

Šolski center Celje

Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo

**DOLOČANJE KOLIČINE HOLESTEROLA V KOKOŠJIH
JAJCIH RAZLIČNE REJE**

raziskovalna naloga

Avtor:

Jaša JAKOP, K-4.a

Mentorica:

Aleksandra FERENC,
dipl. inž. kem. tehnol.

Mestna občina Celje, Mladi za Celje

Celje, 2023

Šolski center Celje

Srednja šola za kemijo, elektrotehniko in računalništvo

**DOLOČANJE KOLIČINE HOLESTEROLA V KOKOŠJIH
JAJCIH RAZLIČNE REJE**

raziskovalna naloga

Avtor:

Jaša JAKOP, K-4.a

Mentorica:

Aleksandra FERENC,
dipl. inž. kem. tehnol.

Mestna občina Celje, Mladi za Celje

Celje, 2023

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici ge. Aleksandri Ferenc za pomoč in nasvete pri snovanju poteka dela in tudi med samim delom.

Za pomoč pri uporabi programa Word in nasvete pri oblikovanju naloge bi se rad zahvalil sošolcema Matiji Florjanu in Sebastjanu Turnšku, slednji mi je prav tako dal domača jajca, ki sem jih uporabil pri nalogi.

Zahvaljujem se tudi družini, ki mi je ves čas izkazovala zanimanje za potek dela ter za stalno podporo tekom šolanja.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	6
1 UVOD.....	7
2 TEORETIČNE OSNOVE	8
2.1 Teoretične osnove preiskovanega vzorca	8
2.1.1 Kokošja jajca	8
2.1.2 Holesterol	9
2.2 Teoretične osnove metod dela	11
2.2.1 Ekstrakcija	11
2.2.2 Spektrofotometrija	12
2.2.3 Liebermann-Burchardova reakcija	12
3 PRAKTIČNI DEL	13
3.1 Potrebščine.....	13
3.1.1 Vzorci	13
3.1.2 Inventar	14
3.1.3 Kemikalije	14
3.2 Varnost pri delu in skrb za okolje	14
3.3 Postopki dela.....	15
3.3.1 Izdelava umeritvene krivulje	15
3.3.2 Priprava rumenjakov za nadaljnjo analizo.....	16
3.3.3 Ekstrakcija in obarvanje holesterola rumenjakov.....	18
3.3.4 Merjenje absorbance vzorcev na spektrofotometru.....	19
4 MERITVE IN IZRAČUNI	20
4.1 Izračun mase holesterola in volumna kloroforma za pripravo umeritvene krivulje ..	20
4.2 Meritve mas jajc in rumenjakov	20
4.3 Izračun mase jajc	21
4.4 Izmerjene absorbance	21
4.5 Izračunane mase holesterola na 1 gram rumenjaka	21
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	23
6 ZAKLJUČEK	25
7 LITERATURA	26

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura kokošnjega jajca	9
Slika 2: Stereokemična formula holesterola	10
Slika 3: Shematski prikaz ekstrakcije tekoče-tekoče.....	11
Slika 4: Delovanje spektrofotometra	12
Slika 5: Kokošje jajce iz baterijske reje	13
Slika 6: Kokošje jajce iz proste reje	13
Slika 7: Kokošje jajce iz talne reje	13
Slika 8: Kokošje jajce iz hlevske reje.....	13
Slika 9: Tehtanje holesterola na analizni tehtnici.....	15
Slika 10: Obarvanje v kivetah z vzorci.....	16
Slika 11: Tehtanje rumenjaka v epruveto	17
Slika 12: Epruvete s surovimi rumenjaki	17
Slika 13: Obarvanje ekstrahiranega holesterola	18
Slika 14: Primerjava obarvanja epruvete s holesterolom v primerjavi s slepim vzorcem.....	18
Slika 15: Primer izpisa izmerjenih absorbanc na spektrofotometru	19

KAZALO TABEL

Tabela 1: Potreben inventar za izvedbo vaje	14
Tabela 2: Kemikalije z nevarnostmi, ki so potrebne za vajo.....	14
Tabela 3: Izračunani potrebni volumni kloroforma, ki jih je potrebno dodati za dosego želenih masnih koncentracij	20
Tabela 4: Mase petrijevk, jajc in rumenjakov	20
Tabela 5: Mase jajc vseh rej v petrijevkah	21
Tabela 6: Absorbanca pripravljenih raztopin holesterola pri 680 nm	21
Tabela 7: Absorbanca vzorcev pridobljenih iz jajc različne reje.....	21
Tabela 8: Masa holesterola na gram rumenjaka iz posamezne reje	22
Tabela 9: Masa holesterola na gram rumenjaka iz posamezne reje	24

KAZALO GRAFIKONOV

Grafikon 1: Odvisnost absorbance od masne koncentracije holesterola v vzorcu	23
--	----

POVZETEK

Namen vaje je določiti količino holesterola v kokošjih jajcih iz različnih rej. Uporabili smo kokošja jajca talne, proste, baterijske in hlevske reje. V ta namen si najprej pripravimo standardno raztopino holesterola v kloroformu, katere koncentracijo poznamo. Z redčenjem te raztopine pripravimo vzorce za umeritveno krivuljo. Z dodatkom žveplove (VI) kisline in acetanhidrida raztopine obarvamo in jim izmerimo absorbanco na spektrofotometru. Približno 1 gram rumenjaka iz jajca vsake reje zatehtamo v posamezno epruveto. Rumenjakom dodamo kloroform in ekstrakt obarvamo z žveplovo (VI) kislino in acetanhidridom. Vzorcem izmerimo absorbanco na spektrofotometru in izračunamo količino holesterola v posameznih rumenjakih s pomočjo umeritvene krivulje. Po merjenju in izračunih smo ugotovili, da je največ holesterola bilo prisotnega v rumenjaku jajca talne reje, in sicer 18,98 mg/g rumenjaka. Najmanj holesterola je vseboval rumenjak iz jajca hlevske reje. Ta je vseboval 15,87 mg holesterola/g rumenjaka. Na količino holesterola v jajcu lahko vpliva pasma in starost kokoši, prehrana, stres, ki ga kokoš doživlja, starost jajca ...

1 UVOD

V današnjih časih so v porastu krvožilne bolezni, zato strokovnjaki pogosto opozarjajo ljudi na pravilno prehrano. Pri tem se pogosto omenja tudi holesterol in njegov vpliv na zdravje. Velikokrat lahko zasledimo članke o »dobrem« in »slabem« holesterolu in koliko ga moramo imeti. Eden največjih virov holesterola za človeka so kokošja jajca, natančneje rumenjaki iz kokošjih jajc. V 50 gramskem kokošnjem jajcu naj bi bilo okoli 186 mg holesterola, kar predstavlja več kot polovico dnevnega priporočenega vnosa holesterola. Zaradi tega strokovnjaki priporočajo ljudem naj ne pojedjo več kot enega jajca na dan. Z zmanjšanjem vnosa hrane, ki vsebuje veliko holesterola, se naj bi zmanjšala količina le-tega v krvnem obtoku. Vendar holesterol ni samo slab za človeka. Je ključen del v celičnih membranah, kjer omogoča prožnost membran. Ločimo LDL in HDL holesterol. Molekula holesterola je v obeh primerih enaka, edina razlika je beljakovinski prenašalec, ki holesterol raznaša po žilah. LDL holesterol je slaba vrsta holesterola. Ta se nabira na stenah žil in s tem zvišuje pritisk ter povzroča druge zdravstvene težave. HDL holesterol je dobra vrsta holesterola, saj potuje po krvi nazaj v jetra, kjer se razgradi. Tudi sam rad jem kokošja jajca, zato me je zanimalo, če ima izbira jajca v trgovini vpliv na količino holesterola, ki ga bomo zaužili. Zanimal me je morebiten vpliv načina reje kokoši na količino holesterola v jajcih, ki jih znese.

