UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE
WYDZIAŁ BIOINŻYNIERII ZWIERZĄT

mgr inż. Sylwia Czurgiel

Wpływ zróżnicowanego żywienia na przyswajalność β-karotenu i tokoferoli u owiec i danieli

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze Żywienia Zwierząt, Paszoznawstwa i Hodowli Bydła
pod kierownictwem
dr hab. Zofii Antoszkiewicz
oraz drugiego promotora
dr Magdaleny Mazur-Kuśnirek

Olsztyn, 2023

UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN
FACULTY OF ANIMAL BIOENGINEERING



mgr inż. Sylwia Czurgiel

Effect of various diets on the bioavailability of β-carotene and tocopherols in sheep and fallow deer

Doctoral thesis conducted at the Department of
Animal Nutrition and Feed Management
under the guidance
of dr hab Zofia Antoszkiewicz
and the second supervisor
dr Magdalena Mazur-Kuśnirek

Olsztyn, 2023

Spis treści

Spis treści **3**

Podziękowania **5**

Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej **6**

Wykaz skrótów **7**

Streszczenie **8**

Abstract **10**

1. Wprowadzenie **12**

1.1. Hipotezy badawcze 14

1.2. Cele badań 15

1.2.1. Doświadczenie 1 (publikacja 2: Wpływ dawek pokarmowych opartych na kiszonkach z *Festulolium* na zawartość β-karotenu, tokoferoli i retinolu w mięsie tryczków) 15

1.2.2. Doświadczenie 2 (publikacja 1: Wpływ różnych pasz treściwych na zawartość tokoferoli, β-karotenu i retinolu w wątrobach i mięsie danieli hodowlanych (*Dama dama L.*) 15

2. Materiał i metody badań **16**

2.1. Etyka doświadczeń 16

2.2. Układ doświadczeń i żywienie zwierząt 16

2.2.1. Doświadczenie 1 (publikacja 2: Wpływ dawek pokarmowych opartych na kiszonkach z *Festulolium* na zawartość β-karotenu, tokoferoli i retinolu w mięsie tryczków) 16

2.2.2. Doświadczenie 2 (publikacja 1: Wpływ różnych pasz treściwych na zawartość tokoferoli, β-karotenu i retinolu w wątrobach i mięsie danieli hodowlanych (*Dama dama L.*) 17

2.3. Analizy chemiczne 17

2.3.1. Dawki pokarmowe 18

2.3.2. Mięso i wątroba 18

2.4. Analizy statystyczne 24

3. Wyniki **25**

3.1. Doświadczenie 1 (publikacja 2: Wpływ dawek pokarmowych opartych na kiszonkach z *Festulolium* na zawartość β-karotenu, tokoferoli i retinolu w mięsie tryczków) 25

3.2. Doświadczenie 2 (publikacja 1: Wpływ różnych pasz treściwych na zawartość tokoferoli, β-karotenu i retinolu w wątrobach i mięsie danieli hodowlanych (*Dama dama L.*) 27

4. Wnioski **30**

5. Spis piśmiennictwa **31**

Artykuły 1 i 2.....34

Podziękowania

Serdecznie dziękuję mojej promotorce
dr hab. Zofii Antoszkiewicz
za poświęcony mi czas, bezcenną pomoc, wskazówki,
za wsparcie i zrozumienie
udzielone podczas pisania niniejszej pracy,
a także za dzielenie się ogromną wiedzą.

Dziękuję
dr inż. Magdalenie Mazur-Kuśnirek
za wszelkie sugestie i możliwość konsultacji
oraz
całemu zespołowi Katedry Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa
za możliwość realizowania badań w przyjaznej atmosferze.

Niniejszą pracę dedykuję mojej kochanej rodzinie
mężowi Pawłowi oraz synowi Jasiowi.

Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Niniejszą rozprawę doktorską opracowano na podstawie cyklu dwóch publikacji naukowych:

- **Czurgiel, S.***; Antoszkiewicz, Z.; Mazur-Kuśnirek, M.; Bogdaszewski, M. The Effect of the Inclusion of Different Concentrates in Feed Rations on the Contents of Tocopherols, β-Carotene and Retinol in the Livers and Longissimus dorsi Muscles of Farm-Raised Fallow Deer (*Dama dama* L.). *Animals* **2022**, *12*, 3311. Doi: 10.3390/ani/12233311 (**IF[1] = 3,231; pkt[2] = 100**),

- **Czurgiel, S.***; Antoszkiewicz, Z.; Mazur-Kuśnirek, M.; Bogdaszewski, M. The Effect of *Festulolium* Silage-Based Diets on the Content of Tocopherols, β-Carotene and Retinol in Meat from Young Rams. *Animals* **2023**, *13*, 1817. Doi: 10.3390/ani13111817 (**IF[1] = 3,231; pkt[2] = 100**).

[1] Impact Factor - indeks naukowy czasopisma w roku opublikowania pracy.

[2] Liczba punktów z wykazu czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) z dnia 21 grudnia 2021 r.

Wykaz skrótów

MLL – *musculus longissimus lumborum*

MGM – *musculus gluteus maximus*

MLD – *musculus longissimus dorsi*

RB – dawka pokarmowa zawierająca kiszonkę z życicy mieszańcowej

FB – dawka pokarmowa zawierająca kiszonkę z *Festulolium* odmiany Becva

FF – dawka pokarmowa zawierająca kiszonkę z *Festulolium* odmiany Felopa

FP – dawka pokarmowa zawierająca kiszonkę z *Festulolium* odmiany Paulita

HO – dawka pokarmowa składająca się z siana i owsa

HOP – dawka pokarmowa składająca się z siana, owsa i koncentratu białkowego

HG – dawka pokarmowa składająca się z siana i granulowanej mieszanki paszowej

Fest. – *Festulolium*

odm. – odmiany

N – liczebność grup

Streszczenie

Podstawą niniejszej dysertacji są wyniki doświadczeń opublikowanych w cyklu dwóch publikacji naukowych.

Pierwsze doświadczenie przeprowadzono na 24 tryczkach rasy Berrichon du Cher. Zwierzęta podzielono na cztery równe liczebnie grupy doświadczalne, w żywieniu których zastosowano dawki pokarmowe oparte na kiszonce sporządzonej z życicy mieszańcowej (grupa RB) lub z trzech najbardziej rozpowszechnionych w Europie Środkowej odmian *Festulolium*- Becva, Felopa, Paulita (odpowiednio grupy FB, FF, FP). Z półtusz zwierząt pobrano próbki *musculus longissimus lumborum* (MLL) i *musculus gluteus maximus* (MGM), w których oznaczono zawartość podstawowych składników chemicznych (standardowymi metodami AOAC) oraz β-karotenu, tokoferoli i retinolu (metodą HPLC). Tryki żywione dawką opartą na kiszonce z życicy mieszańcowej (RB) pobierały najwięcej α-, β-, γ- i δ-tokoferolu oraz tokoferoli ogółem (p<0,01). Mięso tryków żywionych dawkami z kiszonkami sporządzonymi z *Festulolium* (FB, FF, FP) zawierało więcej tokoferoli (p<0,01) i retinolu (p<0,01 w MGM; p=0,053 w MLL) niż mięso zwierząt otrzymujących dawki z kiszonką z życicy mieszańcowej. Najwięcej sumy tokoferoli (p<0,01) i retinolu (p<0,01 w MGM; p=0,053 w MLL) oznaczono w mięsie tryków żywionych dawkami zawierającymi kiszonki z *Festulolium* odmian Felopa i Paulita. Analiza statystyczna wykazała dodatnią korelację między spożyciem sumy tokoferoli a zawartością w mięsie formy o największej aktywności biologicznej, α-tokoferolu (r=0,99), a także między spożyciem β-karotenu a zawartością retinolu w mięsie (r=0,92 w MLL; r=0,91 w MGM).

