

**Entwicklung und Bewertung innovativer Strategien zur
Anreicherung von Vitamin D in tierischen Produkten
unter besonderer Berücksichtigung des Stoffwechsels
von D-Vitameren**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)**

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Dipl. troph. Julia Kühn (geb. Krämer)
Geb. am 19.09.1988 in Sömmerda

Gutachter/in: Prof. Dr. Gabriele I. Stangl
Prof. Dr. Gerald Rimbach

Verteidigung: 04.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	II
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Physiologische Bedeutung von Vitamin D für den Menschen.....	1
1.2 Vitamin D-Anreicherung von Lebensmitteln	5
1.3 Physiologische Bedeutung von Vitamin D für die Legehennen	8
2 Zielstellung.....	10
3 Tierexperimentelle Studien	12
3.2 Studie 1	12
3.2 Studie 2.....	23
3.3 Studie 3.....	31
3.4 Studie 4.....	36
3.4.1 Studiendesign.....	36
3.4.2 Analysen.....	37
3.4.3 Ergebnisse	39
4 Diskussion	42
4.1 Effizienz einer Ultraviolettlicht-Exposition zur Steigerung des Vitamin D- Gehaltes im Hühnerei	42
4.2 Sicherheitsaspekte einer Ultraviolettlicht-Exposition zur Steigerung des Vitamin D-Gehaltes	47
4.3 Limitationen der Ultraviolettlicht-Expositionsstudien.....	49
4.4 Einfluss einer Ultraviolettlicht-Exposition auf die Qualität der Eischale, den Cholesterolgehalt der Eier sowie die Gesundheit der Legehennen	50
4.5 Einfluss einer oralen 7-Dehydrocholesterol-Zufuhr auf den Vitamin D- Metabolismus.....	51
4.6 Schlussfolgerungen.....	54
5 Zusammenfassung	56
6 Summary	59
Literaturverzeichnis.....	V
Danksagung	XVIII
Lebenslauf.....	XIX
Eidesstattliche Erklärung.....	XXI

Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ D ₃	Calcitriol, 1,25-Dihydroxy-Vitamin D ₃
7-DHC	7-Dehydrocholesterol
25(OH)D ₃	25-Hydroxy-Vitamin D ₃
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
CD36	<i>Cluster of Differentiation 36</i>
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
CYP2R1	Vitamin D 25-Hydroxylase
CYP27A1	Sterol 27-Hydroxylase
CYP27B1	25-Hydroxy-Vitamin D ₃ -1 α -Hydroxylase
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DM	<i>dry matter</i>
ESI ⁺	positive Elektrospray-Ionisation
kA	keine Angabe
LC-MS/MS	Flüssigchromatografie-Tandem-Massenspektrometrie
LDLR	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>
LMvitV	Verordnung über vitaminisierte Lebensmittel
LRP1	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1</i>
LXR	Leber X-Rezeptor
memVDR	membranständiger Vitamin D-Rezeptor
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NPC1L1	Niemann-Pick C1 <i>Like 1</i>
ns	nicht signifikant
P	anorganisches Phosphat
PTAD	4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion
<i>realtime</i> RT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RPLP0	Großes Ribosomales Protein P0
RXR	Retinsäure-Rezeptor
SR-BI	<i>Scavenger Receptor Class B Member 1</i>
TierSchNutzV	Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung
TM	Trockenmasse
UVB	ultraviolette Strahlung des Spektrums B
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	<i>Vitamin D-response element</i>

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1 Vereinfachte Darstellung der (a) genomischen und (b) nicht-genomischen Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Zielzelle.
- Abbildung 3-1 Einfluss einer alimentären 7-DHC-Zufuhr auf die Gehalte an (A) 7-DHC und (B) $25(\text{OH})\text{D}_3$ im Serum.
- Abbildung 3-2 Vitamin D_3 -Gehalt in (A) Leber und (B) perirenalem Fettgewebe in Abhängigkeit von der alimentären 7-DHC-Zufuhr.

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1-1 Gehalt an Vitamin D₃ und 25(OH)D₃ in ausgewählten tierischen Lebensmitteln.
- Tabelle 2-1 Übersicht über die tierexperimentellen Studien und Untersuchungsparameter der vorliegenden Arbeit.
- Tabelle 3-1 Massenübergänge und substanzspezifische Einstellungen der LC-MS/MS für alle quantifizierten Metaboliten.
- Tabelle 3-2 Charakteristika der verwendeten Primer zur Untersuchung relativer mRNA-Expressionen in der Leber.
- Tabelle 3-3 7-DHC-Gehalt in Leber und perirenalem Fettgewebe in Abhängigkeit von der alimentären 7-DHC-Zufuhr.
- Tabelle 3-4 Relative mRNA-Konzentration in der Leber in Abhängigkeit von der alimentären 7-DHC-Zufuhr.

1 Einleitung

1.1 Physiologische Bedeutung von Vitamin D für den Menschen

Vitamin D bezeichnet eine Gruppe von Secosteroiden, dessen aktivem Metabolit Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) zahlreiche Funktionen im Organismus zukommen. Es wird vermutet, dass bis zu 2.000 Gene durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beeinflusst werden können [Hossein-nezhad & Holick 2013]. Bekannt ist Vitamin D insbesondere für die zentrale Stellung in der Homöostase von Calcium und Phosphat und dem damit verbundenen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Im Zuge dieser Funktion wird neben der intestinalen Absorption sowie der renalen Exkretion auch die ossäre Mobilisierung von Calcium und Phosphat gesteuert [DeLuca 2004, Fukumoto 2014]. Zur Sicherung konstanter Plasmaspiegel führt eine unzureichende Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt zur Freisetzung von Calcium und Phosphat aus den Knochen. Unter chronischem Vitamin D-Mangel beobachtet man daher das vermehrte Auftreten von Erkrankungen, welche mit demineralisierten Knochen einhergehen [Bischoff-Ferrari et al. 2006]. Durch intensive Forschung in den vergangenen Jahren konnten Wirkungen für Vitamin D beschrieben werden, die weit über die klassischen Effekte im Knochenstoffwechsel hinausreichen. Gezeigt wurde, dass ein Vitamin D-Mangel mit Krebserkrankungen [Feldman et al. 2014], Diabetes mellitus Typ I [Nagpal et al. 2005], Veränderungen der Muskelmorphologie und Muskelkraft [Visser et al. 2003, Bischoff-Ferrari et al. 2004, Sato et al. 2005, Max et al. 2014], kardiovaskulären Risikofaktoren [Grandi et al. 2010, Wang et al. 2012, Schmidt et al. 2012, Schmidt et al. 2014] sowie neurologischen Erkrankungen [Garcion et al. 2002, Balion et al. 2012] assoziiert ist. Ferner wird Vitamin D eine immunmodulierende und antiproliferative Wirkung zugesprochen [Nagpal et al. 2005, Maruotti & Cantatore 2010].

Vitamin D wird, unter Einfluss ultravioletter Strahlung des Spektrums B (UVB, 290 - 315 nm), aus einem Provitamin gebildet. Als Provitamin kann entweder das tierische 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) oder das aus Pilzen stammende Ergosterol fungieren. Es handelt sich dabei um Sterolverbindungen, aus denen durch Öffnung des B-Ringes Vitamin D_3 bzw. Vitamin D_2 entsteht. Vornehmlich in der Leber wird Vitamin D_3 , unter Bildung von 25-Hydroxy-Vitamin D_3 ($25(\text{OH})\text{D}_3$), hydroxyliert. Gebunden an Vitamin D-bindendes Protein wird $25(\text{OH})\text{D}_3$ wieder in das Plasma sezerniert. Im Rahmen eines weiteren Hydroxylierungsvorgangs entsteht in den Tubuluszellen der Nierenkörperchen aus $25(\text{OH})\text{D}_3$ der aktive Vitamin D-Metabolit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Dieser Prozess unterliegt einer strengen Homöostase und ist u. a. durch die Konzentration an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *per se* reguliert. Die zahlreichen Wirkungen von Vitamin D werden über den Vitamin D-Rezeptor

(VDR) realisiert. Dabei handelt es sich um einen nukleären Rezeptor, der seine Wirkung als ligandenassoziierter Transkriptionsfaktor im Zellkern entfaltet (Abbildung 1-1). Diese genomischen Wirkungen gelten als langsame Antworten auf eine Aktivierung des VDR. Vermittelt über einen membranständigen VDR (memVDR) kann die Bindung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ jedoch auch zur Initiierung von Signalkaskaden führen und somit eine nicht-genomische und schnelle Zellantwort generieren [Huhtakangas et al. 2004, Deeb et al. 2007] (Abbildung 1-1). Beispielsweise läuft der Transport von Calcium über die intestinale Barriere unter Beteiligung eines solchen nicht-genomischen Prozesses ab [Vuolo et al. 2012].