Za določitev holesterola sem uporabil štiri jajca različnih rej, in sicer iz hlevske, talne, proste in baterijske reje. Tiste iz baterijske reje mi je dal sošolec (so domače), ostale sem kupil v trgovini. Najprej sem moral ločiti rumenjake od beljakov in nato dobiti holesterol iz rumenjakov. Zasledil sem, da je holesterol zelo dobro topen v kloroformu, zato sem se odločil, da bom izvedel ekstrakcijo holesterola s pomočjo kloroforma. Vendar izlužiti holesterol iz rumenjaka ni bilo dovolj, moral sem tudi določiti njegovo količino. Pozanimal sem se o temi in izvedel za Liebermann-Burchardovo reakcijo, kjer holesterolu, ki je raztopljen v kloroformu, dodamo žveplovo (VI) kislino in acetanhidrid. Če je prisoten holesterol, se tvori modro-zeleno obarvanje. Poleg kvalitativne analize se ta reakcija lahko uporablja tudi za kvantitativno analizo, kajti obstaja linearna zveza med koncentracijo holesterola v raztopini, ki smo jo obarvali in absorpcijo svetlobe. Več kot je prisotnega holesterola, bolj intenzivno se bo raztopina obarvala, zato bo tudi manj svetlobe prešlo skozi. Absorpcijo svetlobe lahko merimo na spektrofotometru, zato sem se odločil, da bom obarvani holesterol kvantitativno določil s pomočjo spektrofotometrije. Nisem vedel, koliko holesterola je v rumenjaki, zato sem moral določiti povezavo med absorpcijo svetlobe in koncentracijo holesterola v raztopini. V ta namen sem se odločil pripraviti raztopino holesterola, ki vsebuje poznano količino holesterola ter z redčenjem te raztopine pripraviti manj koncentrirane raztopine. S temi raztopinami sem izdelal umeritveno krivuljo, s pomočjo katere sem izračunal količino holesterola v uporabljenih jajcih.

Pred izvedbo raziskovalne naloge sem si postavil naslednje hipoteze:

1. Med koncentracijami holesterola v posameznih jajcih ne bo velikih razlik.
2. Z večanjem koncentracije holesterola v vzorcu bo ta temnejše barve.
3. Jajca iz proste reje bodo vsebovala najmanj holesterola, saj so takšne kokoši izpostavljene stresu v manjši meri glede na kokoši iz ostalih vrst rej.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Teoretične osnove preiskovanega vzorca

2.1.1 Kokošja jajca

Jajca v naravi nosijo pomembno vlogo pri razmnoževanju ptičev, plazilcev, nekaterih rib, žuželk in sesalcev. Kokošja jajca so reproduktivna telesa, ki lahko vsebujejo razvijajoči se embrio. Sestavljena so iz jajčne lupine, zračnega mehurčka, dveh membran, rumenjaka, beljaka, halaze in germinalnega diska.

Jajčno lupino sestavljajo predvsem kristali kalcijevega karbonata, ki so utrjeni z beljakovinsko matrico. Ta matrica povezuje kristalno strukturo, ki bi sicer bila prekrhka, da bi obdržala svojo obliko, vendar ima tudi vlogo pri odlaganju kalcija med kristalizacijo. Za tvorbo jajca je potrebno veliko kalcija, ki ga kokoš prejme z ustrezno prehrano. Lupina ščiti vsebino jajca pred mehanskimi poškodbami in prehajanju mikroorganizmov v jajce, vendar vseeno omogoča prehajanje zraka in vode med jajcem in okoljem.

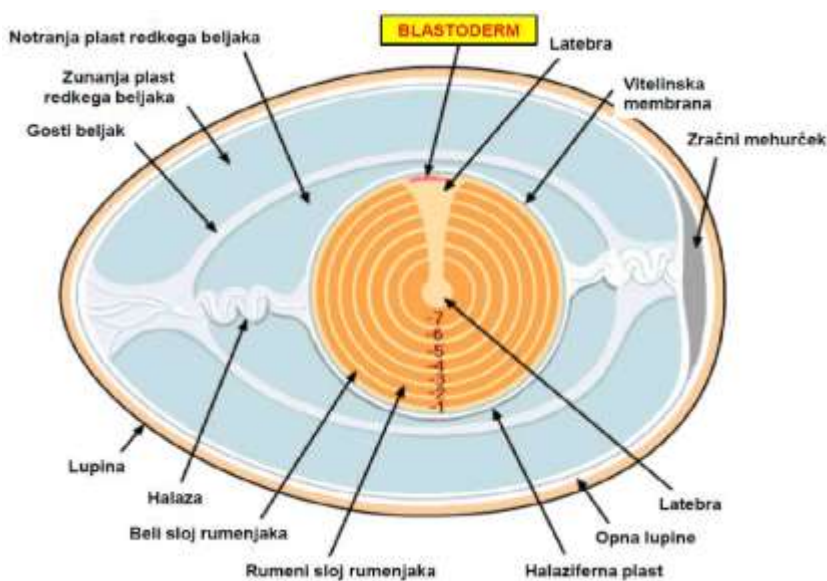
Zračni mehurček se nahaja na dnu jajca, se pravi v širšem delu. Nastane kot posledica ohlajanja in skrčenja vsebine jajca po izvalitvi. Velikost zračnega mehurčka je povezana s starostjo jajca. Zaradi por v jajčni lupini se s časom količina zraka v jajcu veča, s tem se pa veča tudi mehurček. Z velikostjo le-tega se določa starost jajca. To je tudi vzrok, da starejša jajca plavajo v vodi, medtem ko sveža jajca potonejo, saj je v njih manj zraka.

Lupino in beljak ločujeta dve membrani, ki sta večinoma sestavljeni iz beljakovin. Ena izmed teh je tudi keratin, ki daje odpornost proti raztegljivosti. Zunanja membrana nudi dodatno oporo jajčni lupini, medtem ko notranja membrana obdaja beljak. Obe membrani ščitita vsebino jajca pred patogenimi organizmi. Skozi čas se ti dve membrani ločita. Jajčne membrane se večinoma uporabljajo kot prehrabna dopolnila v praškasti obliki.

Beljak je prozorna tekočina v jajcu, ki obdaja rumenjaka. Ta je lahko v jajcu oplojen ali neoplojen. Beljak ima vlogo zaščite rumenjaka, v kolikor je pa ta oplojen, pa nudi tudi dodatne hranilne snovi za razvoj zarodka v rumenjaku. Prav tako vsebuje encim lizocim, ki ščiti rumenjaka pred mikroorganizmi. Sestavljen je večinoma iz vode, ki predstavlja okoli 90 %, okoli 10 % pa predstavljajo beljakovine. Vsebuje zelo malo ogljikovih hidratov in maščob, ne vsebuje pa holesterola. Glavne tri skupine beljakovin v beljaku so albumini, globulini in mukoproteini. Zaradi teh beljakovin ima beljak uporabno vrednost ne samo v kulinariki, temveč tudi v industriji in medicini. Med albumini predstavlja več kot 50 % ovoalbumin, ki ima pomembno vlogo pri proizvodnji cepiv, kjer se uporablja kot antigen. Ima posebne biološke lastnosti, ki delujejo proti raku, povišanem krvnem tlaku in antioksidativno. Ob denaturaciji z visokimi temperaturami ima tudi antimutagene lastnosti. Pri imunoloških testih se uporabljajo kot sprožilci kemijskih reakcij. Beljakovine iz beljaka se uporabljajo predvsem v prehrabni in farmacevtski industriji. V prehrabni industriji se uporabljajo praški iz beljaka, ki služijo za povezovanje različnih sestavin in za boljšo disperzijo oljnih emulzij. Beljak je tudi uporabljen za zbistritev in stabilizacijo vina. V kulinariki se beljaki pogosto stepajo, kjer se beljakovine, iz katerih je beljak, denaturirajo in koagulirajo ter tvorijo belo peno. Zaradi sil se vezi v beljakovinah pretrgajo in molekule se razpletejo. Prav tako pride vmes zrak, ki daje beljaku volumen.

Rumenjak je osrednji del jajca, ki je rumene barve. Predstavlja približno tretjino teže jajca. Suspendiran je v beljaku, kjer je s pomočjo halaze drži v enakem položaju. Halaza je vrstica, ki je na obeh straneh rumenjaka pritrjena na notranjo membrano jajca. Sestavljena je iz vlaken, ki