W drugim eksperymencie oceniono koncentrację β-karotenu, tokoferoli i retinolu oraz podstawowych składników chemicznych w mięsie i wątrobie danieli (*Dama dama L.*). Badaniami objęto 36 byków utrzymywanych fermowo, podzielonych na trzy grupy doświadczalne: grupa HO – dawka składająca się z siana, ziarna owsa, premiksu mineralno-

witaminowego, grupa HOP – dawka z siana, ziarna owsa, koncentratu białkowego, premiksu mineralno-witaminowego, grupa HG – dawka z siana, granulowanej mieszanki paszowej, premiksu mineralno-witaminowego. W próbkach wątroby danieli żywionych dawkami z udziałem pasz wysokobiałkowych, zasobniejszych w β-karoten (HOP, HG), zawartość retinolu była około dwukrotnie wyższa niż w wątrobach zwierząt żywionych dawką składającą się z siana i owsa (HO) (p<0,01). Próbki mięsa danieli żywionych dawką z siana i owsa zawierały około trzykrotnie więcej tłuszczu surowego (ekstraktu eterowego) niż mięso danieli grup HOP i HP (p<0,01). Analiza statystyczna wykazała bardzo silną dodatnią korelację pomiędzy sumą tokoferoli w dawce pokarmowej a koncentracją α-tokoferolu w wątrobie i MLD (r=0,95) oraz umiarkowaną, dodatnią korelację pomiędzy sumą tokoferoli w dawce a zawartością retinolu w MLD (r=0,58). W niniejszym doświadczeniu nie wykazano wpływu żywienia dawkami o różnym składzie surowcowym na zróżnicowanie koncentracji tokoferoli w próbkach wątrób i mięsa oraz podstawowego składu chemicznego próbek wątrób danieli.

Wyniki pierwszego doświadczenia wykazały, że zwiększone spożycie tokoferoli i β-karotenu przez owce nie zawsze prowadziło do większej koncentracji witaminy A i E w mięsie. Na podstawie wyników stwierdzono, że kiszonki z *Festulolium* stanowią wartościowy komponent w żywieniu owiec, a efekty żywienia tryczków zależą od zastosowanej odmiany *Festulolium*. Z kolei zastosowanie wysokobiałkowych pasz treściwych w dawkach pokarmowych danieli nie wpłynęło na zwiększenie koncentracji wit. A i E w mięsie. Spożycie dawek pokarmowych zasobniejszych w β-karoten (HP, HOP) wpłynęło na zwiększenie koncentracji witaminy A w próbkach wątrób danieli.

Słowa kluczowe β-karoten, tokoferole, retinol, tryki, daniele

Abstract

The present dissertation is based on the results of experiments published in a series of two scientific publications.

The first experiment was conducted on 24 rams of the Berrichon du Cher breed. The animals were divided into four equally sized experimental groups and fed a diet based on silage made from hybrid ryegrass (group RB) or the three most widespread varieties of *Festulolium* in Central Europe - Becva, Felopa, Paulita (groups FB, FF, FP, respectively). Samples of *musculus longissimus lumborum* (MLL) and *musculus gluteus maximus* (MGM) were taken from the half-carcasses of the animals, in which the content of basic chemical nutrients (by standard AOAC methods) and β-carotene, tocopherols and retinol (by HPLC) were determined. Rams fed a ration based on hybrid ryegrass silage (RB) had the highest intake of α-, β-, γ- and δ-tocopherol and total tocopherols ($p<0.01$). Meat from rams fed rations based on *Festulolium* silages (FB, FF, FP) contained more tocopherols ($p<0.01$) and retinol ($p<0.01$ in MGM; $p=0.053$ in MLL) than meat from animals receiving rations based on hybrid ryegrass. The highest total tocopherols ($p<0.01$) and retinol ($p<0.01$ in MGM; $p=0.053$ in MLL) were determined in meat from rams fed rations based on *Festulolium* silage of the Felopa and Paulita cultivars. Statistical analysis showed a positive correlation between the intake of total tocopherols and the content of the form with the highest biological activity, α-tocopherol, in meat (r=0.99), as well as between the intake of β-carotene and the content of retinol in meat (r=0.92 in MLL; r=0.91 in MGM).

In the second experiment, the concentration of β-carotene, tocopherols and retinol, as well as basic chemical nutrients, was assessed in the meat and liver of fallow deer (*Dama dama L.*). The study involved 36 farm-raised bulls divided into three experimental groups: group HO - ration consisting of hay, oat grain, mineral-vitamin premix, group HOP - ration consisting of hay, oat grain, protein concentrate, mineral-vitamin premix, group HG - ration

consisting of hay, pelleted feed mix, mineral-vitamin premix. In the liver samples of fallow deer fed rations with high-protein feeds, more abundant in β-carotene (HOP, HG), the retinol content was about twice as high as in the livers of animals fed a ration consisting of hay and oats (HO) ($p<0.01$). Meat samples from fallow deer fed a ration consisting of hay and oats contained about three times more crude fat (ether extract) than meat from fallow deer of the HOP and HP groups ($p<0.01$). Statistical analysis showed a very strong positive correlation between total tocopherols in the ration and α-tocopherol concentration in liver and MLD (r=0.95) and a moderate positive correlation between total tocopherols in the ration and retinol content in MLD (r=0.58). In the present experiment, the effect of feeding rations with different raw material composition on the variation of tocopherol concentration in liver and meat samples and the basic chemical composition of fallow deer liver samples was not demonstrated.

The results of the first experiment showed that increased intake of tocopherols and β-carotene by sheep did not always lead to higher concentrations of vitamin A and E in meat. Based on the results, it was concluded that *Festulolium* silages are a valuable component in sheep nutrition and that the effects of feeding the rams depend on the variety of *Festulolium* used. In contrast, the use of high-protein concentrate feeds in fallow deer rations did not increase the concentration of vitamin A and E in the meat. Consumption of rations richer in β-carotene (HP, HOP) increased the concentration of vitamin A in fallow deer liver samples.