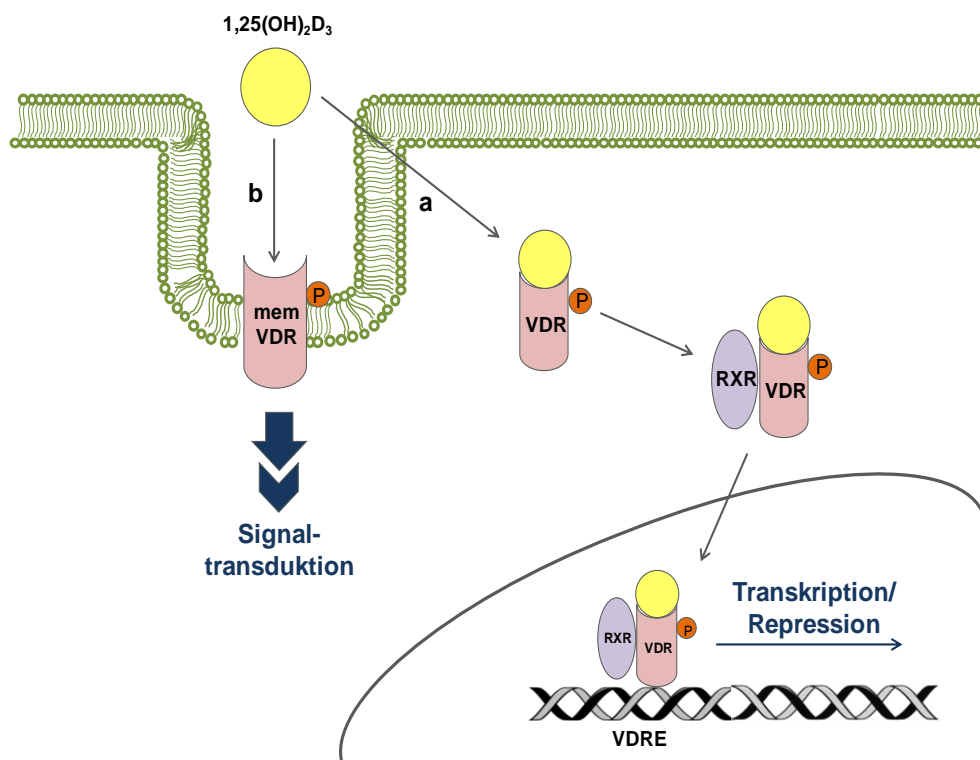


Abbildung 1-1 Vereinfachte Darstellung der (a) genomischen und (b) nicht-genomischen Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Zielzelle. Anorganisches Phosphat (P), Retinsäure-Rezeptor (RXR), Vitamin D-response element (VDRE). Modifiziert nach Deeb et al. [2007] und Vuolo et al. [2012].

Die Bewertung des Vitamin D-Status erfolgt gemeinhin anhand der Bestimmung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ im Serum oder Plasma. Da die Synthese von $25(\text{OH})\text{D}_3$ keiner spezifischen Regulation unterworfen ist, stellt dieser Metabolit ein Abbild der Summe aus endogen gebildetem sowie über die Nahrung zugeführtem Vitamin D dar. Des Weiteren weist $25(\text{OH})\text{D}_3$ eine relativ lange Halbwertszeit auf und gibt somit Aufschluss über die Versorgungssituation der vergangenen Wochen. Uneinigkeit besteht darüber, ab welchem

Grenzwert eine adäquate Vitamin D-Versorgung besteht. Untersuchungen hierzu beruhen häufig auf der inversen Beziehung zwischen der Konzentration an Parathormon und 25(OH)D₃ im Plasma [Lips 2004]. Eine optimale Vitamin D-Versorgung ist demnach bis zu der 25(OH)D₃-Konzentration gesichert, die nicht mit einem Anstieg von Parathormon einhergeht [Bischoff-Ferrari et al. 2006]. Mittels dieser Untersuchungen wurden Grenzwerte von 50 - 78 nmol/l als optimaler Vitamin D-Status definiert [Chapuy et al. 1997, Thomas et al. 1998, Lips et al. 2001]. Bis heute konnte kein einheitlicher Grenzwert festgelegt werden. Das *Institute of Medicine* (IOM) erachtet Messwerte von 50 nmol/l als wünschenswert für eine optimale Vitamin D-Versorgung [Ross et al. 2011]. Andere Autoren sprechen ab einer Plasmakonzentration von 75 nmol/l von einem adäquaten Vitamin D-Status [Holick et al. 2011].

Die Versorgung mit Vitamin D ist unzureichend. Die Daten zur Prävalenz für Vitamin D-Mangel schwanken jedoch in Anbetracht der Verwendung unterschiedlicher Grenzwerte. Eine weltweite Auswertung von 168.000 Probandendaten ergab, dass die 25(OH)D₃-Konzentration im Plasma bei 88,1 % der Personen unter 75 nmol/l lagen, während 37,3 % der Personen Werte unter 50 nmol/l aufwiesen [Hilger et al. 2014]. Die höchsten Plasmagehalte wurden dabei in Nordamerika beobachtet [Hilger et al. 2014]. Auch eine internationale Untersuchung postmenopausaler Frauen bestätigte eine bessere Vitamin D-Versorgung in den USA und Kanada im Vergleich zu Europa [Lips et al. 2001]. Alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede im Vitamin D-Status scheinen in Europa nicht zu bestehen [Hilger et al. 2014]. Es ist davon auszugehen, dass im Mittel mehr als 50 % der Bevölkerung in der Bundesrepublik Deutschland 25(OH)D₃-Konzentrationen von unter 50 nmol/l aufweisen [Hintzpeter et al. 2008, Ringe & Kipshoven 2012].

Bei ausreichender Bestrahlung mit UVB-Licht könnte nahezu der gesamte Vitamin D-Bedarf des Organismus mittels endogener Synthese gedeckt werden [Holick 2005]. Dieser Synthese liegt ein rein physikochemischer Prozess zugrunde: energiereiche UVB-Photonen durchdringen die Epidermis und werden von membranständigem 7-DHC absorbiert. Resultierend wird aus 7-DHC das instabile Prävitamin D₃ gebildet, welches temperaturabhängig zu Vitamin D₃ isomerisiert. Vitamin D₃ wird im Folgenden an Vitamin D-bindendes Protein gebunden und gelangt in den Blutkreislauf. Bei exzessiver UVB-Exposition entstehen aus Prävitamin D₃ die biologisch inaktiven Photoisomere Tachysterol₃, Lumisterol₃ sowie Suprasterole und Toxisterole [Holick et al 1981, Webb et al. 1989, Chen et al. 2000]. Diese besitzen keine Affinität zum Vitamin D-bindenden Protein und werden im Zuge der kutanen Regeneration aus dem Körper entfernt. Eine Vitamin D-Intoxikation durch übermäßige Sonnenlicht- bzw. UVB-Exposition ist daher

nicht möglich. Vielmehr ist der moderne Lebensstil jedoch mit verminderten endogenen Vitamin D-Syntheseraten assoziiert, da durch Gebrauch von Sonnenschutzmitteln, verstärktem Aufenthalt in geschlossenen Räumen sowie Kleidung der Kontakt von UV-Strahlen mit der Haut verhindert wird [Matsuoka et al. 1987, Webb 2006]. Die Menge an kutan gebildetem Vitamin D ist ferner abhängig von Jahreszeit, Breitengrad und Witterung. Deutschland liegt nördlich des Äquators auf dem 51. Breitengrad (51° N). In dieser Region ist, bedingt durch den niedrigen Sonneneinfallswinkel, eine Vitamin D-Synthese zwischen Oktober und März kaum möglich [Webb et al. 1988, Engelsen et al. 2005]. Es wird angenommen, dass bei fehlender Sonnenbestrahlung eine tägliche Aufnahme von 20 - 25 µg Vitamin D pro Tag nötig ist, um einen drastischen Abfall der 25(OH)D₃-Serumspiegel zu vermeiden [Holick & Chen 2008]. Infolge der schlechten Versorgungslage haben zahlreiche Institutionen und Fachgesellschaften ihre Zufuhrempfehlungen für Vitamin D angepasst. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) erhöhte 2012 die empfohlene Zufuhrmenge für Kinder und Erwachsene auf 20 µg/d [DGE 2013]. Es gestaltet sich problematisch, diesen Bedarf mittels natürlicher Nahrungsquellen zu decken, da der Vitamin D-Gehalt in vielen Lebensmitteln relativ gering ist. Als gute Quelle gelten insbesondere Fettfische sowie Speisepilze [Teichmann et al. 2007, Schmid & Walther 2013]. Weitere tierische Produkte tragen nur bedingt zur alimentären Vitamin D-Zufuhr bei (Tabelle 1-1). In der Bundesrepublik Deutschland liegt die mediane Vitamin D-Aufnahme für Frauen bei 2,2 µg/d und für Männer bei 2,9 µg/d [Max Rubner-Institut 2008]. Hauptquelle bilden dabei Fisch und Fischprodukte [Max Rubner-Institut 2008, Jungert et al. 2012].

Tabelle 1-1 Gehalt an Vitamin D₃ und 25(OH)D₃ in ausgewählten tierischen Lebensmitteln.

Lebensmittel	Vitamin D ₃ [µg/100 g]	25(OH)D ₃ [µg/100 g]	Literatur
Barsch	5,90	kA	Mattila et al. [1999]
Regenbogenforelle	7,50	kA	Mattila et al. [1999]
Hühnerfleisch	0,28	0,20	Mattila et al. [1995]
Schweinelende	0,15	0,09	Clausen et al. [2003]
Eigelb	3,20	0,86	Mattila et al. [1999]
Butter	0,20	0,10	Jakobsen & Saxholt [2009]
Edamer	0,06	<0,05	Mattila et al. [1995]
Schlagsahne	0,07	0,07	Mattila et al. [1995]

Keine Angabe (kA).

Die Absorption von Vitamin D aus dem Gastrointestinaltrakt wird unter Beteiligung von passiven Diffusionsprozessen und den Cholesteroltransportern Niemann-Pick C1 *Like* 1 (NPC1L1), *Cluster of Differentiation* 36 (CD36) und *Scavenger Receptor Class B Member 1* (SR-BI) realisiert [Reboul et al. 2011]. Oral verabreichtes Vitamin D weist eine gute Bioverfügbarkeit auf [Whyte et al. 1979, Cipriani et al. 2013]. Durch Interaktionen mit anderen Nahrungsbestandteilen kann die Bioverfügbarkeit jedoch beeinflusst werden [Diarrassouba et al. 2015a, Diarrassouba et al. 2015b]. Tierische Nahrungsmittel enthalten verhältnismäßig hohe Mengen an 7-DHC [Ostermeyer & Schmidt 2006, Seeburg 2014]. In Hühnereiern übersteigt 7-DHC den Vitamin D₃-Gehalt etwa um das 10-fache [Seeburg 2014]. Derzeit ist jedoch nicht bekannt, ob und inwiefern eine orale Zufuhr von 7-DHC die Bioverfügbarkeit von Vitamin D beeinflusst. Es existieren Hinweise, dass 7-DHC nach Cytochrom-P450-abhängiger Transformation den Leber X-Rezeptor (LXR) aktiviert [Endo-Umeda et al. 2014]. LXR wiederum fungiert als Kernrezeptor und reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen, darunter NPC1L1 und SR-BI [Hu et al. 2010a]. Im Gastrointestinaltrakt wird die Expression von NPC1L1 nach Aktivierung von LXR vermindert [Duval et al. 2006, Alvaro et al. 2010]. Obwohl NPC1L1 an der Absorption von Vitamin D beteiligt ist [Reboul et al. 2011], ist derzeit nicht bekannt, ob sich 7-DHC und Vitamin D in der Bioverfügbarkeit wechselseitig beeinflussen.