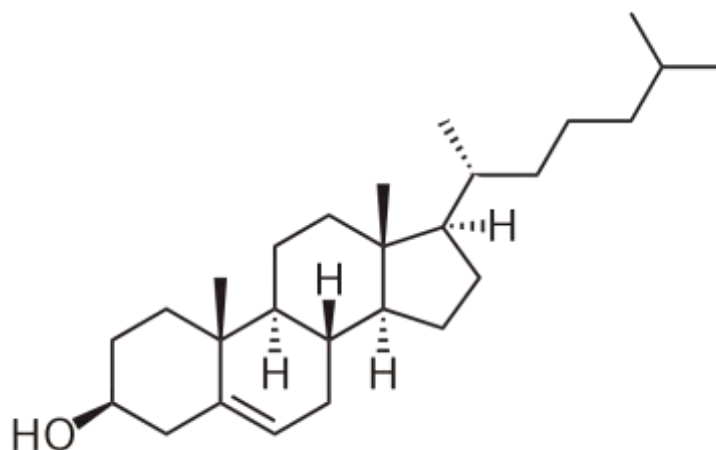
so iz posebnih beljakovin, imenovane mucini. Na rumenjaku se nahaja tudi germinalni disk. To je mesto na rumenjaku, kjer se razvije blastoderm po oploditvi. Izgleda kot majhna bela pika, ki se nahaja na površju rumenjaka. Če je jajce oplojeno, se na germinalnem disku pričnejo deliti celice, iz katerih nastane nov organizem. Sam rumenjak je obdan s posebno membrano, ki mu daje obliko, nudi zaščito in ga ločuje od beljaka. Ta membrana je sestavljena iz dveh beljakovinskih slojev. Glavna vloga samega rumenjaka je zalagati embrio s hranilnimi snovmi, ki so nujne za njegov razvoj in rast. Zaradi tega je rumenjak energijsko najbolj bogat del jajca. Vsebuje večino beljakovin, maščob ter vitaminov in mineralov jajca. Približno polovica rumenjaka je tekočega, drugo polovico pa sestavljajo trdne snovi. V rumenjaku lahko najdemo vse vitamine, ki so topni v maščobah (vitamini A, D, E in K). Rumenjak je eden izmed redkih virov vitamina D. Prisotni so še drugi vitamini ter nekateri minerali, kot so kalcij, cink, fosfor, železo ... Okoli tretjino rumenjaka predstavljajo lipidi, kjer so v večini oleinska, palmitinska in linolejna maščobna kislina in emulgatorji, ki maščobni del povezujejo s tekočim delom. Med emulgatorji v rumenjaku je najbolj razširjen lecitin, ki se skupaj z oljem iz jajca uporablja v farmacevtski in kozmetični industriji. Med beljakovinami v rumenjaku so lipoproteini majhne in velike gostote, fosvitin in livetin. To so pomembne beljakovine, saj vsebujejo vseh 9 esencialnih aminokislin, torej aminokislin, ki jih naše telo ne more samo proizvesti. Rumena barva rumenjaka izhaja iz posebne skupine barvil, ki se imenuje karotenoidi. Pod karotenoide spadajo karoteni in ksantofili, ki dajejo rumene in oranžne barve. V rumenjaku sta ksantofila lutein in zekasantin. Rumenjak se pogosto uporablja v prehranski industriji kot emulgator (npr. v majonezi) in kot pomembna sestavina v številnih vrstah hrane.



Slika 1: Struktura kokošnjega jajca
(Vir: http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/zootehnika/vs_savsek_peter.pdf)

2.1.2 Holesterol

Holesterol je sestavina vseh živalskih celic (razen nekaterih nevretenčarjev) in je pomemben del celične membrane, kjer skrbi za njeno stabilnost ter tekoče lastnosti. Gre za voskasto snov, ki se prav tako nahaja v krvni plazmi in živalskih tkivih. Holesterol je organska molekula z molekulsko formulo $C_{27}H_{46}O$. Spada pod lipide, natančneje je klasificiran kot sterol oz. kot molekula, ki izvira iz steroidov. Sestavljen je iz centralnega sterolnega jedra, ki ga gradijo štirje ogljikovi obroči. Na jedro je vezana veriga ogljikovodikov ter hidroksilna skupina, ki daje holesterolu končnico -ol.



Slika 2: Stereokemična formula holesterola
(Vir: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cholesterol>)

Holesterol je bil prvič izoliran v trdni obliki leta 1769 iz žolčnih kamnov. V trdnem stanju ima holesterol obliko belega kristaliničnega praška, ki je brez vonja ali okusa. V telesu se načeloma nahaja v celičnih membranah, kjer predstavlja kar 30 % vseh snovi. V membrani se suče tako, da je polarna –OH skupina obrnjena navzven, medtem ko sta nepolarni rep s steroidnim delom obrnjena v notranjost celične membrane. Do tega pride zaradi polarnega značaja vode, ki obdaja celico. Ta privlači polarni del holesterola. Nepolarni del holesterola vpliva na prepustnost membrane, kjer zmanjšuje prepustnost za natrijeve in vodikove ione ter nekatere nevtralne topljence. Poleg tega ima vlogo v sintezi steroidnih hormonov (vsi so derivati holesterola), vitamina D in žolčne kisline. Holesterol se sintetizira v telesu predvsem v jetrih in prebavilih, vendar v večjih merah nastaja tudi v razmnoževalnih organih, v možganih ter nadledvičnih žlezah. V celicah se sintetizira v procesu, ki ga sestavlja 37 kemijskih reakcij.

Ko se holesterol sintetizira (v telesu) ali absorbira (v črevesju, vendar je njegova absorpcija zelo majhna), potuje po telesu po krvnem obtoku. Zaradi hidrofobne narave holesterola je za njegov transport po krvi potrebna vezava z lipoproteinom. Lipoproteini so beljakovine, ki se vežejo z lipidi, zato da se lahko ti transportirajo po krvi. Poleg holesterola se vežejo s trigliceridi ter fosfolipidi. Ti v krvni obtok vstopajo kot lipoproteini zelo majhne gostote, ki jih označujemo s kratico VLDL. Ta vrsta lipoproteinov se razgradi v manjše lipoproteine majhne gostote z visoko koncentracijo holesterola. Označujemo jih s kratico LDL. Poznamo pa tudi lipoproteine z veliko gostoto, ki jih označujemo s kratico HDL. Ti imajo funkcijo odnašanja lipidov iz celic nazaj v jetra, v kolikor je v telesu preveč holesterola. Na podlagi tega ločimo VLDL, LDL in HDL holesterol. LDL holesterol se smatra za slabo vrsto holesterola. Prevelike količine LDL holesterola v krvnem obtoku lahko vodijo v zdravstvene težave, kot so npr. povišan krvni tlak, bolečine v prsnem košu, v obolenja ledvic, lahko pa povzroči tudi srčni infarkt. VLDL holesterol se tudi povezuje z LDL, saj večja količina VLDL holesterola pomeni, da prehaja v krvni obtok več holesterola, ki se lahko nabira na stenah žil. HDL je smatran za dobri holesterol, saj je to vrsta holesterola, ki zapušča krvni obtok.

Zdrava odrasla oseba ima 125 – 200 mg holesterola/dL. Eno veliko kokošje jajce vsebuje okoli 186 mg holesterola, ki se ves nahaja v rumenjaku. Zdrava oseba zato lahko poje 1 kokošje jajce na dan in s tem ne tvega prevelikih koncentracij holesterola v krvi.

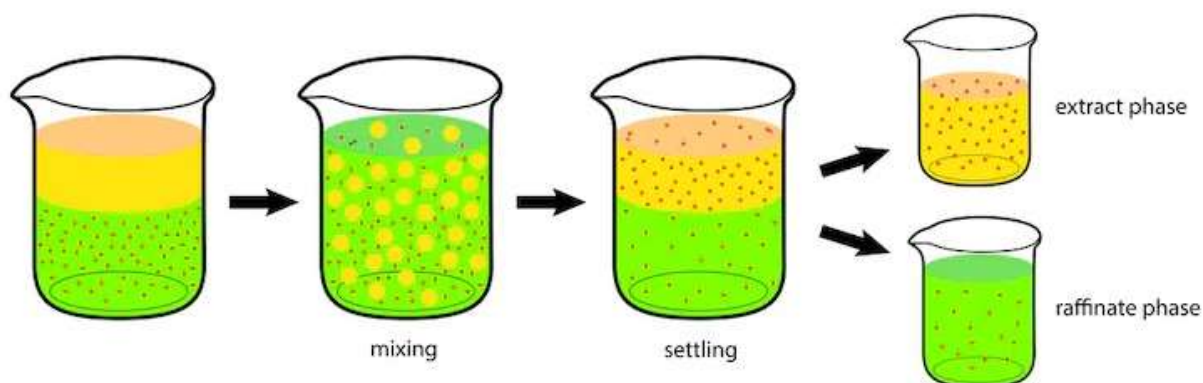
2.2 Teoretične osnove metod dela

2.2.1 Ekstrakcija

Ekstrakcija je separacijska metoda, kjer se določena komponenta izluži iz zmesi komponent. Glede na agregatno stanje ekstrakcijskega sredstva (topila) in snovi, ki jo ekstrahiramo, ločimo ekstrakcijo trdnih snovi ter ekstrakcijo tekoče-tekoče. Pri ekstrakciji trdnih snovi izlužimo iz trdne snovi topni ekstrakt tako, da snov in topilo dobro premešamo in pustimo nekaj časa stati v ekstraktorju. Ekstrakt nato preide v ekstraktno fazo – topilo in v njem raztopljena komponenta. Prvotna trdna snov, ki smo jo ekstrahirali, se sedaj imenuje ekstrakcijski ostanek oz. rafinat. Tega moramo ločiti od ekstraktne faze, zato si pomagamo še z drugimi postopki ločevanja (npr. s centrifugiranjem, filtriranjem, uparjanjem ...). Pri ekstrakciji tekoče-tekoče ločujemo eno tekočo fazo iz večkomponentne zmesi s topilom, ki pretežno raztaplja zahtevano komponento. Uporablja se, kadar destilacija ali rektifikacija nista mogoči, kar je lahko posledica temperaturne občutljivosti snovi ali pa da imajo le-te preblizu temperature vrelišč, da bi jih lahko ločili z destilacijo oz. rektifikacijo.