Key words β-carotene, tocopherols, retinol, rams, fallow deer

1. Wprowadzenie

Witamina A oraz jej prekursor, β-karoten, a także tokoferole (witamina E) to składniki odżywcze, które odgrywają ważne funkcje w wielu procesach biologicznych. Obie witaminy oraz prowitamina wit. A, β-karoten, są rozpuszczalne w tłuszczach i mają kilka wspólnych mechanizmów dotyczących ich metabolizmu. Zarówno witamina A jak i E wykazują silne działanie antyoksydacyjne oraz biorą udział we wspomaganiu odporności, ochronie tkanek, prawidłowych procesach rozrodu, wzroście i rozwoju (Deber i Larondelle, 2005). Zwierzęta nie mają zdolności syntezy tych związków, dlatego muszą one zostać dostarczone wraz z paszą. W związku z tym, jakość dawek pokarmowych oraz skład chemiczny są głównymi czynnikami decydującymi o stopniu zaopatrzenia zwierząt w wymienione związki. Witaminy A i E gromadzą się w tkankach zwierząt i tym samym w produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego. Poprawiają trwałość i wartość odżywczą mięsa oraz wpływają na jego barwę, zapach, smak i teksturę (Dunne i in.,2009). Temat witamin A i E, a także karotenoidów w żywieniu zwierząt gospodarskich jest przedmiotem badań od wielu dekad, jednak w ostatnich latach zainteresowanie tymi składnikami powróciło. Wiele zagadnień wciąż pozostaje niejasnych (Nozière i in., 2006; Kalač, 2012).

W niniejszej dysertacji przedstawiono wyniki badań nad wpływem zastosowania różnych dawek pokarmowych (składających się z różnych komponentów) na zawartość tokoferoli, β-karotenu i retinolu w próbkach mięsa tryczków oraz w próbkach wątrób i mięsa danieli utrzymywanych fermowo. Pierwsze doświadczenie przeprowadzono na 24 tryczkach rasy Berrichon du Cher, w żywieniu których wykorzystano kiszonki sporządzone z różnych odmian *Festulolium*. Rośliny *Festulolium* stanowią przedmiot zainteresowania badaczy od wielu lat, a w ostatnich kilku latach szczególnie, z uwagi na przydatne cechy podczas upraw w zmieniających się lub skrajnych warunkach klimatycznych (Kitczak i in., 2021). Podstawowy skład chemiczny pasz z *Festulolium* jest dobrze poznany, ale istnieje niewiele

badań określających zawartość składników bioaktywnych, w tym karotenoidów i tokoferoli w hybrydach *Festulolium*. Informacje na temat wpływu pasz, a szczególnie kiszonek z *Festulolium* na zawartość składników bioaktywnych w mięsie przeżuwaczy, w tym w mięsie tryków są skąpe.

W drugim eksperymencie badaniami objęto 36 danieli hodowlanych. Daniele pospolite (*Dama dama L.*) należą do głównych gatunków w rozwijającym się chowie jeleniowatych na świecie, w tym Polsce. W mięsie jeleniowatych, w tym danieli, upatruje się alternatywnego surowca w diecie ludzi (Flis, 2016). Podstawowy skład chemiczny mięsa danieli jest dość dobrze poznany, jednak występuje niewiele informacji na temat zawartości związków biologicznie czynnych (w tym β-karotenu, retinolu i tokoferoli). Informacje na temat wartości odżywczej podrobów zwierząt dzikich, w tym pochodzących od danieli są nieliczne i skupiają się głównie na ryzyku zatrucia metalami ciężkimi (Florek i Drozd, 2013; Chiari i in., 2015; Pilarczyk i in., 2020; Razmaite i in., 2020).

1.1. Hipotezy badawcze

- Skład surowcowy dawek pokarmowych (rodzaj pasz treściwych lub rodzaj kiszonki) ma wpływ na zawartość tokoferoli i retinolu w mięsie owiec i danieli oraz wątrobie danieli.

- Zawartość tokoferoli i β-karotenu w dawce pokarmowej ma wpływ na koncentrację tokoferoli i retinolu w mięsie owiec i danieli oraz wątrobie danieli.

1.2. Cele badań

1.2.1. Doświadczenie 1 (publikacja 2: Wpływ dawek pokarmowych opartych na kiszonkach z *Festulolium* na zawartość β-karotenu, tokoferoli i retinolu w mięsie tryczków)

- ocena wpływu dawek pokarmowych zawierających kiszonki z *Festulolium* na zawartość podstawowych składników pokarmowych, β-karotenu, tokoferoli i retinolu w *musculus longissimus lumborum* (MLL) i *musculus gluteus maximus* (MGM) tryczków. Do badań wykorzystano życicę mieszańcową oraz trzy najbardziej rozpowszechnione w Europie Środkowej odmiany *Festulolium* (Becva, Felopa, Paulita).

1.2.2. Doświadczenie 2 (publikacja 1: Wpływ różnych pasz treściwych na zawartość tokoferoli, β-karotenu i retinolu w wątrobach i mięsie danieli hodowlanych (*Dama dama L.*)

- ocena wpływu pasz treściwych (koncentratu białkowego i granulowanej mieszanki paszowej) w dawkach pokarmowych opartych na sianie na podstawowy skład chemiczny oraz zawartość β-karotenu, tokoferoli i retinolu w *musculus longissimus dorsi* (MLD) i wątrobach danieli utrzymywanych fermowo (*Dama dama L.*).

2. Materiał i metody badań

2.1. Etyka doświadczeń

Zgodnie z polskim prawem i dyrektywą unijną (nr 2010/63/UE) doświadczenia nie wymagały zgody Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie. Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach były utrzymywane zgodnie z przepisami ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych. Ubój i obróbkę poubojową przeprowadzono zgodnie z Rozporządzeniem Rady (WE) nr 1099/2009 z dnia 24 września 2009 r. w sprawie ochrony zwierząt podczas uboju.

2.2. Układ doświadczeń i żywienie zwierząt

2.2.1. Doświadczenie 1 (publikacja 2: Wpływ dawek pokarmowych opartych na kiszonkach z *Festulolium* na zawartość β-karotenu, tokoferoli i retinolu w mięsie tryczków)

Badania przeprowadzono w stacji doświadczalnej Katedry Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa (obecnie Katedra Żywienia Zwierząt, Paszoznawstwa i Hodowli Bydła), Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Materiał doświadczalny stanowiły 24 tryczki rasy Berrichon du Cher, odsadzone od matek w wieku około 100 dni. W momencie rozpoczynania eksperymentu średnie masy ciała zwierząt każdej grupy wynosiły od 31 do 33 kg ± 4-6 kg. Zwierzęta podzielono na cztery równe liczebnie grupy doświadczalne (RB, FB, FF, FP) w zależności od zastosowanej kiszonki w dawce pokarmowej (życica mieszańcowa, *Festulolium* odmiany Becva, *Fest.* odm. Felopa, *Fest.* odm. Paulita) i utrzymywano w indywidualnych kojcach strawnościowych z dostępem do paszy i wody (*ad libitum*). Wszystkie kiszonki użyte w doświadczeniu pochodziły z trzeciego pokosu traw i były wyprodukowane w stacji doświadczalnej w Tomaszkowie (53°43’N, 20°24’E; Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn, Poland). Wszystkie dawki pokarmowe

zawierały także gniecione ziarno jęczmienia, poekstrakcyjną śrutę sojową oraz premiks mineralno-witaminowy. Po 50 dniach doświadczenia wykonano ubój tryków w Zakładzie Uboju Bydła w Biskupcu (Zakład Uboju Bydła Biskupiec, Sp. z o. o.). Ze schłodzonych przez 24 h (+4°C) półtusz pobrano próbki *musculus longissimus lumborum* (MLL) i *musculus gluteus maximus* (MGM).