1.2 Vitamin D-Anreicherung von Lebensmitteln

Nur wenige Lebensmittel enthalten ausreichend hohe Mengen an Vitamin D, um den täglichen Bedarf von 20 µg [DGE 2013] zu decken. Eine Steigerung der alimentären Vitamin D-Zufuhr kann im Wesentlichen durch drei Strategien erfolgen: die verstärkte Auswahl Vitamin D-reicher Nahrungsmittel, die Einnahme von Supplementen oder die gezielte Anreicherung von Lebensmitteln mit Vitamin D [Cashman 2012]. Der Vorteil einer gezielten Steigerung des Vitamin D-Gehaltes in Lebensmitteln besteht darin, dass hierbei breite Bevölkerungsgruppen erreicht werden und zugleich eine ausgewogene Ernährungsweise ermöglicht wird. Im internationalen Vergleich bestehen jedoch große Unterschiede in der politischen Reglementierung zur Vitamin D-Anreicherung von Lebensmitteln [Calvo et al. 2005]. In den USA und Kanada ist der Zusatz von Vitamin D₂ zu bestimmten Grundnahrungsmitteln gesetzlich vorgeschrieben und ferner optional für ein breites Spektrum an Produkten wie z.B. Frühstückscerealien, Fruchtsäften sowie Milch- und Milcherzeugnissen [Calvo et al. 2004, Moore et al. 2004, Calvo & Whiting 2013]. Einige Länder, darunter Großbritannien und Irland, verlangen keine verpflichtende Vitamin D-Anreicherung, erlauben jedoch den Zusatz von Vitamin D zu bestimmten

Grundnahrungsmitteln [Kiely & Black 2012, Carroll et al. 2014]. Hingegen wird bei der Vitamin D-Anreicherung in Deutschland sehr restriktiv verfahren. Die Verordnung über vitaminisierte Lebensmittel (LMvitV, Stand 2011) gestattet den Zusatz von Vitamin D lediglich für Margarine- und Mischfetterzeugnisse. Infolge der praktizierten Vitamin D-Anreicherung wird somit in den USA und Kanada eine deutlich bessere Vitamin D-Versorgung der Bevölkerung ermöglicht [Calvo et al. 2005, Hilger et al. 2014]. Im Allgemeinen ist die Anreicherung von Lebensmitteln ein geeignetes Verfahren um eine Verbesserung des Vitamin D-Status in der Bevölkerung zu erreichen [O'Donnell et al. 2008]. Brown et al. [2013] entwickelten ein Modell zur Vitamin D-Anreicherung in Deutschland unter Berücksichtigung spezifischer Ernährungsgewohnheiten und natürlicher Vitamin D-Quellen. Demnach würde ein Vitamin D-Zusatz von 9,20 µg/100 g Brot bzw. 7,50 µg/100 g Milch eine Erhöhung der 25(OH)D₃-Serumkonzentration auf 75 nmol/l bewirken [Brown et al. 2013]. Die Anreicherung eines einzelnen Lebensmittels würde jedoch das Risiko einer Hypervitaminose stark erhöhen, sodass eine geringer dosierte Anreicherung verschiedener Grundnahrungsmittel sinnvoll erscheint [Kiely & Black 2012, Brown et al. 2013].

Die Entwicklung sicherer und effektiver Anreicherungsstrategien ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Doch bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts war man bemüht, den Vitamin D-Gehalt in Lebensmitteln zu erhöhen [Holick 2006]. Hess & Weinstock [1924] bestrahlten Öl mit UV-Licht und beobachteten, dass dieses ein antirachitisches Potential aufweist. Auch heutzutage wird UVB-Licht eingesetzt, um Vitamin D in Lebensmitteln anzureichern. So lässt sich der Vitamin D-Gehalt von Backwaren durch Verwendung von UVB-bestrahlter Bäckerhefe steigern [European Food Safety Authority 2014]. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung des Vitamin D-Gehaltes in Lebensmitteln bieten Verfahren, welche auf *Bio-Addition* basieren. Bio-Addition beschreibt dabei die gezielte Anreicherung pflanzlicher und tierischer Lebensmittel während der Primärproduktion [Calvo & Whiting 2013]. Folglich findet die Anreicherung von Vitamin D bereits vor der industriellen Verarbeitung statt. So lässt sich die Vitamin D-Konzentration von Kuhmilch durch Erhöhung des Vitamin D-Anteils im Tierfutter steigern [Hollis et al. 1981, Reeve et al. 1982]. Auch die UVB-Bestrahlung von Pilzen führt zu einer Erhöhung des Vitamin D-Gehaltes und repräsentiert ein effektives Bio-Addition Verfahren [Ko et al. 2008, Kalaras et al. 2012]. Problematisch ist dabei, dass selbst durch UVB-Expositionen von nur einer Sekunde Vitamin D-Gehalte von 12,6 µg/g Trockenmasse (TM) erzielt werden [Kalaras et al. 2012]. Insofern wäre der Verzehr einer Pilz-Mahlzeit bereits mit der Überschreitung empfohlener Zufuhrmengen assoziiert und nicht mit den Grundzügen einer sicheren Anreicherung vereinbar. Ein geeignetes Lebensmittel für Bio-Addition basierte Vitamin D-

Anreicherung ist das Hühnerei. Durch Zusatz von Vitamin D zum Legehennenfutter kann eine effektive Erhöhung der Gehalte im Ei erzielt werden [Mattila et al. 1995, Mattila et al. 1999, Mattila et al. 2003, Yao et al. 2013, Browning & Cowieson 2014]. Zum Schutz der Hennen vor Hypervitaminosen ist der Vitamin D-Zusatz zum Futter jedoch auf 80 µg/kg limitiert. Für eine effektive Erhöhung des Vitamin D-Gehaltes im Ei wären weitaus höhere Mengen erforderlich. Nach vierwöchiger Gabe eines Futters, welches mit 260 µg Vitamin D pro kg versetzt war, konnte der Gehalt an Vitamin D₃ im Eigelb von 0,03 µg/g auf 0,23 µg/g gesteigert werden [Mattila et al. 1999]. Obwohl dieses Verfahren der Bio-Addition unter Berücksichtigung der Rechtslage nicht praktikabel ist, bietet das Hühnerei als Ziellebensmittel dennoch entscheidende Vorteile. So ist der Gehalt an 25(OH)D₃ im Ei weitaus größer als in anderen tierischen Lebensmitteln [Browning & Cowieson 2014, Liu et al. 2014]. Dies ist von besonderem Interesse, da 25(OH)D₃ eine höhere biologische Aktivität als Vitamin D₃ selbst hat [Ovesen et al. 2003, Cashman 2012]. Für eine gute Versorgung ist jedoch nicht nur die Menge an Vitamin D-Metaboliten im Ziellebensmittel, sondern auch die Bioverfügbarkeit entscheidend. Die Absorption von Vitamin D ist abhängig von der Zusammensetzung und Beschaffenheit weiterer Nahrungskomponenten [Grossmann & Tangpricha 2010, Diarrassouba et al. 2015]. Da mit dem Verzehr eines Eies auch Lipide aufgenommen werden, ist eine sehr gute Bioverfügbarkeit für das lipophile Vitamin D zu erwarten. Um einen Beitrag zur besseren Versorgung leisten zu können, muss eine ausreichende Stabilität der Vitamere gewährleistet werden. Generell haben haushaltsübliche Zubereitungsverfahren wie Kochen und Braten einen geringen Einfluss auf den Vitamin D-Gehalt der Lebensmittel [Mattila et al. 1999, Clausen et al. 2003, Jakobsen & Knuthsen 2014]. Licht und Sauerstoff fördern jedoch dessen Abbau, sodass der Vitamin D-Gehalt im Produkt vermindert wird [Renken & Warthesen 1993, Murphy et al. 2001]. Für das Vitamin D-haltige Eigelb ist durch Eiklar und Eischale ein natürlicher Schutz vor diesen physikalischen Umwelteinflüssen gewährleistet. Der Pro-Kopf-Verbrauch von Hühnereiern liegt im bundesweiten Durchschnitt bei 217 Stück jährlich [Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2013]. Diese Zahlen belegen, dass das Ei ein häufig verzehrtes Nahrungsmittel darstellt. Durch Erhöhung der Vitamin D-Gehalte könnten folglich breite Bevölkerungsgruppen kontinuierlich versorgt werden. Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht ein neues und innovatives Verfahren zur Anreicherung von Vitamin D im Hühnerei, welches auf der UVB-induzierten endogenen Vitamin D-Synthese basiert. Es sollte getestet werden, ob und inwieweit der Vitamin D-Gehalt im Ei durch UVB-Exposition der Legehennen gesteigert werden kann.