Na hitrost ekstrakcije lahko vplivamo na različne načine. Povišana temperatura pospeši ekstrakcijo. Paziti moramo, da je ne povišamo preveč, saj se topilo lahko prične uparjati ali pa pride do termičnega razkroja, v kolikor imamo temperaturno občutljive snovi. Povečanje ekstrakcijske površine tudi pospeši ekstrakcijo.

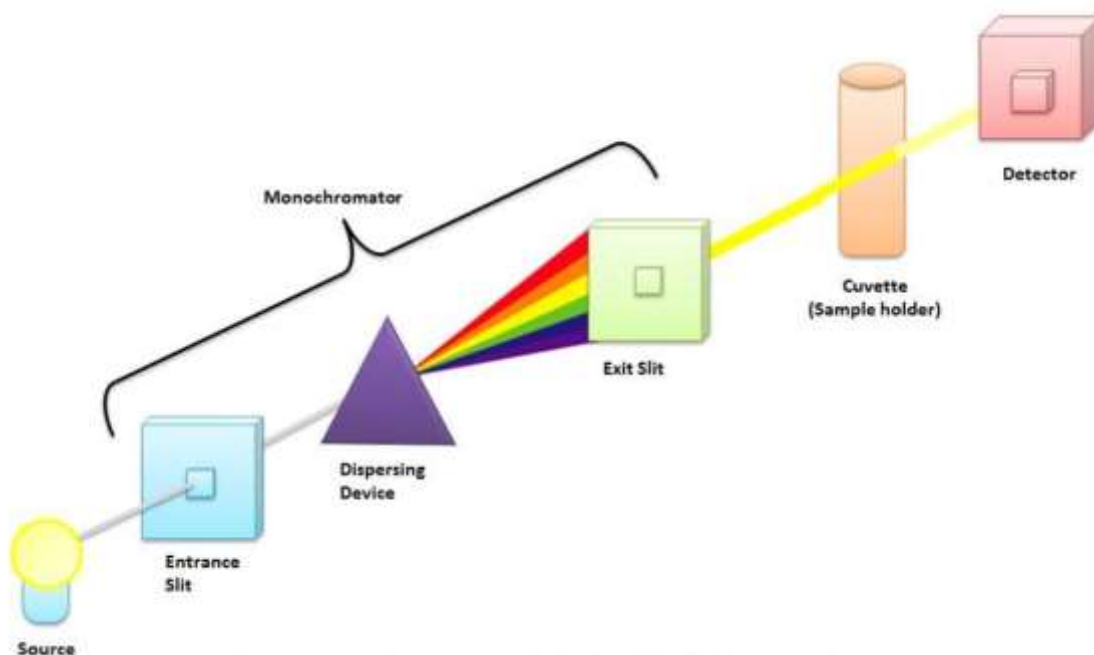
Topilo mora biti ustrezno izbrano. Pomembno je, da topilo raztaplja komponento, ki jo želimo ekstrahirati. Za ekstrakcijo holesterola je ustrezno topilo kloroform. Topilo mora biti inertno, da kemijsko ne reagira s snovjo. Zaželeno je tudi, da je topilo cenovno ugodno, nestrupeno, da ima čim manjšo temperaturo vrelišča (porabimo manj energije za njegovo uparjanje) ...



Slika 3: Shematski prikaz ekstrakcije tekoče-tekoče
(Vir: <https://chemicalengineeringworld.com/liquid-liquid-extraction/>)

2.2.2 Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je analizna metoda, ki spada mod molekulske absorpcijske spektrometrije, kamor spadata tudi kolorimetrija in fotometrija. Pri spektrofotometriji določamo koncentracijo obarvane raztopine tako, da merimo količino prepuščene in absorbirane svetlobe (oz. število fotonov) določene valovne dolžine. Pri spektrofotometriji se uporabljajo spektrofotometri – naprave, ki merijo jakost monokromatske svetlobe (svetloba, ki ima eno valovno dolžino), ko ta prehaja skozi vzorec. Poleg vidne svetlobe se pogosto uporabljata tudi ultravijolična in infrardeča svetloba za določanje absorbance. Večja koncentracija vzorca pomeni, da bo manj svetlobe prešlo skozi kiveto z vzorcem, torej se bo več svetlobe absorbiralo. Nekatere snovi so same po sebi obarvane, tako kot npr. nekateri ioni, medtem ko je druge snovi potrebno obarvati z dodatkom reagentov.



Slika 4: Delovanje spektrofotometra
(Vir: <https://namrataheda.blogspot.com/2013/>)

2.2.3 Liebermann-Burchardova reakcija

Liebermann-Burchardova reakcija se uporablja za dokazovanje holesterola. Holesterol se raztopi v kloroformu, doda se nekaj kapljic žveplove (VI) kisline in acetanhidrida. Po nekaj minutah se tvori modro-zeleno obarvanje, kar pomeni, da je holesterol prisoten. Obarvanje se pojavi, ker hidroksilna skupina na holesterolu reagira z dodanima kemikalijama. Prav tako je intenziteta obarvanja sorazmerna s koncentracijo holesterola v vzorcu, zato lahko spektrofotometrično izmerimo koncentracijo holesterola v vzorcu. Bolj intenzivno obarvanje pomeni večjo koncentracijo holesterola.

3 PRAKTIČNI DEL

3.1 Potrebščine

3.1.1 Vzorci

- rumenjak kokošnjega jajca iz baterijske reje (domača jajca)
- rumenjak kokošnjega jajca iz proste reje
- rumenjak kokošnjega jajca iz talne reje
- rumenjak kokošnjega jajca iz hlevske reje



Slika 5: Kokošje jajce iz baterijske reje



Slika 6: Kokošje jajce iz proste reje



Slika 7: Kokošje jajce iz talne reje



Slika 8: Kokošje jajce iz hlevske reje

Uporabil sem jajca štirih rej. Pri nalogi sem uporabil eno jajce iz vseh izbranih rej. Jajca iz baterijske reje so domača jajca. Na videz je bil rumenjak rumene barve, pri tej jajci se je pa tudi najbolje videla halaza. Uporabljeno jajce iz proste reje spada v velikostni razred M. Na videz je bil rumenjak tega jajca najbolj svetlo rumene barve. Jajce iz talne reje je največje, saj spada v velikostni razred XL. Rumenjak tega jajca je bil oranžno obarvan, tudi beljak je bil bolj rumene barve glede na ostala jajca. Jajce iz hlevske reje spada v velikostni razred M. Rumenjak tega jajca je bil rumene barve. Vsa jajca, razen tisto iz baterijske reje, so bile kupljene v trgovini Spar.

3.1.2 Inventar

Tabela 1: Potreben inventar za izvedbo vaje

Mikropipeta z nastavki	Kapalka, 3x
Petrijevka, 4x	Stresalnik
Čaša, 250 mL	Analizna tehtnica
Čaša, 50 mL, 3x	Parafilm
Merilna bučka, 10 mL	Žogica za pipetiranje
Čaša, 400 mL, 3x	Žlička
Epruveta z zamaškom, 12x	Staničevina
Steklena kiveta, 4x	Papirnata brisačka
Merilna pipeta, 2 mL	Hladilnik
Merilni valj, 10 mL	Alkoholni flomaster
Čaša, 150 mL	Spektrofotometer

3.1.3 Kemikalije

Tabela 2: Kemikalije z nevarnostmi, ki so potrebne za vajo

Kemikalija	Nevarnosti
Kloroform, $\text{CHCl}_3(\text{l})$	Povzroča hudo draženje oči, zdravju škodljivo pri zaužitju, strupeno pri vdihavanju, povzroča draženje kože.  
Acetanhidrid, $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3(\text{l})$	Zdravju škodljivo pri zaužitju, vnetljiva in hlapna tekočina, smrtno pri vdihavanju, draži dihalne poti, povzroča hude opekline kože in poškodbe oči.   
Žveplove (VI) kislina, $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{aq})}$, 98 %	Povzroča hude opekline kože in poškodbe oči, jedko za kožo in kovine. 
Holesterol, $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_{(\text{s})}$	Brez nevarnosti.