2.2.2. Doświadczenie 2 (publikacja 1: Wpływ różnych pasz treściwych na zawartość tokoferoli, β-karotenu i retinolu w wątrobach i mięsie danieli hodowlanych (*Dama dama L.*)

Eksperyment przeprowadzono na farmie Stacji Badawczej Instytutu Parazytologii Badawczej PAN w Kosewie Górnym. Badaniami objęto 36 danieli pospolitych (*Dama dama L.*) w wieku około 10 miesięcy, utrzymywanych grupowo, alkierzowo bez dostępu do wybiegów, z dostępem do paszy i wody (*ad libitum*). Zwierzęta podzielono na trzy równe liczebnie grupy doświadczalne i żywiono według poniższego schematu:

- Grupa HO – siano + ziarno owsa + premiks mineralno-witaminowy,
- Grupa HOP – siano + ziarno owsa + koncentrat białkowy + premiks mineralno-witaminowy,
- Grupa HG – siano + granulowana mieszanka paszowa + premiks mineralno-witaminowy.

Po 60 dniach doświadczenia wykonano ubój danieli pod kontrolą weterynaryjną na farmie Stacji Badawczej Instytutu Parazytologii Badawczej PAN w Kosewie Górnym. Ze schłodzonych przez 24 h (+4°C) półtusz pobrano próbki wątroby i *musculus longissimus dorsi* (MLD).

2.3. Analizy chemiczne

2.3.1. Dawki pokarmowe

- Podstawowy skład chemiczny (sucha masa, popiół surowy, białko ogólne, ekstrakt eterowy, włókno neutralno-detergentowe oraz masa organiczna w pierwszym doświadczeniu)

W celu określenia podstawowego składu chemicznego próbki dawek pokarmowych suszono w 60°C w suszarkach laboratoryjnych (Binder GmbH, Tuttlingen, Germany), a następnie rozdrobniono w młynku paszowym (Retsch, Haan, Germany) do wielkości cząstek ok. 1 mm. Suche i rozdrobnione próbki poddano analizom według standardowych metod (AOAC, 2016). Zawartość neutral-detergent fiber (NDF) oznaczono przy użyciu ANKOM220 (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY) według metody Van Soest i in. (1991). Masę organiczną obliczono z różnicy pomiędzy suchą masą a popiołem surowym.

- α-, β-, γ-, δ-tokoferol oraz β-karoten

Świeże (niezwłocznie po pobraniu) próbki pasz ekstrahowano mieszaniną eteru naftowego i etanolu w temp. pokojowej, w ciemności przez 18 h, a następnie zmydlano i wielokrotnie ekstrahowano eterem etylowym i naftowym. Eluaty odwodniono bezwodnym siarczanem sodowym oraz odparowano do sucha (40°C) na wyparce rotacyjnej (Janke&Kunkel IKA- Labortechnik, Staufen, Germany). Pozostałość rozpuszczono w 5 cm^3 heksanu. Zawartość tokoferoli i β-karotenu oznaczono metodą HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) (ISO, 2002; De Quiros i Costa, 2006).

2.3.2. Mięso i wątroba

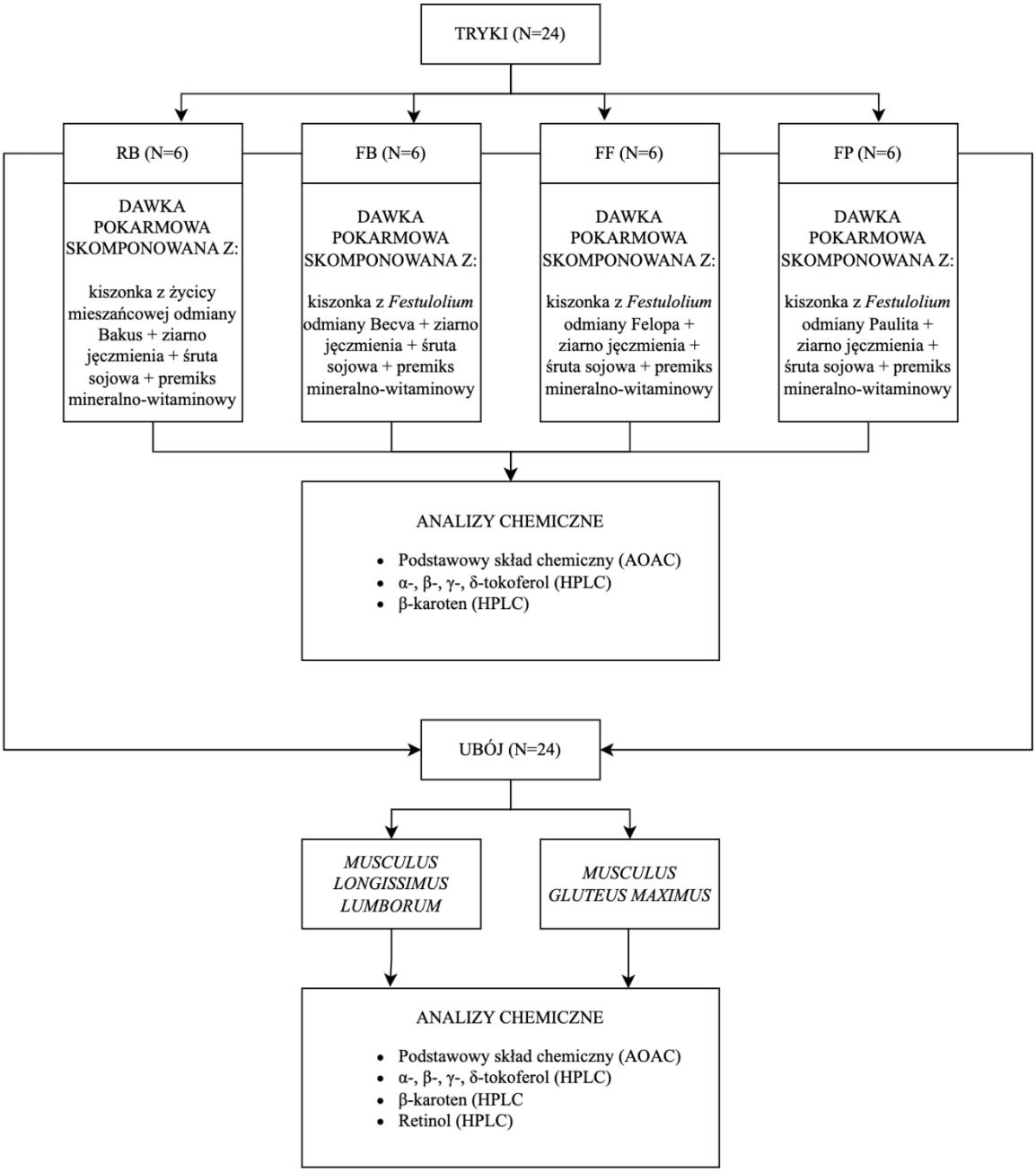
- Podstawowy skład chemiczny (sucha masa, popiół surowy, białko ogólne, ekstrakt eterowy)

Próbki mrożono do momentu wykonania analiz (około 7 dni). Oznaczenie podstawowego składu chemicznego wykonano standardowymi metodami (AOAC, 2016) w rozmrożonych i rozdrobnionych przed analizą próbkach.