1.3 Physiologische Bedeutung von Vitamin D für die Legehennen

Im Rahmen der konventionellen Eiproduktion werden aufwendig gezüchtete Legehybriden eingesetzt, die sich durch eine besonders gute Legetätigkeit auszeichnen. Während einer Legeperiode von 12 Monaten werden so bis zu 300 Eier produziert. Zur Ausbildung der Kalkschale müssen große Mengen Calcium bereit gestellt werden, da diese im Mittel 2 g des Minerals enthält [Kirchgeßner 2004]. Dem Vitamin D kommt deshalb für die Regulation der Calciumhomöostase eine besondere Bedeutung zu. Eine Reduktion der Calciumkonzentration im Plasma wird durch calciumsensitive Rezeptoren erfasst [Hurwitz 1996, Ramasamy 2006] und führt zur gesteigerten Calciumverwertung aus der Nahrung. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimuliert dabei im Enterozyten den transzellulären Transport unter Beteiligung luminaler und basolateraler Calciumkanäle sowie dem Calbindin $\text{D}_{28\text{k}}$ [Yang et al. 2011, Sugiyama et al. 2007]. Ferner kann eine rasche Mobilisierung von Calciumreserven aus medullären Knochen die Bereitstellung von extrazellulärem Calcium für die Eischalenbildung gewährleisten. Eine erhöhte Verfügbarkeit von Calcium ist mit einer gesteigerten Mineralisierung der medullären Knochen assoziiert [Cufadar et al. 2011]. Fleming [2008] beobachtete eine erhöhte Festigkeit des Tibiotarsus infolge einer UV-Exposition von Broilern, denen ein Vitamin D-armes Futter verabreicht wurde. Es wird ersichtlich, dass Vitamin D einen entscheidenden Einfluss auf die Integrität der Knochen und folglich auf die Gesundheit der Tiere hat. Auch die Qualität der Eischale variiert in Abhängigkeit vom Vitamin D-Status [Bar et al. 1999]. Eine intakte und stabile Eischale ist für die Vermarktung der Hühnereier sowie die Lebensmittelsicherheit von besonderer Bedeutung.

Im Vergleich zu den Säugetieren ergeben sich im Vitamin D-Metabolismus der Legehennen einige Besonderheiten. Die Regulation der renalen $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -Hydroxylase (CYP27B1) unterliegt bei den Vögeln einer zusätzlichen Kontrolle durch die Geschlechtshormone Testosteron und Estradiol [Tanaka et al. 1976, Tanaka et al. 1978]. Die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration im Plasma der Hennen wird somit beim einsetzen der Legereife erhöht [Bar & Norman 1981]. Daher wird der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration zur Bewertung des Vitamin D-Status eine größere Bedeutung als beim Säuger zugemessen. Ein weiterer Unterschied besteht im Transport der Vitamin D-Metaboliten. Hühner scheinen zwei Isoformen des Vitamin D-bindenden Proteins zu exprimieren, wobei jeweils eine Isoform Vitamin D_3 bzw. $25(\text{OH})\text{D}_3$ transportiert [Edelstein et al. 1973]. In das Eigelb wird überwiegend das Vitamin D_3 -bindende Protein transferiert [Fraser & Emtage 1976]. Obwohl große Teile der Haut beim Geflügel mit Federn bedeckt sind, sind auch Hühner imstande Vitamin D endogen zu bilden. Maßgeblich scheinen hieran die Haut der

unbefiederten Ständer beteiligt zu sein [Tian et al. 1994]. Diese unterscheidet sich jedoch von der humanen Haut. Die Ständerhaut ist beim Huhn fest mit dem darunter liegenden Knochen verwachsen und besteht überwiegend aus Korneozyten. Tian et al. [1993] führten eine UV-Exposition humaner Haut und aviärer Ständerhaut durch. Die relative Vitamin D₃-Ausbeute unterschied sich dabei nicht zwischen beiden Spezies. Folglich scheinen die strukturellen Unterschiede zur humanen Haut keine Auswirkung auf die endogene Vitamin D-Synthese beim Huhn zu haben.

Die Calcium-Homöostase wird insbesondere durch den Vitamin D-Status der Legehennen bestimmt. Die Gesellschaft für Ernährungsphysiologie [1999] empfiehlt eine alimentäre Vitamin D₃-Zufuhr von 11,3 µg/kg Alleinfuttermittel. Die Empfehlungen anderer Experten reichen bis zu einem Vitamin D₃-Gehalt von 87,5 µg/kg [Jeroch et al. 2011]. In der Europäischen Union ist der Zusatz von Vitamin D in Form von Vitamin D₃ oder 25(OH)D₃ zum Legehennenfutter jedoch auf 80 µg/kg limitiert (Verordnung (EG) Nr. 1443/2006).

2 Zielstellung

Bio-Addition beschreibt eine innovative Methode zur Erhöhung des Nährstoffgehalts in Lebensmitteln während der Primärproduktion. Gegenstand dieser Arbeit war es, ein auf UVB-Exposition basierendes Verfahren zur Steigerung des Vitamin D-Gehaltes im Hühnerei zu entwickeln sowie weitere Nutzen- und Risikoparameter für Tiere und Konsumenten abzuschätzen. Da Hühnereier hohe Mengen an 7-DHC enthalten, sollte auch der Einfluss einer 7-DHC-reichen Nahrung auf die Bioverfügbarkeit von Vitamin D untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Fragestellungen adressiert:

- I) **Inwieweit lässt sich der Vitamin D-Gehalt im Hühnerei durch eine UVB-Exposition von Legehennen erhöhen?** Der Vitamin D-Gehalt der Eier sollte soweit gesteigert werden, dass diese maßgeblich zur besseren Versorgung beitragen können, ohne jedoch den gesamten Tagesbedarf an Vitamin D zu decken. Die Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung stellt dabei ein wichtiges Instrument dar. Zudem sollte getestet werden, ob sich durch die UVB-Exposition der 7-DHC-Gehalt der Haut vermindert und somit die Effizienz der Vitamin D-Synthese nachlässt.
- II) **Hat eine Exposition mit UVB-Licht Einfluss auf den Vitamin D-Gehalt im Muskelfleisch?** Da eine Erhöhung der Vitamin D-Synthese möglicherweise zur Anreicherung von Vitamin D in Geweben führt, könnte dieses Bio-Addition-Verfahren auch im Rahmen der Fleischerzeugung Anwendung finden.
- III) **Welchen Einfluss hat das Haltungssystem der Legehennen auf den Vitamin D-Gehalt im Hühnerei?** Legehennen in Freilandhaltung sind natürlichem UVB-Licht ausgesetzt. Es sollte geprüft werden, ob Eier aus Freilandhaltung einen höheren Vitamin D-Gehalt aufweisen als Eier aus Bodenhaltung.
- IV) **Ist eine UVB-Exposition von Legehennen mit einer Verbesserung der Eischalenqualität assoziiert?** Eine stabile Eischale ist für die Vermarktung von Eiern von entscheidender Bedeutung. Die Qualität der Eischale wird dabei maßgeblich durch die Verwertung von alimentär zugeführtem Calcium bestimmt. Eine Verbesserung der Calciumabsorption infolge UVB-induzierter Vitamin D-Synthese würde mit einer gesteigerten Eischalenmineralisierung einhergehen.
- V) **Ergeben sich durch die UVB-Exposition gesundheitliche Folgen für die Legehenne?** Im Hinblick auf diese Fragestellung sollte geklärt werden, ob eine UVB-Exposition mit einer Verbesserung des Vitamin D-Status der Tiere einhergeht. Ferner wurde der Einfluss auf die Stabilität eines medullären Knochens untersucht.

Um eine UVB-induzierte Schädigung der DNA auszuschließen, sollte der Folsäurestatus der Tiere überprüft werden.

- VI) Sinkt der Cholesterolgehalt im Hühnerei infolge einer UVB-Exposition der Hennen?** Sowohl Vitamin D als auch Cholesterol entstehen aus 7-DHC. Folglich könnte eine UVB-induzierte Vitamin D-Synthese mit einem verminderten Transport von Cholesterol in das Hühnerei assoziiert sein.
- VII) Beeinflusst eine alimentäre Zufuhr von 7-DHC die Bioverfügbarkeit von Vitamin D?** Diese Fragestellung ist von besonderem Interesse, da Hühnereier einen hohen Gehalt an 7-DHC aufweisen. Bislang fehlen jedoch Untersuchungen zu möglichen Interaktionen zwischen 7-DHC und Vitamin D.

Die vorliegende Arbeit basiert auf vier tierexperimentellen Studien, die sich mit den obigen Fragestellungen auseinandersetzen (Tabelle 2-1). Die Studien 1, 2 und 3 wurden in Fachzeitschriften mit *Peer-Review* Verfahren publiziert und sind in dieser Form Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Die Daten der Studie 4 wurden auf einem Fachkongress präsentiert.

Tabelle 2-1 Übersicht über die tierexperimentellen Studien und Untersuchungsparameter der vorliegenden Arbeit.