3.2 Varnost pri delu in skrb za okolje

Med delom ves čas nosimo zaščitno haljo. Pri nalivanju kloroforma delamo v digestoriju, ki je zagotavlja odsesavanje hlapov kloroforma. Pri tem poleg halje nosimo še zaščitna očala, rokavice iz lateksa in dihalno masko s filtrom. Pri odmerjanju žveplove (VI) kisline in acetanhidrida prav tako nosimo poleg halje še zaščitna očala in rokavice. Zaradi škodljivosti uporabljenih kemikalij na okolje nastale zmesi zlivamo v posodo številka 4, kamor zlivamo organske spojine s halogenimi elementi. V to posodo jih zlivamo predvsem zaradi kloroforma, ki je kloriran ogljikovodik.

3.3 Postopki dela

3.3.1 Izdelava umeritvene krivulje

Na prižgano analizno tehtnico postavimo 50 mL čašo. Tehtnico zapremo in tariramo. Z žličko zatehtamo v čašo 0,0600 g holesterola v praškasti obliki, kot je prikazano na sliki 9.



Slika 9: Tehtanje holesterola na analizni tehtnici

Kvantitativno ga prenesemo v 10 mL merilno bučko tako, da ga raztopimo v malo kloroforma in prelijemo v bučko. Čašo speremo s kloroformom še dvakrat. Merilno bučko napolnimo do oznake s kloroformom in jo zatesnimo ter vsebino premešamo. Z 2 mL merilno pipeto prenesemo 1 mL raztopine v 6 epruvet. Epruvete si ustrezno označimo. Prvo epruveto zatesnimo. V 2. epruveto dodamo 5 mL kloroforma z merilno pipeto in jo zatesnimo. V 3. epruveto dodamo 2 mL kloroforma, v 4. epruveto odpipetiramo 1 mL kloroforma, v 5. epruveto odmerimo 0,5 mL kloroforma, v 6. epruveto dodamo 0,2 mL kloroforma. Vse epruvete zatesnimo. V čisto, sedmo epruveto, odmerimo 1 mL kloroforma in jo zatesnimo. Vsebino epruvet premešamo. Iz vsake epruvete (razen iz prve in sedme) odpipetiramo 1 mL vsebine v novo, čisto epruveto.

V 50 mL čašo nalijemo očetni anhidrid. S kapalko dodamo v vsako epruveto 15 kapljic acetanhidrida. Epruvete zamašimo in pretresemo. Pri tem se vsebina epruvete rahlo segreje. V 50 mL čašo nalijemo žveplovo (VI) kislino. S čisto kapalko dodamo v vsako epruveto 5 kapljic žveplove (VI) kisline. Epruvete zamašimo in pretresemo. Tvorijo se temno obarvanje, zato s pomočjo 10 mL merilnega valja dodamo 9 mL kloroforma v vsako epruveto, razen v tisto, v kateri ni holesterola (ni obarvanja). V kiveto nalijemo vzorec iz neobarvane epruvete (prej smo jo označili s številko 7, predstavlja nam slepi vzorec). Ostale tri kivete napolnimo skoraj do roba z vzorci. V prvo kiveto nalijemo vsebino iz 6. epruvete, v drugo kiveto vzorec iz 5. epruvete in v zadnjo kiveto nalijemo vsebino 4. epruvete, torej po naraščajoči koncentraciji holesterola v raztopini. Na kivete položimo pokrov in jih obrišemo s staničevino. Pazimo, da jih ne pomešamo med seboj. Na sliki 10 je prikazan primer obarvanja v kivetah.

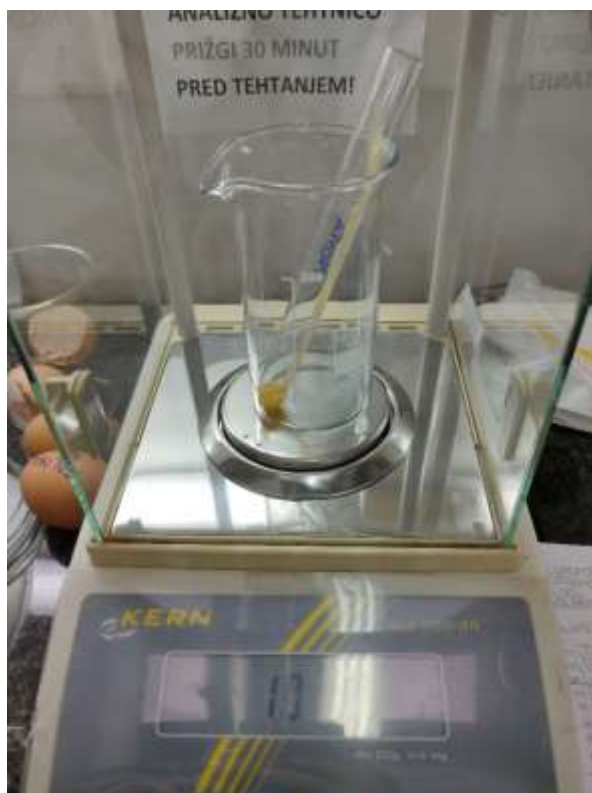


Slika 10: Obarvanje v kivetah z vzorci

Izmerimo jim absorbanco na spektrofotometru, kot je opisano v poglavju 3.3.4. Vsebinsko treh kivet izpraznimo, tisto s slepim vzorcem pustimo v spektrofotometru. Pred ponovno uporabo kivet jih speremo z vzorci, ki jih bomo nalili notri. Kivete napolnimo po naraščajoči koncentraciji holesterola, jih zatesnimo in obrišemo s staničevino ter izmerimo absorbanco. S pomočjo znanih koncentracij in absorbance izdelamo umeritveno krivuljo v programu Excel.

3.3.2 Priprava rumenjakov za nadaljnjo analizo

Na tarirano analizno tehtnico postavimo petrijevko in jo stehtamo. Prijemamo jo z rokavicami. Zabeležimo si maso. Petrijevko vzamemo s tehtnice, ki jo ponovno tariramo. Vanjo ubijemo jajce. Petrijevko skupaj z jajcem stehtamo na tarirani tehtnici. Postopek ponovimo še za ostala 3 jajca. V visoko 150 mL čašo postavimo epruveto. Čašo z epruveto postavimo na analizno tehtnico in tariramo. S pomočjo mikropipete z nastavkom prebodemo rumenjak in približno 1 g prenesemo v epruveto, kot je prikazano na spodnji sliki (slika 11).



Slika 11: Tehtanje rumenjaka v epruveto

Zabeležimo natančno maso. Epruveto zatesnimo in označimo kateri rumenjak je v epruveti. Izgled rumenjakov v teh epruvetah je prikazan na sliki 12.