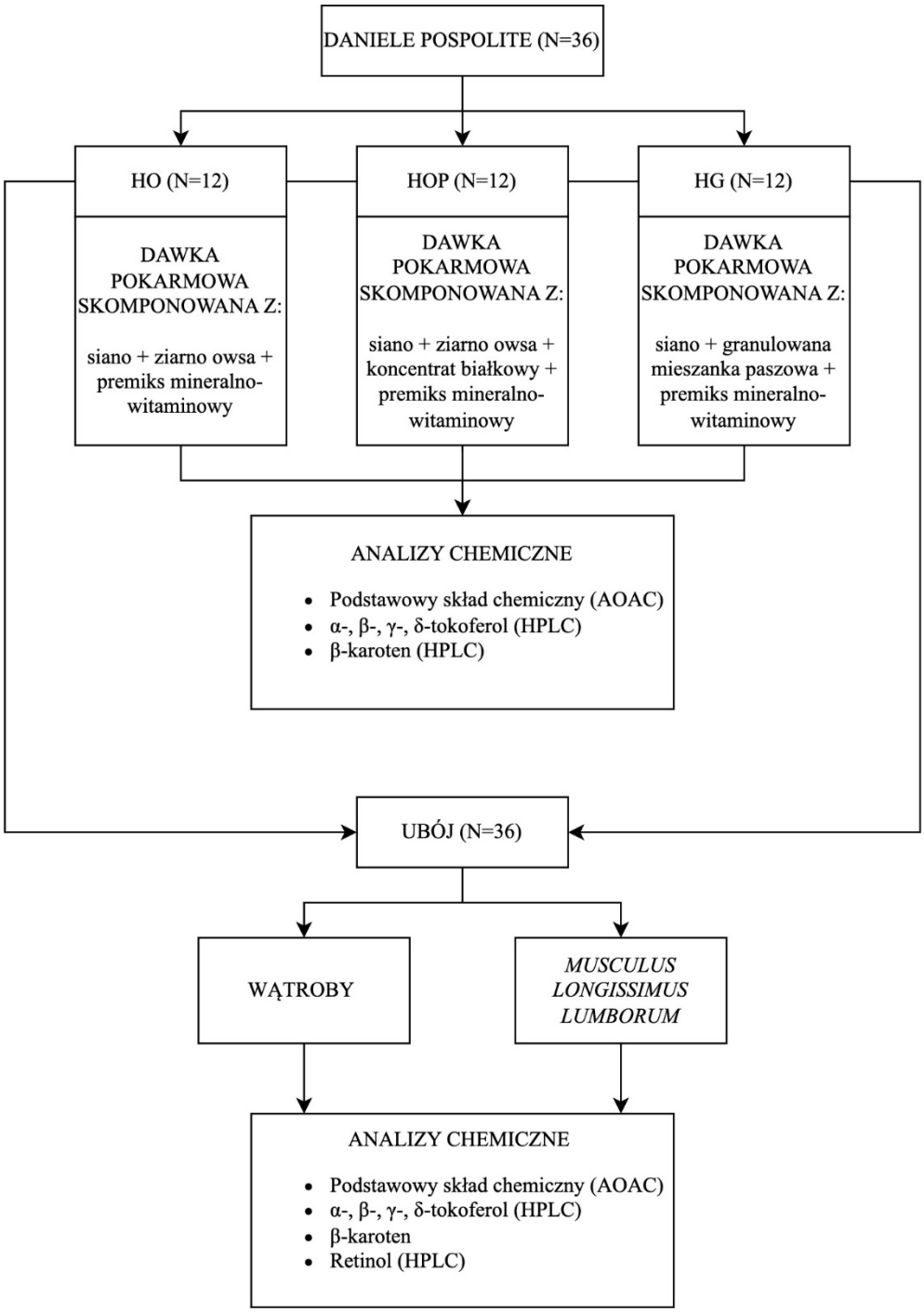
- α-, β-, γ-, δ-tokoferol, β-karoten, retinol

Mrożone przez około 7 dni próbki mięsa i wątroby przed analizą rozmrożono i rozdrobniono (młynek kulinarny Robert Bosch GmbH, Gerlingen, Niemcy). Homogenaty (homogenizator Ultra-Turrax T25, Janke&Kundel IKA- Labortechnik, Staufen, Germany) zmydlano i dwukrotnie ekstrahowano n-heksanem. Połączone ekstrakty odparowano do sucha w strumieniu N_2. Próbki rozpuszczono w 1 cm^3 n-heksanu i przefiltrowano przez filtr strzykawkowy (Högberg i in., 2002; Eriksson i Pickova, 2007; Xu, 2008). Zawartość tokoferoli, retinolu i β-karotenu w heksanowych ekstraktach oznaczono metodą HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) (ISO, 2002; De Quirós i Costa, 2006).

Rys. 1. Uproszczony schemat doświadczenia 1.



Rys. 2.Uproszczony schemat doświadczenia 2.



Fot. 1, 2. Tryki doświadczalne w klatkach strawnościowych. Autor: Sylwia Czurgiel.





Fot. 3, 4. Przygotowanie próbek pasz do analizy HPLC. Autor: Sylwia Czurgiel.





2.4. Analizy statystyczne

Wyniki badań opracowano statystycznie za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, analizy korelacji liniowej oraz testu Duncana. Dane scharakteryzowano za pomocą średniej arytmetycznej ($\bar{x}$), błędu standardowego średniej (SEM) na poziomie istotności ($P \leq 0,01$; $P \leq 0,05$). W obliczeniach wykorzystywano program komputerowy STATISTICA 13.3.

Dokładną metodykę opisano w dwóch artykułach stanowiących podstawę niniejszej dysertacji.

3. Wyniki

Wyniki doświadczeń zamieszczono w dwóch pracach oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych z listy ministerialnej A. W pracach oceniono koncentrację czterech form tokoferoli (α-, β-, γ-, δ-tokoferol), a także retinolu oraz β-karotenu w mięsie owiec i danieli oraz wątrobie danieli, w zależności od żywienia.

