994; 314-318.
- Cornelison J.M., Yan F., Watkins S.E., Rigby L., Segal J.B., Waldroup P.W. Evaluation of hops (*Humulus lupulus*) as an antimicrobial in broiler diets. *International Journal of Poultry Science*. 2006; 5(2): 134-136.
- Frankič T., Salobir J. Antioksidanti v prehrani živali. V: Zbornik predavanj 16. Mednarodnega znanstvenega posvetovanja o prehrani domačih živali, »Zdravčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 8.-9. nov. 2007. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije: 27-40.
- Fukunaga K., Takama K., Suzuki T.. High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. *Analytical Biochemistry*. 1995; 230: 20-23.
- Gorissen H., Bellink C., Vanraenenbroeck R., Lontie R. Separation and identification of (+)-gallo catechine in hops. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*. 1968; 76: 932-934.
- Jakovljević V., Popović M., Rasković A., Sabo A., Vasić R. Effect of aroma and magnum hops extracts and paracetamol on antioxidant liver parameters in mice. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2008; 4 (33): 205-209.
- Kenda N. Vpliv dodatkov oljčnih listov, pulpe ter njunih ekstraktov na oksidativno stabilnost krme za kokoši nesnice. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko. 2014; 60 str.
- Krofta K., Mikyška A., Haškova D. Antioxidant characteristics of hops and hop products. *Journal of the institute of brewing*. 2008; 2(114): 160-166.
- Marnett L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*. 1999; 424: 83-95.

- Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B., Andersen H.R., Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*. 1997; 43: 1209-1214.
- Pinto C., Cestero J.J., Rodríguez-Galdón B., Macías P. Xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus* L.), protects rat tissues against oxidative damage after acute ethanol administration. *Toxicology Reports*. 2014; 1: 726-733.
- Rezar V., Pajk T., Marinšek Logar R., Ješe Janežič V., Salobir K., Orešnik A. Wheat bran and oat bran effectively reduce oxidative stress induced by high-fat diets in pigs. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 2003; 47: 78-84.
- Rezar V., Pajk Žontar T., Levart A., Salobir K., Krsnik M., Osredkar J., Salobir J. Relevance of meat fat content and fruit and vegetable intake for the oxidative status of pigs. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 2006; 50(1): 74-80.
- Ross 308 Nutrition specification. 2007. Aviagen:  
[http://www.natchix.co.za/pdf/nutrition\\_specifications.pdf](http://www.natchix.co.za/pdf/nutrition_specifications.pdf) (22. avg. 2015).
- Shi H., Noguchi N., Niki E. Introducing natural antioxidants. V: Antioxidants in food. Practical applications. Pokorny J., Yanishlieva N. Gordon M. (eds.). Cambridge, England, Woodhead Publishing Limited. 2001; 147-155.
- Sägesser M., Deinzer M. HPLC-ion spray-tandem mass spectrometry of flavonol glycosides in hops. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1996; 54: 129-134.
- Stavri M., Schneider R., O'Donnell G., Lechner D., Bucar F., Gibbons S. The antimycobacterial components of hops (*Humulus lupulus*) and their dereplication. *Phytotherapy Research*. 2004; 18: 774-776.
- Steenackers B., De Cooman L., De Vos D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing proces: a review. *Food Chemistry*. 2015; 172: 742-756.
- Surai P.F., Dvorska J.E. Strategies to enhance antioxidant protection and implications for the well-being of companion animals. V: Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, Proceedings of Altech's 18th Annual Symposium, T.P. Lyons, K.A. Jacques (eds.). Nottingham, Nottingham University Press, 2002: 521-534.
- Taniguchi Y., Matsukura Y., Ozaki H., Nishimura K., Shindo K. Identification and quantification of the oxidation products derived from  $\alpha$  acids and  $\beta$ -acids during storage of hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013; 61: 3121-3130.
- Tillman G.E., Haas G.J., Wise M.G., Oakley B., Smith A., Siragusa G.R. Chicken intestine microbiota following the administration of lupulone, a hop-based antimicrobial. *FESM Microbiology Ecology*. 2011; 77: 395-403.
- Van Cleemput M., Cattor K., De Bosscher K., Haegeman G., De Keukeleire D., Heyerick A. Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *Journal of natural products*, 2009; 7: 1220-1230.
- Voljč M., Frankič T., Levart A., Nemeč M., Salobir J. Evaluation of different vitamin E recommendations and bioactivity of  $\alpha$ -tocopherol isomers in broiler nutrition by measuring oxidative stress in vivo and the oxidative stability of meat. *Poultry science*, 2011; 90(7): 1478-1488.
- Wong S.H.Y., Knight J.A., Hopfer S.M., Zaharia O., Leach C.N., Sunderman F.W.J. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid chromatographic separation of malondialdehyde – thiobarbituric acid adduct. *Clinical Chemistry*. 1987; 33: 214-220.