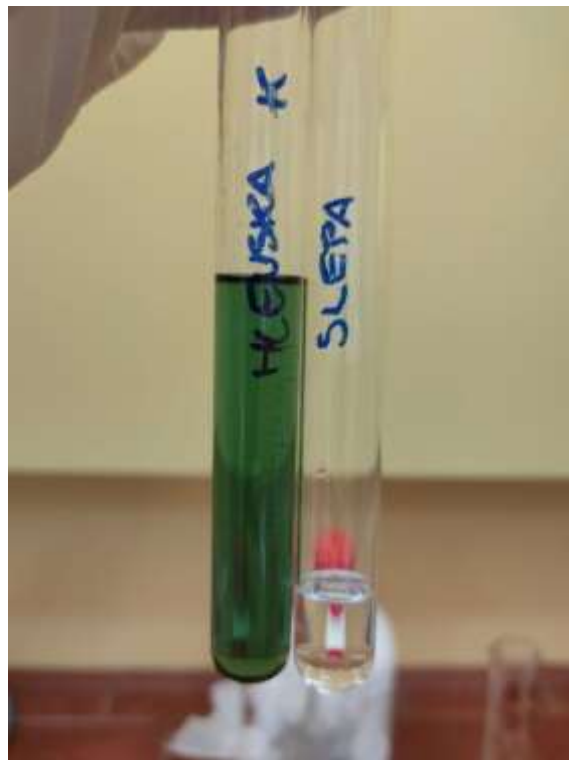
Slika 12: Epruvete s surovimi rumenjaki

3.3.3 Ekstrakcija in obarvanje holesterola rumenjakov

V vsako epruveto z rumenjacom dodamo 14 mL kloroforma z merilnim valjem. Epruvete zatesnimo in dobro premešamo. Po premešanju rumenjakov s kloroformom se tvorita dve plasti v epruveti. Na mikropipeti nastavimo volumen z vrtenjem vijaka, s katerim posesamo tekočino v epruveto, na 2 mL. Na mikropipeto pritismo nastavek. Med premikanjem pipete do spodnje faze skozi zgornjo fazo rahlo stiskamo gumb na pipeti, da nam ne gre zgornja faza v nastavek. Spodnjo fazo posesamo tako, da pritiskamo gumb dokler ne začutimo rahle blokade. Takrat ga spustimo nazaj gor in vsebino prenesemo v drugo, prazno epruveto tako, da gumb stisnemo do konca. Postopek ponovimo za vse epruvete. Med vzorci zamenjamo nastavek na pipeti. Epruvete, v katere smo prenesli 2 mL vsakega ekstrakta, ustrezno označimo. V 50 mL čašo nalijemo acetanhidrid. V vsako epruveto damo 15 kapljic acetanhidrida s kapalko. Epruvete zatesnimo in vsebino premešamo. V drugo 50 mL čašo nalijemo žveplovo (VI) kislino. S čisto kapalko damo v vsako epruveto 5 kapljic žveplove (VI) kisline. Epruvete zatesnimo in premešamo. Z 10 mL merilnim valjem dodamo v vsako epruveto 8 mL kloroforma. V epruvetah se tvori modro-zeleno obarvanje, kot lahko vidimo na sliki 15. V eno prazno epruveto nalijemo 2 mL kloroforma in dodamo 15 kapljic očetnega anhidrida ter 5 kapljic žveplove (VI) kisline. To nam predstavlja slepi vzorec. Ta se ne obarva, kar je razvidno na sliki 14.



Slika 13: Obarvanje ekstrahiranega holesterola



Slika 14: Primerjava obarvanja epruvete s holesterolom v primerjavi s slepim vzorcem

3.3.4 Merjenje absorbance vzorcev na spektrofotometru

20 minut pred začetkom merjenja spektrofotometer priključimo na električno omrežje. Na hrbtni strani stisnemo gumb za vžig. Medtem vzamemo 4 čiste kivete. V prvo kiveto nalijemo slepi vzorec iz epruvete in kiveto zatesnimo ter obrišemo s staničevino. V ostale 3 kivete nalijemo obarvan ekstrakt iz rumenjaka jajca določene reje. Kivete zatesnimo in obrišemo s staničevino. Na prižganemu spektrofotometru v polje za vpis ne napišemo ničesar, stisnemo le tipko ENTER. Ko se pokaže mode menu kliknemo št. 1. S tem izberemo fotometrično meritev. Ponovno stisnemo št. 1, da izberemo fotometrično meritev. Nato stisnemo tipko F2, odpre se podprogram. Pritisnemo št. 2 in vnesemo število merilnih mest, ki jih bomo merili. V našem primeru je to 4. Stisnemo ENTER, da potrdimo. Stisnemo tipko RETURN, da se vrnemo v meni, kjer stisnemo tipko GOTO WL, da vnesemo valovno dolžino svetlobe (pri nas je to 680 nm) in potrdimo z ENTER. Kiveto s slepim vzorcem vstavimo v prvo režo in zapremo pokrov spektrofotometra. Stisnemo gumb AUTO ZERO, da jo nastavimo na ničlišče. Odpremo pokrov in v ostale reže vstavimo kivete z vzorci. Pri izdelavi umeritvene krivulje jih zlagamo v napravo od tiste z najmanjšo koncentracijo do tiste z največjo koncentracijo. Zapremo pokrov, pritisnemo gumb START in zabeležimo meritve, ki se nam pojavijo na ekranu (primer je slika 15). Med seti meritev moramo vedno slepi vzorec spraviti na ničlišče pred izvajanjem novih meritev. Pred ponovno uporabo kivet le-te izpraznimo, speremo, speremo z vzorcem, ki ga bomo vnesli in nato nalijemo notri vzorec.



Slika 15: Primer izpisa izmerjenih absorbanc na spektrofotometru

4 MERITVE IN IZRAČUNI

4.1 Izračun mase holesterola in volumna kloroforma za pripravo umeritvene krivulje

Izračun potrebnega holesterola za pripravo 10 mL 6,0 mg/mL raztopine:

$$\gamma(B) = \frac{m(B)}{V(AB)}$$

$$m(B) = \gamma(B) \times V(AB)$$

$$m(\text{holesterol}) = \gamma(\text{holesterol}) \times V(\text{raztopine})$$

$$m(\text{holesterol}) = 6,0 \text{ mg/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$m(\text{holesterol}) = 60,0 \text{ mg} = 0,0600 \text{ g}$$

Primer izračuna potrebnega kloroforma za pripravo 1,0 mg/mL raztopine iz izhodiščne raztopine:

$$\gamma(B)_1 \times V_1 = \gamma(B)_2 \times V_2$$

$$6,0 \text{ mg/mL} \times 1,0 \text{ mL} = 1,0 \text{ mg/mL} \times V_2$$

$$V_2 = 6,0 \text{ mL}$$

$$V(\text{kloroform}) = 6,0 \text{ mL} - 1,0 \text{ mL} = 5,0 \text{ mL}$$

V spodnji tabeli št. 3 so prikazani potrebni volumni kloroforma za pripravo določenih koncentracij raztopin iz 1 mL prvotne 6,0 mg/mL raztopine.

Tabela 3: Izračunani potrebni volumni kloroforma, ki jih je potrebno dodati za dosego želenih masnih koncentracij

Masna koncentracija [mg/mL]	Volumen izhodiščne raztopine (mL)	Volumen kloroforma, ki ga je potrebno dodati (mL)
1,0	1	5,0
2,0	1	2,0
3,0	1	1,0
4,0	1	0,5
5,0	1	0,2
6,0	1	0,0

4.2 Meritve mas jajc in rumenjakov

V tabeli št. 4 so prikazane mase petrijevk, masa petrijevke in celega jajca iz posamezne reje ter mase rumenjakov, ki so bile zatehtane v epruvete. Vse meritve so bile izvedene na analizni tehtnici.

Tabela 4: Mase petrijevk, jajc in rumenjakov

Reja	m (petrijevka) [g]	m (petrijevka + jajce) [g]	m (rumenjak) [g]
Talna	48,4610	111,0305	1,0110
Prosta	51,6134	97,7873	1,0107
Hlevska	48,3481	98,7651	1,0087
Baterijska	60,5090	113,6999	1,0074

4.3 Izračun mase jajc

Primer izračuna mase jajce iz talne reje:

$$m(\text{jajca}) = m(\text{petrijevka} + \text{jajce}) - m(\text{petrijevka})$$

$$m(\text{jajca}) = 111,0305 \text{ g} - 48,4610 \text{ g}$$

$$m(\text{jajca}) = 62,5695 \text{ g}$$

V tabeli št. 5 so podane izračunane mase jajc v petrijevkah.

Tabela 5: Mase jajc vseh rej v petrijevkah

Reja jajca	Masa v petrijevki [g]
Talna	62,5695
Prosta	46,1739
Hlevska	50,4170
Baterijska	53,1909

4.4 Izmerjene absorbance

V tabeli št. 6 so predstavljene izmerjene absorbance pripravljenih raztopin holesterola za umeritveno krivuljo pri valovni dolžini svetlobe 680 nm.

Tabela 6: Absorbanca pripravljenih raztopin holesterola pri 680 nm

Koncentracija holesterola [mg/mL]	Absorbanca
0,1	0,096
0,2	0,243
0,3	0,310
0,4	0,502
0,5	0,556
0,6	0,635

V tabeli št. 7 so zapisane izmerjene absorbance posameznih vzorcev jajc. Absorbanca je bila merjena pri 680 nm.