3.1. Doświadczenie 1 (publikacja 2: Wpływ dawek pokarmowych opartych na kiszonkach z *Festulolium* na zawartość β-karotenu, tokoferoli i retinolu w mięsie tryczków)

Próbki mięsa (MGM, MLL) tryczków żywionych dawkami opartymi na kiszonkach z *Festulolium* charakteryzowały się wyższą koncentracją zarówno sumy tokoferoli (2,09-5,03 mg/kg), jak i α-tokoferolu (1,56-3,53 mg/kg), w porównaniu z mięsem zwierząt grupy RB (dawka z kiszonką z życicy mieszańcowej; odpowiednio 1,92-2,75 mg/kg oraz 1,33-2,09 mg/kg). Najwięcej tokoferoli (p<0,01) i retinolu (p<0,01 w MGM; p=0,053 w MLL) stwierdzono w mięsie tryczków żywionych dawkami pokarmowymi opartymi na kiszonkach z *Festulolium* odmian Felopa i Paulita. W próbkach MGM zwierząt tych grup zawartość sumy tokoferoli oraz α-tokoferolu była wyższa odpowiednio o ok. 53% i 38% oraz 47% i 67% w porównaniu z próbkami mięsa tryczków grupy RB. MLL tryczków grup FF i FP zawierał więcej tych związków odpowiednio o ok. 55% i 63% oraz 59% i 69%. W piśmiennictwie brakuje oceny koncentracji witaminy E jako sumy α-, β-, γ- i δ-tokoferolu w mięsie przeżuwaczy, w tym owiec. Większość badań skupia się na ocenie formy α, która charakteryzuje się największą aktywnością biologiczną, a niektóre prace także formy γ (Milewski i in., 2014; Luciano i in., 2019; Semwogerere i in., 2020). Jednocześnie wyniki potwierdzają zwykle koncentrację α-tokoferolu w mięsie przeżuwaczy jako bezpośredni skutek wielkości spożytego składnika (Jose i in., 2016; Ponnampalam i in., 2017; Bellés i in., 2018). W niniejszym doświadczeniu, mięso tryczków pobierających najwięcej sumy

tokoferoli, w tym i α-tokoferolu w dawce pokarmowej z udziałem życicy mieszańcowej (RB) zawierało najmniej tych związków (odpowiednio 1,92 mg/kg i 0,77 mg/kg w MLL oraz 2,75 mg/kg i 2,09 mg/kg w MLL, p<0,001). Włączenie do dawek kiszonek opartych na *Festulolium* wpłynęło na zwiększenie koncentracji w mięsie zarówno sumy tokoferoli jak i α-tokoferolu, pomimo mniejszego spożycia tych związków. Największą zawartość sumy tokoferoli oznaczono w mięsie tryczków grupy FP (2,65 mg/kg MGM i 4,39 mg/kg MLL). Tryczki grupy FP pobierały najwięcej sumy tokoferoli oraz α-tokoferolu, jednak w próbkach mięsa tryczków grupy FP stężenie α-tokoferolu nie było największe (2,03 mg/kg MGM i 2,09 mg/kg MLL, p<0,001). Sugeruje się, że np. oksydaza polifenolowa zawarta w niektórych kiszonkach może zakłócać wchłanianie jelitowe α-tokoferolu lub jego metabolizm po wchłonięciu, jednak w tym zakresie zachodzi potrzeba kontynuacji badań (Luciano i in., 2019). Dodatkowo, wyniki własnych badań wskazują, że większa ilość pobranego β-, γ- i δ-tokoferolu nie skutkuje zwiększoną zawartością tych związków w mięsie.

W niniejszym doświadczeniu, w ocenianych próbkach wątroby i mięsa owiec nie oznaczono zawartości β-karotenu, co było zgodne z wynikami innych badań (Yang i in., 1992; Chauveau-Duriot i in., 2010). Według licznych wyników (Yang i in., 1992; Kasapidou i in., 2009; Álvarez i in., 2015) wielkość odkładania retinolu w tkankach zwierząt zależy głównie od żywienia, w tym od ilości pobieranego β-karotenu (prowitaminy wit. A). Według wyników niniejszych badań, większe spożycie β-karotenu przez tryczki wiązało się z wyższą koncentracją retinolu, ale tylko w MGM i tylko w grupach żywionych dawkami z udziałem kiszonek z *Festulolium*. Próbki MGM o najwyższym stężeniu retinolu pochodziły od zwierząt żywionych dawką FP, w której tryczki pobierały najwięcej β-karotenu (ok. 330 mg/dobę). Zawartość retinolu w MGM zwierząt grupy FF (*Fest.* Felopa) była zbliżona (2,12 mg/kg) do koncentracji retinolu w mięsie tryczków żywionych dawką FP (2,26 mg/kg) przy

pobraniu β-karotenu niższym o około 56 mg/dobę. Najmniejszą koncentracją retinolu charakteryzowały się próbki mięsa tryczków żywionych dawką zawierającą kiszonkę z życicy mieszańcowej (RB), a pobranie β-karotenu przez zwierzęta tej grupy było wyższe niż w FF (321,5 mg/dobę vs 274 mg/dobę). Niektóre dane piśmiennictwa wskazują, że karoteny kiszonki mogły być bardzo słabo wykorzystane (Jordan i in., 1963). Powyższe wskazuje potrzebę kontynuacji badań, szczególnie z wykorzystaniem kiszonki z życicy mieszańcowej.

Uzyskane w badaniach własnych wyniki wskazywały, że większe spożycie tokoferoli oraz β-karotenu przez tryczki nie zawsze skutkowało większą koncentracją tokoferoli i retinolu w mięsie. Najwięcej tokoferoli stwierdzono w mięsie tryczków żywionych dawkami pokarmowymi opartymi na kiszonkach z *Festulolium* odmian Felopa i Paulita. Efekty żywienia zwierząt dawką zawierającą *Fest.* odmiany Becva (FB) były podobne do dawki z udziałem życicy mieszańcowej (nieznacznie więcej tokoferoli i retinolu w mięsie). Kiszonki z odmian *Festulolium* mogą stanowić cenny komponent w żywieniu tryczków, jednak efekty żywienia zależą od zastosowanej odmiany *Festulolium*.

3.2. Doświadczenie 2 (publikacja 1: Wpływ różnych pasz treściwych na zawartość tokoferoli, β-karotenu i retinolu w wątrobach i mięsie danieli hodowlanych (*Dama dama L.*)

Wyniki licznych badań wskazują, że koncentracja witaminy E w mięsie i wątrobie gospodarskich zwierząt przeżuwających jest zależna od wielkości spożytego składnika (Yang i in., 2002; Jose i in., 2016; Ponnampalam i in., 2017; Bellés i in., 2018). Wyniki niniejszego doświadczenia korespondują z tym stwierdzeniem, co jednak nie zostało potwierdzone statystycznie. Zawartość α-tokoferolu oraz sumy tokoferoli w wątrobie danieli żywionych dawką z udziałem granulowanej mieszanki paszowej (HG) była większa niż w wątrobie danieli grupy kontrolnej (HO) (odpowiednio o około 37% i 48%) oraz danieli