Studie	Fragestellung	Bestimmte Parameter
Studie 1	I)	Haut: 7-DHC Eigelb: Vitamin D ₃ , 25(OH)D ₃
	II)	Oberschenkelmuskel: Vitamin D ₃ , 25(OH)D ₃
	IV)	Eischale: Bruchfestigkeit, Dicke
	V)	Plasma: 25(OH)D ₃ , 1,25(OH) ₂ D ₃ , Calcium, P, Folsäure Leber: Folsäure Knochen: Bruchfestigkeit
	Studie 2	I)
	IV)	Eischale: Bruchfestigkeit, Dicke
	V)	Plasma: 25(OH)D ₃ , 1,25(OH) ₂ D ₃
	VI)	Eigelb: Cholesterol
Studie 3	III)	Eigelb: Vitamin D ₃ , 25(OH)D ₃
	IV)	Eischale: Bruchfestigkeit, Dicke
Studie 4	VII)	Plasma: 25(OH)D ₃ , 7-DHC Leber: Vitamin D ₃ , 25(OH)D ₃ , 7-DHC, relative mRNA-Expression Fettgewebe: Vitamin D ₃ , 25(OH)D ₃ , 7-DHC

3 Tierexperimentelle Studien

3.2 Studie 1

SCHUTKOWSKI A, **Krämer J**, Kluge H, Hirche F, Krombholz A, Theumer T, Stangl GI: UVB exposure of arm animals: study on a food-based strategy to bridge the gap between current vitamin D intakes and dietary targets. *PLoS One* 2013; 8 (7): e69418

UVB Exposure of Farm Animals: Study on a Food-Based Strategy to Bridge the Gap between Current Vitamin D Intakes and Dietary Targets

Alexandra Schutkowski¹, Julia Krämer¹, Holger Kluge¹, Frank Hirche¹, Andreas Krombholz², Torsten Theumer², Gabriele I. Stangl^{1*}

¹ Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany, ² Fraunhofer Institute for Mechanics of Materials IWM, Halle (Saale), Germany

Abstract

Vitamin D deficiency is a global health problem. This study aimed to investigate the efficacy of ultraviolet (UV) B radiation for improving vitamin D₃ content of eggs and meat. In a two-factorial design hens that received diets with 0 (-D₃) or 3,000 IU (+D₃) vitamin D₃/kg were non-exposed (-UVB) or exposed to UVB radiation (+UVB) for 3 h daily over 4 weeks. Data show that UVB radiation was very effective in raising the vitamin D₃ content of egg yolk and meat. Egg yolk from +UVB/-D₃ hens had a higher vitamin D₃ content (17.5±7.2 µg/100 g dry matter (DM)) than those from the -UVB/+D₃ group (5.2±2.4 µg/100 g DM, *p*<0.01). Vitamin D₃ content in egg yolk of vitamin D₃-supplemented hens could be further increased by UVB radiation (32.4±10.9 µg/100 g DM). The content of 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃) in the egg yolk also increased in response to UVB, although less pronounced than vitamin D₃. Meat revealed about 4-fold higher vitamin D₃ contents in response to UVB than to dietary vitamin D₃ (*p*<0.001). In conclusion, exposure of hens to UVB is an efficient approach to provide consumers with vitamin D₃-enriched foods from animal sources.

Citation: Schutkowski A, Krämer J, Kluge H, Hirche F, Krombholz A, et al. (2013) UVB Exposure of Farm Animals: Study on a Food-Based Strategy to Bridge the Gap between Current Vitamin D Intakes and Dietary Targets. PLoS ONE 8(7): e69418. doi:10.1371/journal.pone.0069418

Editor: Richard C. Willson, University of Houston, United States of America

Received: March 13, 2013; **Accepted:** June 10, 2013; **Published:** July 24, 2013

Copyright: © 2013 Schutkowski et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Vitamin D analysis of this study was supported by a grant 0315668A from the Federal Ministry of Education and Research of Germany. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No additional external funding received for the remaining parts of this study.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: gabriele.stangl@landw.uni-halle.de

Introduction

Vitamin D₃ deficiency is a global health problem that has considerable impact on health [1,2,3]. It is suggested that up to 50% of young adults suffer from vitamin D insufficiency worldwide [4]. Vitamin D₃ promotes calcium and phosphate absorption in the intestine, decreases the clearance of these minerals from the kidney and is needed for bone mineralization and bone growth [5,6]. In the last years, more attention has been paid to vitamin D₃ due to its multiple health benefits. More than 220 genes are identified that significantly changed in expression in response to vitamin D₃ [3], particularly those that are involved in cell proliferation, cell differentiation, and immune function [5,7,8], and vitamin D deficiency is associated with several diseases such as cancer and autoimmune disorders [3,7,9]. Thus, the maintenance of an adequate vitamin D₃ status seems to provide a great preventive health potential. The main source (80–90%) of vitamin D₃ is the endogenous synthesis of vitamin D₃ in the skin by exposure to natural sunlight, whereas nutrition contributes to only 10–20% of the vitamin D₃ supply [6,10]. Failing outdoor activities, seasonal variations, air pollution, pigmented skin, and the use of sunscreens affect the efficacy of UVB radiation for cutaneous vitamin D₃ synthesis. Therefore, an increasing number of people depend on dietary sources of vitamin D₃ to prevent vitamin D₃ deficiency or inadequacy. With the exception of fatty fish species,

such as salmon and mackerel, and fish liver oils [11], most natural foods contain very low amounts of vitamin D₃ and are not capable of improving vitamin D₃ status or fulfilling the recommendations for diet intake of vitamin D₃. Based on a report of the U.S. Institute of Medicine, vitamin D₃ is recommended in daily amounts of 15 µg for people younger than 71 years in the USA and Canada [12]. Recommendations for vitamin D₃ intake in different European countries range between 5 and 20 µg daily for adult men and women [13]. In most of the European countries, the recommended amounts of vitamin D₃ were not met by the intake of natural foods [14]. Therefore, food-based strategies need to be developed to improve vitamin D₃ status. In the United States and in Canada, a series of industrial produced foods were fortified with vitamin D [15]. In Europe, vitamin D fortification of food is highly regulated and critically discussed. A novel approach to enrich foods with specific nutrients is the “bio-addition”; thereby, foods are fortified through the addition of nutrients to animal feed during livestock farming production, or manipulation of post-harvest food processes. Eggs are widely and regularly consumed, and offer an interesting target for vitamin D₃ fortification. However, with respect to vitamin D, it is not allowed to fortify animal feed with vitamin D beyond a defined maximum. We therefore came up with the idea that UVB exposure of farm animals such as laying hens might become a promising option to further improve the vitamin D content of foods from animal

origin. In an initial experiment we could show that chickens whose upper part of their body was exposed to UVB did not produce vitamin D-enriched eggs [16]. Current analysis from our research group showed that most of the 7-dehydrocholesterol (7-DHC), the pre-cursor and limiting factor for vitamin D₃ synthesis, was located in the unfeathered skin of the chicken legs. Based on this finding, we hypothesized that an UVB exposure which ensured irradiation of the whole chicken body, including legs, should increase the vitamin D content of eggs and meat. In order to assess the effectiveness of a whole body irradiation of chickens in producing vitamin D-enriched eggs and meat, we analyzed the vitamin D content of eggs and meat in response to UVB treatment of chickens that were fed either a vitamin D₃-deficient diet or a diet that contained the maximum permissible amount of dietary vitamin D. Besides vitamin D₃ metabolites in plasma, eggs, and meat, the laying performance, and also egg shell quality and bone stability were analyzed. We further investigated the folate status of the animals to rule out pronounced side effects of the UVB treatment, since solar radiation is supposed to affect the folic acid levels [17,18,19].

Materials and Methods

Comparative Analysis of 7-DHC Concentrations in Different Skin Areas of Chickens

To obtain information about the amounts and distribution of cutaneous 7-DHC in chickens, we analyzed the 7-DHC concentrations in skin of comb, wattles, unfeathered and feathered legs, and wing of 8 vitamin D₃-adequately supplied Lohmann layers with an age of 21 weeks. Prior to skin sample preparation feathers were plucked and the skin was dissected free from underlying muscle and fat. Skin samples (approximately 2 × 2 cm) were then snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until 7-DHC analysis. Sample treatment and analysis of the 7-DHC concentration in skin is described below.

Animals and Treatment

The experiment was conducted with 36 Lohmann layers with an initial age of 27 weeks and an average body weight of 1777 g (±141 g). Before starting the experiment, hens were fed a standard diet containing 2,500 IU vitamin D₃/kg for 2 weeks. Then, the hens were randomly assigned into four groups of 9 hens each. The hens were individually housed in an environmentally controlled room at 16°C and light (30 lx) from 6:00 a.m. to 8:00 p.m. All hens were fed a diet that consisted of (g/kg diet) wheat (470), extracted soy bean meal (220), corn (100), barley (68.2), calcium carbonate (85), soybean oil (30), dicalcium phosphate (13), vitamin and mineral mix (10), sodium chloride (2) and DL methionine (1.8). Except vitamin D₃, vitamins and minerals were added according to the recommendations of the GfE [20]. From the 36 layers, 18 hens received a diet without any vitamin D₃ (0 IU vitamin D₃/kg; vitamin D₃-deficient diet, -D₃), the other 18 hens were fed a diet supplemented with 3,000 IU vitamin D₃ (Molekula, Gillingham, U.K.) per kg diet (vitamin D₃-adequate diet, +D₃). The diets were calculated on the basis of GfE recommendations for laying hens and contained 11.6 MJ/kg [20]. All diets were fed over a period of 4 weeks. Feed and water from nipple drinkers were available ad libitum during the whole experiment. The experimental procedure was performed according to the established guidelines for care and handling of laboratory animals and was approved by the council of Saxony-Anhalt, Germany (No. 42502-3-656 MLU). The hens were weighted once a week. Food intake, laying performance, egg weight and shell quality were monitored weekly.

UVB Treatment

Two groups of hens (-D₃+UVB and +D₃+UVB) were exposed to UVB for 3 h daily (from 8:00 to 8:30, from 11:00 to 12:00, from 14:00 to 15:00 and from 16:30 to 17:00). The 10 cm long, 23 W UVB lamps (Hobby UV Kompakt Desert 8% UVB, Dohse Aquaristik KG, Gelsdorf, Germany) with equipped heat protection (Dohse Aquaristik KG) were placed near the cage doors to ensure optimal UVB exposure of the hens' legs. The lamps emitted UVB in ranges of 280 to 310 nm. The UVB radiation dosage at a distance of 20 cm was 76 μW/cm² (according to the manufacturer's specification). This UVB irradiation intensity corresponds to that of natural sunlight during summer in the Middle Europe (50° latitude) [21]. An UVB opaque board was placed between the UVB-treated and the non-exposed groups to block incidental irradiation. The UVB lamps had no influence on the temperature inside the cages.

Sample Collection

Blood samples for analysis of vitamin D metabolites, minerals, and folate from each hen were taken at the beginning and at the end of the experiment. The blood was collected in heparinized tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and centrifuged at 1,100 g for 10 min at 4°C. Plasma samples were stored at -80°C pending analysis. To determine egg weight and shell quality, eggs from each hen were collected at the beginning and after week 1, week 2, week 3, and week 4 of the experiment. Egg yolk for analysis of vitamin D₃ and 25(OH)D₃ was collected from eggs of each hen at the beginning and at the end of the experiment. At the end of the experimental period, the hens were killed by decapitation. Fibularis longus muscle of each hen was removed for quantification of vitamin D₃ and 25(OH)D₃, tibiotarsus was excised to measure bone stability, and liver was removed for analysis of folate. All samples were stored at -80°C pending further analysis.