Tabela 7: Absorbanca vzorcev pridobljenih iz jajc različne reje

Vrsta reje	Absorbanca
Baterijska	0,293
Talna	0,306
Hlevska	0,256
Prosta	0,260

4.5 Izračunane mase holesterola na 1 gram rumenjaka

Enačba premice umeritvene krivulje:

$$y = 1,1014 x + 0,0041$$

kjer je:

y = absorbanca

x = masna koncentracija holesterola

Primer izračuna mase holesterola na 1 gram rumenjaka za sveži rumenjak jajca iz proste reje:

$$0,260 = 1,1014 x + 0,0041$$

$$\gamma (\text{holesterol}) = \frac{0,260 - 0,0041}{1,1014}$$

$$\gamma (\text{holesterol}) = 0,2323 \text{ mg/mL}$$

Rumenjak smo ekstrahirali najprej s 14 mL kloroforma. Potem smo 2 mL odpipetirali in dodali še 8 mL kloroforma. Iz tega lahko izpeljemo enačbo maso holesterola v rumenjaku pred dodatkom kloroforma:

$$m (\text{holesterol}) = \gamma (\text{holesterol}) \times 70 \text{ mL}$$

$$m (\text{holesterol}) = 0,2323 \text{ mg/mL} \times 70 \text{ mL}$$

$$m (\text{holesterol}) = 16,26 \text{ mg}$$

S pomočjo znane mase rumenjaka, ki smo ga zatehtali, izračunamo maso holesterola na gram rumenjaka:

$$m (\text{holesterola na gram rumenjaka}) = \frac{m (\text{holesterola})}{m (\text{rumenjaka})}$$

$$m (\text{holesterola na gram rumenjaka}) = \frac{16,26 \text{ mg}}{1,0107 \text{ g}}$$

$$m (\text{holesterola na gram rumenjaka}) = 16,09 \text{ mg/g}$$

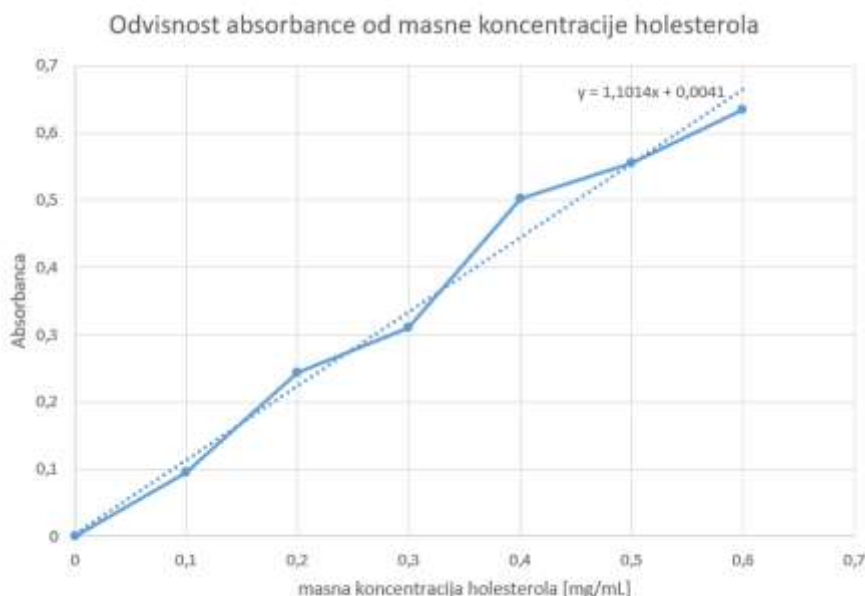
Vse mase holesterola v posameznih rumenjakih so prikazane v spodnji tabeli (tabela št. 8).

Tabela 8: Masa holesterola na gram rumenjaka iz posamezne reje

Vrsta reje	Masa holesterola na gram rumenjaka [mg/g]
Baterijska	18,23
Talna	18,98
Hlevska	15,87
Prosta	16,09

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

Spodnji graf predstavlja odvisnost absorbance od masne koncentracije holesterola v vzorcu. Gre za umeritveno krivuljo, izdelano s pomočjo pripravljenih raztopin z znanimi koncentracijami holesterola v raztopini. Meritve so bile izvedene pri valovni dolžini 680 nm.



Grafikon 1: Odvisnost absorbance od masne koncentracije holesterola v vzorcu

V vseh primerih je bilo obarvanje v epruveti precej temnejše od pričakovanega. Vzorci so zato bili izven merilnega območja spektrofotometra, zaradi česar sem vzorce moral razredčiti, da sem lahko izvedel meritve. Pred merjenjem absorbance je pomembno, da kivete dobro obrišemo od zunaj. Vsaka morebitna nečistoča na steni kivete lahko ovira prehod svetlobe skozi kiveto (in s tem skozi vzorec) ter pokvari rezultat. Pri umeritveni krivulji bi lahko dosegel večji približek linearne odvisnosti med koncentracijo vzorca in absorbanco svetlobe. Najverjetneje sem pri kakšni raztopini (npr. pri raztopini s koncentracijo 0,4 mg/mL) dodal kakšno kapljico acetanhidrida preveč, zaradi česar se je tvorilo močnejše obarvanje. Štetje kapljic ni najbolj zanesljiva metoda za dodajanje reagentov, vendar so to tako majhne količine, da jih težko odmerimo z npr. merilnim valjem. Prav tako se včasih na koncu kapilare že tvori kapljica, ki potem pripomore k celotni količini dodanega reagenta v epruveto. Prav tako obstaja možnost, da je bila kiveta, v kateri je bil ta vzorec, umazana ali poškodovana, kar lahko ovira prehod svetlobe. To bi lahko preveril tako, da bi zamenjal kiveto in ponovno izmeril absorbanco tega vzorca. Sama natančnost priprave umeritvene krivulje vpliva na enačbo premice in s tem tudi na nadaljnje izračune ter rezultate. Umeritveno krivuljo bi lahko izboljšal, jo naredil bolj linearno.

Pri pripravi jajc sem jih najprej stehtal. S tem sem želel ugotoviti koliko holesterola je v celotnem jajcu. Ves holesterol v jajcu se nahaja v rumenjaku, tega pa nisem stehtal kot celoto, zato nisem mogel izračunati koliko holesterola je v celotni masi rumenjaka in s tem tudi v jajcu. Posledično sem tudi rezultat podal v obliki mg holesterola na gram rumenjaka, saj več nisem mogel narediti. Ko sem rumenjaku dodal žveplovo (VI) kislino in očetni anhidrid, so se, tako kot pri raztopinah za umeritveno krivuljo, raztopine obarvale zelo temno. Posledično sem jih moral razredčiti do območja detekcije. Prav tako kot pri umeritveni krivulji obstaja možnost, da sem dodal kakšno kapljico reagenta preveč, kar lahko vpliva na samo obarvanje in rezultat.

V tabeli št. 9 so prikazane mase holesterola na gram rumenjaka, za vsak rumenjak, ki smo ga uporabili.

Tabela 9: Masa holesterola na gram rumenjaka iz posamezne reje

Vrsta reje	Masa holesterola na gram rumenjaka [mg/g]
Baterijska	18,23
Talna	18,98
Hlevska	15,87
Prosta	16,09

Iz zgornje tabele lahko vidimo, da je največ holesterola vseboval surov rumenjak iz jajca talne reje. Masa holesterola v tem jajcu je znašala 18,98 mg/g rumenjaka. Drugi je bil surov rumenjak iz baterijske reje, oz. domačega jajca, ki je vseboval 18,23 mg holesterola na gram rumenjaka. Naslednji je bil surov rumenjak iz proste reje z 16,09 mg holesterola na gram rumenjaka. Na zadnjem mestu je pa surov rumenjak iz hlevske reje, ki je vseboval 15,87 mg holesterola/g rumenjaka. Napake se lahko pojavijo tudi zaradi časovnega razpona, v katerem sem vajo delal. Vpliv časovne neobstoynosti sem poskusil upočasniti s tesnjenjem epruvet s parafilmom in shranjevanjem rumenjakov in kloroforma v hladilniku. Nekaj kloroforma je morda izhlapelo, zato ne morem vedeti točne količine kloroforma, ki je bila na koncu v epruveti.

Menim, da je količina holesterola v jajcu pogojena z načinom reje kokoši v zelo majhni meri. Hrana, s katero se kokoš prehranjuje, je pretežno rastlinskega izvora. Koruza, semena, različna zelenjava in sadeži ter trava so del kokošje prehrane in ne vsebujejo holesterola. Holesterol se lahko zaužije s prehrano, se pa tudi sam sintetizira v telesu, kot se tudi v človeškem. Ima pomembno organsko vlogo, zato ga morajo celice same proizvesti. V kolikor bi kokoš zaužila hrano, ki vsebuje holesterol, to verjetno ne bi precej vplivalo na holesterol v njenih jajcih. Telo prav tako samo regulira nivo holesterola. Če ga organizem zaužije, se sinteza holesterola v telesu upočasni. Če bi prehrana (in s tem tudi način reje) vplivala na količino holesterola v kokošjih jajcih, bi morala kokošja jajca iz proste reje vsebovati največ holesterola, saj se v prosti reji kokoš najlažje prehranjuje še s črvi in insekti, ki vsebujejo holesterol. Temu ni bilo tako, zato menim, da imata prehrana in način reje majhen vpliv na količino holesterola v kokošjem jajcu. Mislim, da je količina holesterola v jajcu kokoši odvisna predvsem od same kokoši in ne od načina reje te kokoši. Zelo pomemben dejavnik je prav tako pasma kokoši, kjer nastopajo razlike med njihovimi jajci. Okolje, v katerem kokoš živi, tudi lahko vpliva na količino holesterola v jajcih, saj naj bi kokoši, ki živijo v bolj stresnih okoljih, bile bolj nagnjene k višjim ravnam holesterola v telesu in tudi jajcih. Seveda se sestava jajca spreminja s starostjo kokoši in tudi starostjo samega jajca. Najboljšo primerjavo bi tako dobili, če bi kokoši, katerih jajca analiziramo, bile približno enako stare, iste pasme in sama jajca tudi enako stara. Na holesterol v jajcih vpliva veliko dejavnikov, ki so v veliki meri potrošniku neznani, zato težko določim natančen vzrok za dobljene rezultate. Zaradi številnih vplivov ne moremo razlik med vsebnostmi holesterola v kokošjih jajcih pripisati zgolj načinu reje kokoši.