żywionych dawką z udziałem koncentratu białkowego (HOP) (o około 19% i 39%). Należy jednak zaznaczyć, że żywienie danieli dawką z udziałem koncentratu białkowego (HOP), zawierającą więcej witaminy E (wszystkich form jak i sumy tokoferoli) w porównaniu z dawką z ziarnem owsa (HO) nie wpłynęło na zwiększenie zawartości witaminy E w wątrobie danieli grupy HOP. Z kolei zawartość α-tokoferolu jak i sumy tokoferoli w MLD danieli żywionych mieszanką zasobniejszą w α-tokoferol, niż pozostałe zestawy pasz (HG vs. HO, HOP) była większa w porównaniu z próbkami MLD zwierząt grupy HO (odpowiednio o około 5% i 20%) oraz grupy HOP (o około 3,5% i 18%), jednak analiza statystyczna nie potwierdziła otrzymanych różnic. W niniejszej pracy próbki MLD zawierały 0,94-1,15 mg/kg sumy tokoferoli. W piśmiennictwie brakuje informacji z zakresu zawartości tokoferoli w mięsie danieli. Według danych piśmiennictwa zawartość tokoferoli w mięsie innych gatunków jeleniowatych jest większa w porównaniu z wynikami badań własnych. Przykładowo u jeleni szlachetnych żywionych pastwiskowo, zawartość witaminy E w MLD wynosiła 4,4-5,6 mg/kg (Purchas i in., 2010), a u reniferów żywionych granulowaną mieszanką paszową 5,36-5,5 µg/g (Sampels i in., 2005).

W niniejszej pracy próbki wątrób danieli nie zawierały β-karotenu, który jest szybko przekształcany do retinolu w wątrobach wielu gatunków zwierząt, w tym u jeleniowatych (Yang i in., 1992; Schweigert i in., 1998; Darwish i in., 2015). Wielkość odkładania tych związków w tkankach zależy przede wszystkim od żywienia (Alvarez i in., 2015), w tym od suplementacji witamin A i E (Kasapidou, 2009) lub interakcji pomiędzy karotenoidami i tokoferolami (Yang i in., 2002). Alosilla i in. (2007) podają, że dostępność witaminy A jest ograniczona u przeżuwaczy z powodu strat w żwaczu, które są szczególnie wysokie, gdy przeżuwacze są karmione dietą o wysokiej zawartości pasz treściwych. Jak podkreślają Majchrzak i in. (2006) występuje duże zróżnicowanie zawartości witaminy A w wątrobach zwierząt gospodarskich. Istnieje niewiele danych piśmiennictwa dotyczących koncentracji

retinolu w tkankach jeleniowatych, a dostępne wyniki są zróżnicowane. W niniejszym doświadczeniu wyniki analizy statystycznej potwierdziły istotnie większą zawartość retinolu w próbkach wątroby pochodzących od danieli żywionych dawkami zawierającymi wysokobiałkowe pasze treściwe (koncentrat białkowy, granulowana mieszanka paszowa, $p<0,01$). Próbki wątrób danieli żywionych dawką składającą się z siana, ziarna owsa i koncentratu białkowego zawierały z kolei znacznie więcej retinolu (85,89 mg/kg HOP vs 49,12 mg/kg HO), pomimo zbliżonej koncentracji prowitaminy witaminy A (β-karotenu) w dawkach pokarmowych (23,50 mg/kg SM HOP i 22,54 mg/kg SM HO). Zawartość retinolu w próbkach MLD danieli żywionych sianem i owsem (HO), i danieli żywionych mieszanką z koncentratem białkowym (HOP, odpowiednio 0,08 i 0,31 mg/kg) była wielokrotnie mniejsza niż w próbkach mięsa danieli żywionych dawką z udziałem granulowanej mieszanki paszowej (2,43 mg/kg, HG). Należy podkreślić, że dawka HG była około dwukrotnie zasobniejsza w β-karoten tj. prowitaminę witaminy A, niż pozostałe, oceniane dawki (43,39 vs. 22,54 i 23,50 mg/kg DM).

Wątroby danieli żywionych dawkami pokarmowymi zawierającymi pasze treściwe (koncentrat białkowy lub granulowaną mieszankę paszową) zawierały więcej retinolu niż próbki wątrób danieli żywionych dawką składającą się z siana i owsa. Udział różnych pasz treściwych w dawkach pokarmowych nie wpłynął na zróżnicowanie zawartości tokoferoli w MLD oraz wątrobach danieli, jednak skarmianie paszy zasobniejszej w tokoferole przyczyniło się do nieco większej koncentracji α-tokoferolu oraz sumy tokoferoli w ocenianych tkankach zwierząt, co sugeruje kontynuację badań.

4. Wnioski

- Kiszonki z odmian *Festulolium* mogą stanowić cenny komponent w żywieniu tryczków.

- Mięso tryczków żywionych dawkami z udziałem kiszonek z *Festulolium* (odmian Becva, Felopa lub Paulita) zawierało więcej witamin E i A w porównaniu z mięsem tryczków żywionych dawką z kiszonką z życicy mieszańcowej (RB).

- Koncentracja tokoferoli i retinolu w próbkach mięsa tryczków różniła się w zależności od zastosowanej odmiany *Festulolium* w dawce pokarmowej. Największą koncentrację tokoferoli oraz retinolu zawierały próbki mięsa tryczków żywionych dawkami z kiszonkami *Festulolium* odmian Felopa lub Paulita. Koncentracja badanych witamin w mięsie tryczków grupy FB (*Fest*. odm. Becva) była niewiele wyższa niż w mięsie zwierząt grupy RB (życica mieszańcowa).

- Włączenie pasz treściwych (koncentrat białkowy, granulowana mieszanka paszowa) do dawek pokarmowych wykorzystywanych w żywieniu danieli wpłynęło na zwiększenie koncentracji retinolu w wątrobie oraz nie wpłynęło na koncentrację witaminy A i E w mięsie danieli.

- Większe pobranie tokoferoli oraz β-karotenu nie zawsze skutkowało większą koncentracją tokoferoli i retinolu w mięsie owiec. Próbki wątrób danieli żywionych dawkami bogatszymi w β-karoten cechowały się wyższą koncentracją retinolu.