Analysis of 25(OH)D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) in Plasma

The plasma concentration of 25(OH)D₃ was determined by coupled liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) according to Higashi et al. [22]. In brief, plasma samples were mixed with deuterated 25(OH)D₃, which was solved in acetonitrile, (Chemaphor Incorporation, Ottawa, Canada) as an internal standard and extracted with n-hexane. To the dried residue, 4-phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dione (solved in acetonitrile) was added for derivatization. Subsequently to the addition of ethanol and salvation in the mobile phase, the samples were analyzed by HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with Hypersil ODS-column 100 × 2 mm², 5 μm (Agilent Technologies), coupled to a MS system (API 2000, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The detection limit for 25(OH)D₃ was 3.7 nmol/l. Between run precision data were calculated from 2 control sera. The coefficient of variation for 25(OH)D₃ was 3.0%.

The plasma concentration of 1,25(OH)₂D₃ was determined using a commercially available ELISA kit (IDS, Boldon, U.K.) according to the manufacturer's protocol.

Analysis of Calcium and Inorganic Phosphate in Plasma

Calcium in plasma samples was quantified by a colorimetric assay. The test system was based on the formation of a calcium-oxalophthalate complex (Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels, Germany). Prior to analysis, plasma was diluted 1:4 with 0.9% NaCl to avoid interferences with triglycerides in plasma.

The plasma concentration of inorganic phosphate was measured spectrophotometrically according to the manufacturer's protocol (Analyticon Biotechnologies AG). The test system was based on the measurement of ammonium molybdate which forms a complex with inorganic phosphate.

Analysis of 7-DHC in Skin, and Vitamin D₃, 25(OH)D₃ in Egg Yolk and Meat

Vitamin D₃, 25(OH)D₃, and 7-DHC were determined by LC-MS/MS. In brief, samples were homogenized, deuterated internal standard (D₃-d₃, 25(OH)D₃-d₆, and ergosterol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) was added and hydrolyzed under alkaline conditions and oxygen exclusion. Samples were extracted with n-hexane and hexane phase was washed with ultrapure water. The vitamin D metabolites were fractionated using HPLC (Agilent 1100 HPLC, Agilent Technologies) according to Mattila et al. [23]. Further analytical steps were in accordance to those described for 25(OH)D₃ in plasma. The detection limit was 0.17 µg/100 g for vitamin D₃, and 0.1 µg/100 g for 25(OH)D₃. The coefficient of variation for vitamin D₃ was 3.9%, and 4.6% for 25(OH)D₃.

Analysis of Egg Shell Thickness and Stability

Thickness of each egg shell was measured by use of a micrometer screw capable of 0.01 mm accuracy. Thickness of three fragments from the equatorial region of each egg shell was averaged. Prior to analysis, shell membranes were removed. The stability of egg shells was determined by an electronically controlled breaking strength tester (Messtechnik Gutsch, Nauendorf, Germany). Values were expressed in Newton (N).

Analysis of Tibiotarsus Stability

Three-point bending tests were performed to determine the fracture loads. The specimens were tested using a Zwick Z050 electro-mechanical testing machine (Zwick GmbH & Co KG, Ulm, Germany). The loading rate was set to 80 mm/min, the span (distance between the supports) to 80 mm and the radius of the cylindrical supports and the cylindrical loading blocks to 5 mm. The specimens were carried out at 23±2°C and a relative humidity of 50%.

Analysis of Folate in Plasma and Liver

Folate in plasma and liver samples was quantified using a microbiological test kit containing *Lactobacillus rhamnosus* coated microtiter plates according to the manufacturer's protocol (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Prior to analysis, liver samples were homogenized and enzymatically hydrolyzed using pancreatin (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

Statistical Analysis

Values are expressed as mean ± SD. Statistical analyses were performed using SPSS 20 (IBM, Armonk, NY, USA). Two-way ANOVA was used to compare the effects of UVB irradiation (-UVB vs. +UVB), dietary vitamin D₃ (vitamin D₃-deficient diet vs. vitamin D₃-adequate diet), and their interaction. When two-way ANOVA revealed a significant interaction between UVB and vitamin D₃, a post-hoc comparison was performed. In case of variance homogeneity, means of the four groups were compared by Tukey's test, or in case of variance heterogeneity by Games-Howell test. Significances of differences between basal and final means were tested by the paired *t*-test. Means were considered significantly different at *p*<0.05. Values under the detection limit are represented by randomly assigned values.

Results

Concentration of 7-DHC Varies Strongly in the Different Skin Areas of Hens

7-DHC is the limiting factor for vitamin D₃ synthesis. To figure out which part of the chicken skin contains most of the vitamin D₃ precursor molecule and should be inevitably exposed to UVB irradiation to increase vitamin D synthesis, we determined the concentrations of 7-DHC in 5 different skin samples of 8 laying hens by LC-MS/MS. Figure 1 shows large differences in 7-DHC contents between the chosen skin parts. The cutaneous area of the unfeathered legs contained the highest 7-DHC levels, which were on average 190-fold higher than that of the comb. The lowest 7-DHC concentrations were observed in the feathered parts of the skin such as wings and feathered legs. These findings prompted us to mount the UVB lamps in the experimental housing system in a lateral position to ensure an adequate UVB irradiation of skin in the leg area.

UVB Radiation and Dietary Vitamin D₃ did not Influence Food Intake and Body Weight

None of the hens showed behavioral peculiarities or symptoms of erythema in response to UVB radiation. Two-way ANOVA did not reveal main and interactive effects of UVB exposure and dietary vitamin D₃ on daily food intake (-D₃/-UVB group, 114.1±12.8 g; +D₃/-UVB group, 118.6±10.0 g; -D₃/+UVB group, 121.9±7.3 g; +D₃/+UVB group, 117.3±8.1 g; mean ± SD) and body weight (-D₃/-UVB group, 1734±151 g; +D₃/-UVB group, 1797±187 g; -D₃/+UVB group, 1952±196 g; +D₃/+UVB group, 1810±97 g; mean ± SD; Table S1).

Effects of UVB Exposure on Plasma Concentrations of 25(OH)D₃ and 1,25(OH)₂D₃ of hens on a Vitamin D₃-deficient and Vitamin D₃-adequate Diet

To examine the vitamin D status of hens in response to UVB radiation and dietary vitamin D₃, the plasma concentrations of 25(OH)D₃ and 1,25(OH)₂D₃ were analyzed. Figure 2A and 2B show that the plasma concentration of 25(OH)D₃ increased much more in response to UVB radiation and dietary vitamin D₃ than the plasma level of 1,25(OH)₂D₃. Two-way ANOVA data reveal a

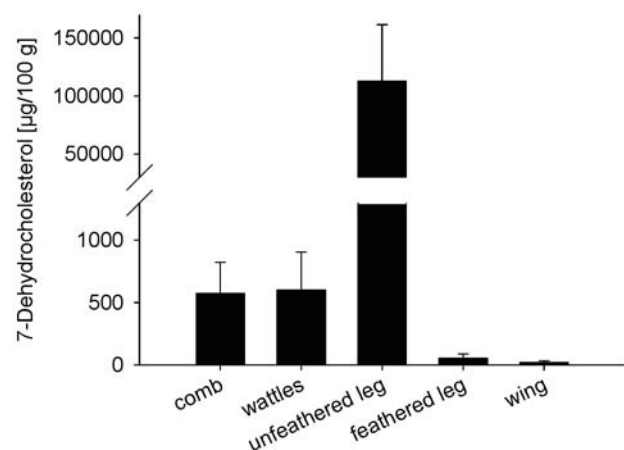


Figure 1. Cutaneous contents of 7-DHC to assess the capacity of different areas of chicken skin to produce vitamin D₃. Data represent mean ± SD of 7-DHC contents of comb, wattles, unfeathered legs, feathered legs, and wing (n=8). doi:10.1371/journal.pone.0069418.g001

strong interactive effect of UVB exposure and dietary vitamin D₃ on the plasma concentration of 25(OH)D₃ ($p < 0.001$, Figure 2A, Table S1), and independent effects of UVB exposure ($p < 0.01$) and dietary vitamin D₃ ($p < 0.001$) without treatment factor interaction on the circulating plasma level of 1,25(OH)₂D₃ (Figure 2B, Table S1). By comparison of the 25(OH)D₃ plasma levels in response to the treatment factors it was noticeable that UVB treatment was capable of increasing the 25(OH)D₃ plasma levels in the group of hens on a vitamin D₃-deficient diet ($p < 0.001$) but not in the hens that received the vitamin D₃-adequate diet (Figure 2A). Supplementation of dietary vitamin D₃ markedly increased the plasma level of 25(OH)D₃ in the group which was non-exposed to UVB radiation but not in the group exposed to UVB radiation ($p < 0.001$, Figure 2A). Figure 2B shows that hens on a vitamin D₃-deficient diet that were non-exposed to UVB had the lowest plasma level of 1,25(OH)₂D₃ compared to the other groups. Two-way ANOVA data revealed that both treatment factors contributed to increase the 1,25(OH)₂D₃ plasma concentration ($p < 0.01$, Table S1).