6 ZAKLJUČEK

Pri vaji sem spektrofotometrično določal količino holesterola v kokošjih jajcih različnih rej. S pomočjo redčenja standardne raztopine holesterola sem najprej izdelal umeritveno krivuljo. Z ekstrakcijo holesterola iz jajc s pomočjo kloroforma in obarvanjem z acetanhidridom in žveplovo (VI) kislino sem dosegel modro-zeleno obarvanje, ki je sorazmerno s koncentracijo holesterola. S pomočjo umeritvene krivulje sem iz izmerjenih absorbanč za vzorce izračunal količino holesterola v rumenjaku posameznega jajca.

Po opravljeni vaji sem prišel do ugotovitve, da je rumenjak iz talne reje vseboval največ holesterola, in sicer 18,98 mg/g rumenjaka. Drugi je bil rumenjak iz baterijske reje, oz. domačega jajca, na tretjem mestu je bil rumenjak iz proste reje, na zadnjem mestu je pa bil rumenjak iz hlevske reje, ki je vseboval 15,87 mg holesterola/g rumenjaka.

Metodo bi lahko izboljšal. Bilo bi bolje, če bi vajo izvedel čim hitreje, saj medtem ko kloroform stoji, hlapi. To vpliva na rezultate. Prav tako ne morem zagotoviti obstojnosti vzorcev v roku štirih tednov. Barva se lahko v tem času porazgubi ali pa kemikalije v epruveti pričnejo hlapeti. Lahko bi absorbance izmeril prej, vendar noben spektrofotometer ni bil na voljo. Pred samim merjenjem bi bilo bolje, da bi kivete med vsako menjavo vzorca posušil. Čeprav sem jih prej spral z vzorcem, lahko še vedno pride do redčenja. Prav tako je pomembno, da jih od zunaj dobro obrišemo. V epruvete bi lahko zatehtal manj rumenjaka, da ne bi bilo potrebno toliko redčiti. Tako bi tudi poskrbel za manjšo porabo kloroforma. Za najboljšo primerjavo jajc bi bilo dobro, da bi bile te enako stare, ker se čez čas lahko vsebina jajca spreminja. Seveda ima na rezultate vpliv tudi natančnost analitika. Za boljšo primerljivost rezultatov pri sami analizi bi moral vedeti več o sami starosti kokoši, starosti analiziranih jajc, pasmi kokoši, kako izgleda okolje, v katerem živijo, s čim natanko se prehranjujejo ...

7 LITERATURA

Biochemistry, Cholesterol, National Library of Medicine (online), 15.8.2022. Dostopno na naslovu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513326/>, 27.1.2023

Characterization of structure and protein of vitelline membranes of precocial (ring-necked pheasant, gray partridge) and superaltricial (cockatiel parrot, domestic pigeon) birds, National Library of Medicine (online), 30.1.2020. Dostopno na naslovu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6992205/>, 27.1.2023

Cholesterol, Britannica (online), 29.12.2022. Dostopno na naslovu: <https://www.britannica.com/science/cholesterol>, 27.1.2023

Cholesterol, Wikipedia (online), 19.1.2023. Dostopno na naslovu: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cholesterol>, 27.1.2023

Cholesterol Levels: What You Need to Know, MedlinePlus (online), 2.10.2020. Dostopno na naslovu: <https://medlineplus.gov/cholesterollevelswhatyouneedtoknow.html>, 27.1.2023

Eggs: Are they good or bad for my cholesterol?, Mayo Clinic (online), 21.1.2022. Dostopno na naslovu: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/high-blood-cholesterol/expert-answers/cholesterol/faq-20058468>, 27.1.2023

Egg proteins, ScienceDirect (online), 2013. Dostopno na naslovu: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/egg-protein>, 27.1.2023

Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents--a review, PubMed (online), 2013. Dostopno na naslovu: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24235241/>, 27.1.2023

Eggshell, Wikipedia (online), 16.12.2022. Dostopno na naslovu: <https://en.wikipedia.org/wiki/Eggshell>, 27.1.2023

Egg Whites vs. Egg Yolks | What's the Difference?, Pete and Gerry's (online), 2021. Dostopno na naslovu: <https://www.peteandgerrys.com/blog/egg-whites-vs-egg-yolks>, 27.1.2023

Egg Structure – The Structure of an Egg, The Poultry Pages (online), 2023. Dostopno na naslovu: <https://www.chickens.allotment-garden.org/eggs/structure-egg/>, 27.1.2023

Egg as food, Wikipedia (online), 26.1.2023. Dostopno na naslovu: https://en.wikipedia.org/wiki/Egg_as_food, 27.1.2023

Egg powders are a crucial element in countless applications of food industry, Pulviver (online), 2023. Dostopno na naslovu: <http://www.pulviver.com/countless-applications>, 27.1.2023

Egg white, Wikipedia (online), 11.1.2023. Dostopno na naslovu: https://en.wikipedia.org/wiki/Egg_white, 27.1.2023

Eggshell membrane, Wikipedia (online), 16.7.2022. Dostopno na naslovu: https://en.wikipedia.org/wiki/Eggshell_membrane, 27.1.2023

M. Kolar: Dokazovanje holesterola v živilih in vpliv na zdravje (online), 2015. Dostopno na naslovu: <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=47308>, 27.1.2023

Ovalbumin, ScienceDirect (online), 2011. Dostopno na naslovu: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/ovalbumin>, 27.1.2023

Science of Eggs: Anatomy of an Egg, The Exploratorium (online), 2023. Dostopno na naslovu: <https://www.exploratorium.edu/cooking/eggs/eggcomposition.html>, 27.1.2023

The 3 main types of cholesterol, Thriva (online), 30.3.2022. Dostopno na naslovu: <https://thriva.co/hub/cholesterol/different-types-of-cholesterol>, 27.1.2023

The Parts of the Egg, 4-H Virtual Farm (online), 2023. Dostopno na naslovu: https://www.sites.ext.vt.edu/virtualfarm/poultry/poultry_eggparts.html, 27.1.2023

Vitelline membrane, Wikipedia (online), 12.12.2022. Dostopno na naslovu: https://en.wikipedia.org/wiki/Vitelline_membrane, 27.1.2023

Yolk, Wikipedia (online), 20.1.2023. Dostopno na naslovu: https://en.wikipedia.org/wiki/Yolk#Chicken_egg_yolk, 27.1.2023

IZJAVA*

Mentor/-ica Aleksandra Ferenc v skladu z 20. členom Pravilnika o organizaciji mladinske raziskovalne dejavnosti »Mladi za Celje« Mestne občine Celje, zagotavljam, da je v raziskovalni nalogi z naslovom Določanje količine holesterola v kokošjih jajcih različne reje, katere avtor/-ica je Jaša Jakop:

- besedilo v tiskani in elektronski obliki istovetno,
- pri raziskovanju uporabljeno gradivo navedeno v seznamu uporabljene literature,
- da je za objavo fotografij v nalogi pridobljeno avtorjevo dovoljenje in je hranjeno v šolskem arhivu,
- da sme Osrednja knjižnica Celje objaviti raziskovalno nalogo v polnem besedilu na knjižničnih portalih z navedbo, da je raziskovalna naloga nastala v okviru projekta Mladi za Celje,
- da je raziskovalno nalogo dovoljeno uporabiti za izobraževalne in raziskovalne namene s povzemanjem misli, idej, konceptov oziroma besedil iz naloge ob upoštevanju avtorstva in korektnem citiranju,
- da smo seznanjeni z razpisni pogoji projekta Mladi za Celje.

Celje, 31.3.2023



Podpis mentorja

Podpis odgovorne osebe

*

POJASNILO

V skladu z 20. členom Pravilnika raziskovalne dejavnosti »Mladi za Celje« Mestne občine Celje je potrebno podpisano izjavo mentorja (-ice) in odgovorne osebe šole vključiti v izvod za knjižnico, dovoljenje za objavo avtorja (-ice) fotografskega gradiva, katerega ni avtor (-ica) raziskovalne naloge, pa hrani šola v svojem arhivu.