5. Spis piśmiennictwa

- AOAC International. *Official Methods of Analysis of AOAC International*; AOAC International: Washington, DC, USA, 2016.
- Alosilla, C.E.; McDowell, L.R.; Wilkinson, N.S.; Staples, C.R.; Thatcher, W.W.; Martin, F.G.; Blair, M. Bioavailability of vitamin A sources for cattle. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 1235–1238.
- Álvarez R.; Meléndez-Martínez A.J.; Vicario I.M.; Alcalde M.J. Carotenoids and fat-soluble vitamins in horse tissues: a comparison with cattle. *Animal*. **2015**, *9(7)*, 1230-1238.
- Bellés, M.; Leal, L.N.; Díaz, V.; Alonso, V.; Roncalés, P.; Beltrán, J.A. Effect of dietary vitamin E on physicochemical and fatty acid stability of fresh and thawed lamb. *Food Chem.* **2018**, *239*, 1–8.
- Chauveau-Duriot, B.; Doreau, M.; Noziere, P.; Graulet, B. Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Anal. Bioanal. Chem*. **2010**, *397(2)*, 777-790.
- Chiari, M.; Cortinovis, C.; Bertoletti, M.; Alborali, L.; Zanoni, M.; Ferreti, E. Lead, cadmium and orgaochlorine pesticide residues in hunted red deer and wild boar from northern Italy. *Food Addit. Contam.* **2015**, *32*, 1867–1874.
- Darwish, W.S.; Ikenaka, Y.; Morshdy, A.E.; Eldesoky, K.I.; Nakayama, S.; Mizukawa, H.; Ishizuka, M. β-carotene and retinol contents in the meat of herbivorous ungulates with a special reference to their public health importance. *J. Vet. Med. Sci.* **2016**, *78*, 351–367.
- Debier, C., Larondelle, Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br. J. Nut*. **2005**, *93(2)*, 153-174.
- De Quirós, A.R.B.; Costa, H.S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 97–111.
- Dunne, P.G.; Monahan, F.J.; O'mara, F.P.; Moloney, A.P. Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: A review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history. *Meat Sci*. **2009**, *81(1)*, 28-45.
- Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, **2010**.
- Eriksson, S.F.; Pickova, J. Fatty acids and tocopherol levels in M. *Longissimus dorsi of beef cattle in Sweden-A comparison between seasonal diets. Meat Sci.* **2007**, *76*, 746–754.
- Flis, M. Dziczyzna jako źródło żywności, prawno-ekonomiczne aspekty wprowadzania na rynek. *Prz. Hod.* **2016**, *6*, 29–31.
- Florek, M.; Drozd, L. Związki bioaktywne w mięsie jeleniowatych. *Med. Wet.* **2013**, *69*, 535–539.

- Högberg, A.; Pickova, J.; Babol, J.; Andersson, K.; Dutta, P.C. Muscle lipids, vitamins E and A, and lipid oxidation as affected by diet and RN genotype in female and castrated male Hampshire crossbreed pigs. *Meat Sci.* **2002**, *60*, 411–420.
- Jordan, H.A.; Smith, G.S.; Neumann, A.L.; Zimmerman, J.E.; Breniman, G.W. Vitamin A nutrition of beef cattle fed corn silages. *J. Anim. Sci.* **1963**, *22(3)*, 738-745.
- Jose, C.G.; Jacob, R.H.; Pethick, D.W.; Gardner, G.E. Short term supplementation rates to optimise vitamin E concentration for retail colour stability of Australian lamb meat. *Meat Sci.* **2016**, *111*, 101–109.
- Kalač, P. 2012 Carotenoids, ergosterol and tocopherols in fresh and preserved herbage and their transfer to bovine milk fat and adipose tissues: A review. *J. Agrobiol.* **2012**, *29(1)*, 1.
- Kasapidou, E.; Enser, M.; Wood, J.D.; Richardson, R.I.; Wilkinson, R.G.; Sinclair, L.A. Influence of vitamin E supplementation and basal diet on the vitamin E status, performance and tissue fatty acid concentration in lambs. *Animal*. **2009**, *3(4)*, 516-526.
- Kitczak, T.; Jänicke, H.; Bury, M.; Malinowski, R. The Usefulness of Mixtures with Festulolium braunii for the Regeneration of Grassland under Progressive Climate Change. *Agriculture*. **2021**, *11(6)*, 537.
- Luciano, G.; Natalello, A.; Mattioli, S.; Pauselli, M.; Sebastiani, B.; Niderkorn, V., Copani, G.; Benhissi, H.; Amanpour, A.; Valenti, B. Feeding lambs with silage mixtures of grass, sainfoin and red clover improves meat oxidative stability under high oxidative challenge. *Meat Sci.* **2019**, *156*, 59-67.
- Majchrzak, D.; Fabian, E.; Elmadfa, I. Vitamin A content (retinol and retinyl esters) in livers of different animals. *Food Chem.* **2006**, *98*, 704–710.
- Milewski, S.; Purwin, C.; Pysera, B.; Lipiński, K.; Antoszkiewicz, Z.; Sobiech, P., Ząbek, K.; Fijałkowska, M.; Tański, Z.; Illek, J. Effect of feeding silages from different plant raw materials on the profile of fatty acids, cholesterol, and vitamins A and E in lamb meat. *Acta Vet. Brno*. **2014**, *83(4)*, 371-378.
- Nozière, P., Graulet, B., Lucas, A., Martin, B., Grolier, P., Doreau, M. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci.Tech.* **2006**, *131(3-4)*, 418-450.
- Pilarczyk, B.; Tomza-Marciniak, A.; Pilarczyk, R.; Udała, J.; Kruzhel, B.; Ligocki, M. Content of essential and non-essential elements in wild animals from western Ukraine and the health risks associated with meat and liver consumption. *Chemosphere* **2020**, *244*, 125506.
- *Polish Standard PN-EN ISO 14565*; Feedstuffs. Determination of vitamin A by high-performance liquid chromatography. Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, **2002**.
- *Polish Standard PN-EN ISO 6867*; Feedstuffs. Determination of vitamin E by high-performance liquid chromatography. Polish Committee for Standardization: Warsaw, Poland, **2002**.

- Ponnampalam, E.N.; Plozza, T.; Kerr, M.G.; Linden, N.; Mitchell, M.; Bekhit, A.E.-D.A.; Jacobs, J.L.; Hopkins, D.L. Interaction of diet and long ageing period on lipid oxidation and colour stability of lamb meat. *Meat Sci.* **2017**, *129*, 43–49.
- Purchas, R.W.; Triumf, E.; Egelandsdal, B. Quality characteristics and composition of the longissimus muscle in the short-loin male and female farmed red deer in New Zealand. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 505–510.
- Razmaitė, V.; Pileckas, V.; Šiukščius, A.; Juškiene, V. Fatty acid composition of meat and edible offal from free-living red deer (*Cervus elaphus*). *Foods* **2020**, *9*, 923.
- Rozporządzenie Rady (WE) nr 1099/2009 z dnia 24 września 2009 r. w sprawie ochrony zwierząt podczas ich uśmiercania. Dz. U. L. **2009**, 303.
- Sampels, S. Fatty acids and antioxidants in Reindeer and Red deer. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, **2005**.
- Schweigert, F.J. Metabolism of carotenoids in mammals. In *Carotenoids*. *Volume 3: Biosynthesis*; Britton, G. Liaaen-Jensen, S., PFander, H., Birkhäuser, Verlag Basel: Berlin, Germany, **1998**; pp. 249-284.
- Semwogerere, F.; Katiyatiya, C.L.; Chikwanha, O.C.; Marufu, M.C.; Mapiye, C. Bioavailability and bioefficacy of hemp by-products in ruminant meat production and preservation: A review. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 572906.
- Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych. Dz. U. **2015**, 266.
- Van Soest, P.V.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **1991**, *74*, 3583–3597.
- Xu, Z. Comparison of extraction methods for quantifying vitamin E from animal tissues. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 8705–8709.
- Yang, A.; Larsen, T.W.; Tume, R.K. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Aust. J. Agric. Res.* **1992**, *43(8)*, 1809-1817.
- Yang, A.; Brewster, M.J.; Lanari, M.C.; Tume, R.K. Effect of vitamin E supplementation on α-tocopherol and β-carotene concentrations in tissues from pasture-and grain-fed cattle. *Meat Sci.* **2002**, *60*, 35–40.

Artykuły 1 i 2