Plasma Concentrations of Calcium and Inorganic Phosphate were not Affected by UVB Exposure and Dietary Vitamin D₃

Despite strong differences in vitamin D status, two-way ANOVA did not reveal any significant effects of UVB exposure or dietary vitamin D₃ on plasma concentrations of calcium (-UVB/-D₃ group, 6.79 ± 1.66 nmol/l; -UVB/+D₃ group, 8.11 ± 1.65 nmol/l; +UVB/-D₃ group, 7.50 ± 1.96 nmol/l; +UVB/+D₃ group, 8.22 ± 1.52 nmol/l; mean \pm SD) and inorganic phosphate (-UVB/-D₃ group, 1.73 ± 0.37 nmol/l; -UVB/+D₃ group, 1.89 ± 0.39 nmol/l; +UVB/-D₃ group, 1.76 ± 0.20 nmol/l; +UVB/+D₃ group, 1.98 ± 0.39 nmol/l; mean \pm SD) (Table S1).

Effects of UVB Exposure on Vitamin D₃ and 25(OH)D₃ in Egg Yolk of Hens on a Vitamin D₃-deficient and Vitamin D₃-adequate Diet

Figures 3A and 3C show the changes (final - basal) and final contents of vitamin D₃ in egg yolk in response to UVB exposure of hens on a vitamin D₃-deficient and vitamin D₃-adequate diet. Two-way ANOVA revealed significant effects of UVB radiation ($p < 0.001$), dietary vitamin D₃ ($p < 0.001$) and an interaction between these two factors ($p < 0.05$) on the vitamin D₃ content of the egg yolk (Table S1). The findings demonstrate that both treatment factors were capable of increasing the vitamin D₃ content in eggs, even though the UVB irradiation was more effective than the dietary vitamin D₃ supplementation. Importantly, we found that dietary vitamin D₃ could increase the vitamin D₃ content of egg yolk stronger in the group exposed to UVB than in the group non-exposed to UVB radiation. Thus, by far the highest content of vitamin D₃ in eggs could be obtained with a combination of UVB exposure and dietary vitamin D₃. Figures 3B and 3D show the changes (final - basal) and final 25(OH)D₃ contents in egg yolk in response to the dietary vitamin D₃ and UVB treatment. An interactive effect of dietary vitamin D₃ and UVB exposure on 25(OH)D₃ changes ($p < 0.001$) and the final 25(OH)D₃ ($p < 0.001$) content of egg yolk was confirmed by two-way ANOVA (Table S1). Main effects for UVB exposure ($p < 0.001$) and dietary vitamin D₃ ($p < 0.001$) were also significant (Table S1). As expected, the 25(OH)D₃ content of eggs decreased compared to baseline if hens on a vitamin D₃-deficient diet were non-exposed to UVB radiation (Figure 3B, $p < 0.001$). UVB irradiation and dietary vitamin D₃ improved the 25(OH)D₃

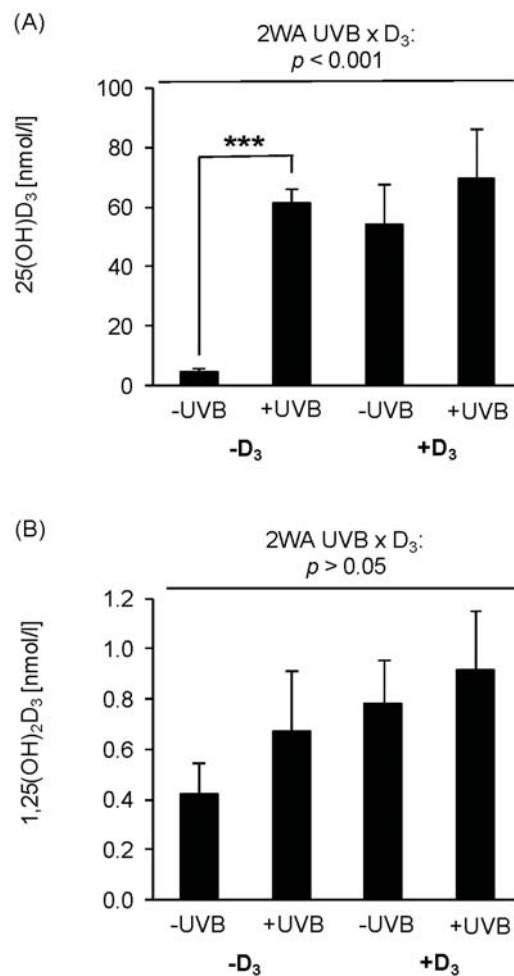


Figure 2. Vitamin D status of chickens in response to UVB exposure and dietary vitamin D₃. (A) Data in the top panel represent mean \pm SD ($n = 9$) of plasma 25(OH)D₃ concentrations in non-treated (-UVB) or UVB-treated (+UVB) hens that were fed either a vitamin D₃-deficient (-D₃) or vitamin D₃-adequate diet (+D₃), respectively. Data were analyzed by two-way ANOVA with the classification factors UVB exposure, vitamin D₃ in the diet, and the interaction between both factors. Effect of UVB: $p < 0.001$, vitamin D₃: $p < 0.001$, UVB \times vitamin D₃: $p < 0.001$. Individual means of the groups were compared by post-hoc test. Asterisks within one diet (-D₃ and +D₃) indicate a significant difference between -UVB and +UVB groups, *** $p < 0.001$. (B) Data in the bottom panel represent mean \pm SD ($n = 9$) of plasma 1,25(OH)₂D₃ concentrations in non-treated (-UVB) or UVB-treated (+UVB) hens that were fed either a vitamin D₃-deficient (-D₃) or vitamin D₃-adequate diet (+D₃), respectively. Data were analyzed by two-way ANOVA with the classification factors UVB exposure, vitamin D₃ in the diet, and the interaction between both factors. Effect of UVB: $p < 0.001$, vitamin D₃: $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0069418.g002

content in egg yolk (two-way ANOVA, $p < 0.001$, Figure 3D, Table S1), although the UVB irradiation was marginally more effective than the dietary vitamin D₃ in increasing the 25(OH)D₃ content in egg yolk. Interestingly, dietary vitamin D₃ particularly increased the 25(OH)D₃ contents of egg yolk in UVB-non-exposed hens on the vitamin D₃-deficient diet, and to a minor extent in UVB-exposed animals (Figure 3D). Nevertheless, as shown for the vitamin D₃ content of eggs, the highest 25(OH)D₃ contents in eggs resulted from a combination of UVB radiation and dietary vitamin

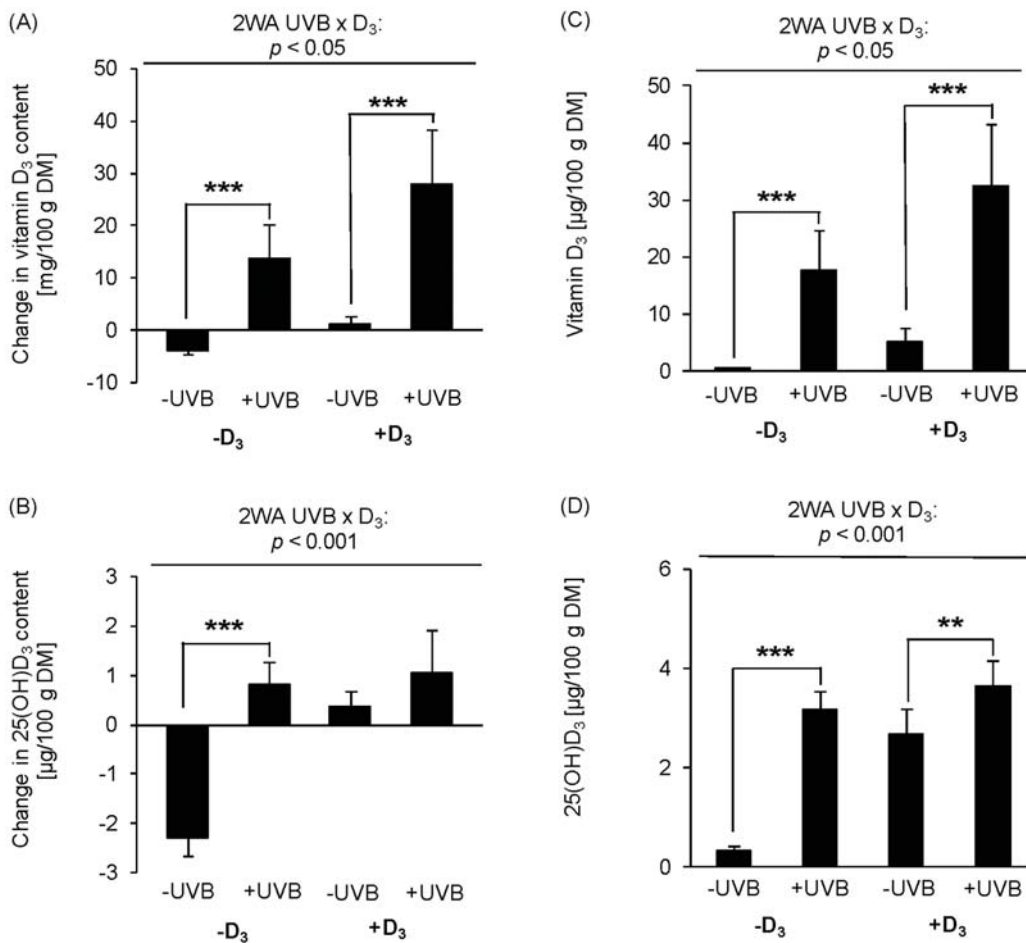


Figure 3. UVB exposure is an effective approach to fortify egg yolk with vitamin D₃. Changes between basal and final vitamin D₃ (A) and 25(OH)D₃ (B) contents in egg yolk dry matter (DM) and final contents of vitamin D₃ (C) and 25(OH)D₃ (D) in egg yolk DM and in non-treated (-UVB) or UVB-treated (+UVB) hens that were fed either a vitamin D₃-deficient (-D₃) or vitamin D₃-adequate diet (+D₃), respectively. Data represent mean \pm SD (n=9). Data were analyzed by two-way ANOVA with the classification factors were UVB exposure, vitamin D₃ in the diet, and the interaction between both factors. (A) Effect of UVB: $p < 0.001$, vitamin D₃: $p < 0.001$, UVB \times vitamin D₃: $p < 0.05$. (B) Effect of UVB: $p < 0.001$, vitamin D₃: $p < 0.001$, UVB \times vitamin D₃: $p < 0.001$. When two-way ANOVA (2WA) revealed a significant interaction between UVB \times vitamin D₃ individual means of the groups were compared by post-hoc test. Asterisks within one diet group (-D₃ and +D₃) indicate a significant difference between -UVB and +UVB groups, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0069418.g003

D₃. In all treatment groups, egg white did not show any detectable contents of vitamin D₂ (detection limit 0.17 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) and 25(OH)D₂ (0.1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) (data not shown).

Effects of UVB Exposure on Vitamin D₃ and 25(OH)D₃ in Fibularis Longus Muscle of Hens on a Vitamin D₃-deficient and Vitamin D₃-adequate Diet

Irrespective of the vitamin D₃ in the diet, hens non-exposed to UVB radiation had no detectable vitamin D₃ contents in their fibularis longus muscles (Figure 4A). UVB irradiation increased the vitamin D₃ content in the muscles of chickens to values that ranged between 0.16 and 0.96 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. By comparison of both UVB-exposed groups, the vitamin D₃ content of muscle was higher in the group that received the vitamin D₃-adequate diet than in the group that was fed the vitamin D₃-deficient diet ($p < 0.05$). Figure 4B demonstrates the 25(OH)D₃ content in the muscles in response to UVB radiation in hens on a vitamin D₃-deficient and -adequate diet. Similar to the vitamin D₃ data, hens of the -D₃/-UVB group had undetectable contents of 25(OH)D₃

in their muscles. Supplementation with dietary vitamin D₃ and also UVB exposure slightly increased the muscle contents of 25(OH)D₃, whereby the UVB-exposed groups reached higher contents in their muscles than the group fed the vitamin D₃-adequate diet ($p < 0.05$).

Effect of UVB Exposure on Laying Performance, Egg Weight and Egg Shell Quality of Hens on a Vitamin D₃-deficient and Vitamin D₃-adequate Diet

Mean egg production rate (number of eggs per hen and week) was not significantly influenced by the treatment factors, although hens from the -UVB/-D₃ group showed a slight drop in egg production within the last experimental week compared to the other group (-UVB/-D₃ group, 6.0 ± 1.6 eggs/week; -UVB/+D₃ group, 7.0 ± 0.0 eggs/week; +UVB/-D₃ group, 6.9 ± 0.3 eggs/week; +UVB/+D₃ group, 7.0 ± 0.0 eggs/week) (Table S1). Two-way ANOVA data show that the mean egg weights at defined times within the 4-week period of the experiment were not significantly influenced by UVB exposure and dietary vitamin D₃,

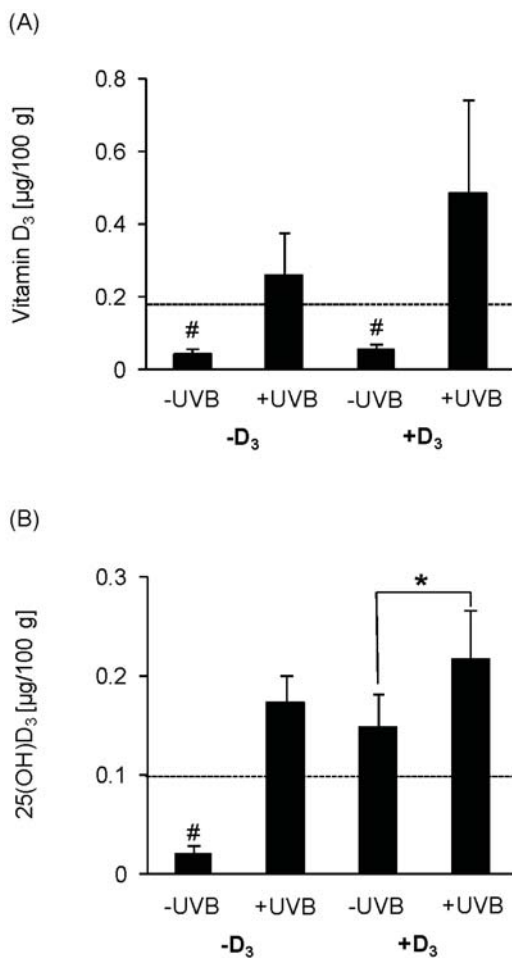


Figure 4. UVB exposure increases vitamin D₃ content in skeletal muscle. (A) Data in the top panel represent mean \pm SD ($n=9$) of vitamin D₃ content in fibularis longus muscle of non-treated (-UVB) or UVB-treated (+UVB) hens that were fed either a vitamin D₃-deficient (-D₃) or vitamin D₃-adequate diet (+D₃), respectively. Values below the detection limit of 0.17 $\mu\text{g}/100\text{g}$ for vitamin D₃ are represented by randomly assigned values (#). The detection limit is marked by a dotted line ("·"). UVB exposure, but not dietary vitamin D₃ was capable of increasing the vitamin D₃ content in muscle to values above the detection limit. (B) Data in the bottom panel represent mean \pm SD ($n=9$) of 25(OH)D₃ content in fibularis longus muscle of non-treated (-UVB) or UVB-treated (+UVB) hens that were fed either a vitamin D₃-deficient (-D₃) or vitamin D₃-adequate diet (+D₃), respectively. Values below the detection limit of 0.1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ for 25(OH)D₃ are represented by randomly assigned values (#). The detection limit is marked by a dotted line ("·"). Individual means of the groups were compared by post-hoc test. Asterisks within one diet group (-D₃ and +D₃) indicate a significant difference between -UVB and +UVB groups, * $p<0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0069418.g004

respectively (Figure 5A, Table S1). Data demonstrate higher egg weights at the end of the 4-week experiment compared to baseline in the groups that were UVB exposed and/or received vitamin D₃ with their diets ($p<0.05$, paired t -test), but not in the -UVB/-D₃ group (Figure 5A).

Figures 5B and 5C show the egg shell thickness and the egg shell stability in response to UVB radiation and dietary vitamin D₃ during the 4-week experiment. From the beginning of the second experimental week, egg shell thickness was significantly influenced

by dietary vitamin D₃ ($p<0.05$, two-way ANOVA, Figure 5B), and there was a tendency of an interaction effect on egg shell thickness at the end of the experiment ($p = 0.053$, two-way ANOVA). Although the -UVB/-D₃ group showed a trend toward lower egg shell thickness after 3 and 4 weeks of the experiment, paired t -test data did not reveal differences compared to baseline. During the experimental period an increasing influence of UVB and dietary vitamin D₃ on egg shell stability became evident. At the end of the experiment, two-way ANOVA analysis revealed significant main effects of UVB radiation ($p<0.01$) and dietary vitamin D₃ ($p<0.05$) and a significant interaction between these both factors ($p<0.05$) on egg shell stability (Figure 5C). Compared to baseline, the stability of eggs from the -UVB/-D₃ group was constantly dropping during the experimental period, and reached a minimum after 4 weeks which was significantly lower compared to baseline ($p<0.05$, paired t -test, Figure 5C).

Effect of UVB Exposure on Tibiotarsus Stability and Folate Status of Hens on a Vitamin D₃-deficient and Vitamin D₃-adequate Diet

Hens non-exposed to UVB radiation that received the vitamin D₃-deficient diet revealed a lower mechanical stability of tibiotarsus than hens from the other groups (Figure 6, $p<0.01$). Two-way ANOVA data revealed an interactive effect of dietary vitamin D₃ and UVB exposure on tibiotarsus stability ($p<0.01$, Table S1). In order to investigate possible effects of UVB radiation on folate status, the concentrations of folate in plasma and liver of the hens were determined. Neither the concentration of folate in plasma (-UVB/-D₃ group, 49.8 ± 18.6 nmol/l; -UVB/+D₃ group, 45.5 ± 17.4 nmol/l; +UVB/-D₃ group, 56.8 ± 21.5 nmol/l; +UVB/+D₃ group, 41.5 ± 10.4 nmol/l; mean \pm SD), nor that in liver (-UVB/-D₃ group, 10.5 ± 1.1 $\mu\text{g}/\text{g}$; -UVB/+D₃ group, 9.8 ± 2.3 $\mu\text{g}/\text{g}$; +UVB/-D₃ group, 10.1 ± 1.7 $\mu\text{g}/\text{g}$; +UVB/+D₃ group, 10.5 ± 1.4 $\mu\text{g}/\text{g}$; mean \pm SD) was influenced by dietary vitamin D₃ and UVB exposure, respectively. This was confirmed by the two-way ANOVA data (Table S1).

Discussion

Results from the current study reveal UVB exposure of hens as an appropriate way and a highly effective approach to increase the vitamin D content mainly in eggs and also in meat. Data further show that an exposure to UVB is capable of raising the vitamin D content in egg yolk and muscle much stronger than feeding hens with diets that contain maximum permissible dosages of vitamin D₃. UVB radiation was still effective in increasing the vitamin D content of eggs and meat even in the group that received 3,000 IU vitamin D₃/kg feed. Previous studies that aimed to increase the vitamin D₃ content in eggs used vitamin D₃-enriched feeds. In these experiments the transfer of vitamin D₃ from the feed into eggs proved to be very efficient and highly responsive [24,25,26]. In one of these studies in which hens received diets with 9,700, 17,200, 24,700 and 102,200 IU vitamin D₃ per kg diet, the peak vitamin D₃ contents of egg yolk were 22, 41, 60 and 870 $\mu\text{g}/100$ g (wet basis), respectively [24]. In Europe, the maximum amount of supplemented vitamin D₃ specified by the Council of the European Communities (Council Directive 70/524/EEC) is set to a quantitative limit of 3,000 IU per kg feed for laying hens. This means that beyond this limit further diet-induced increases of vitamin D₃ content in eggs are not feasible. Our findings show that exposure of chickens to UVB radiation or natural sunlight seems to offer a promising alternative to fortify foods with vitamin D. Assuming that an average-sized egg comprised

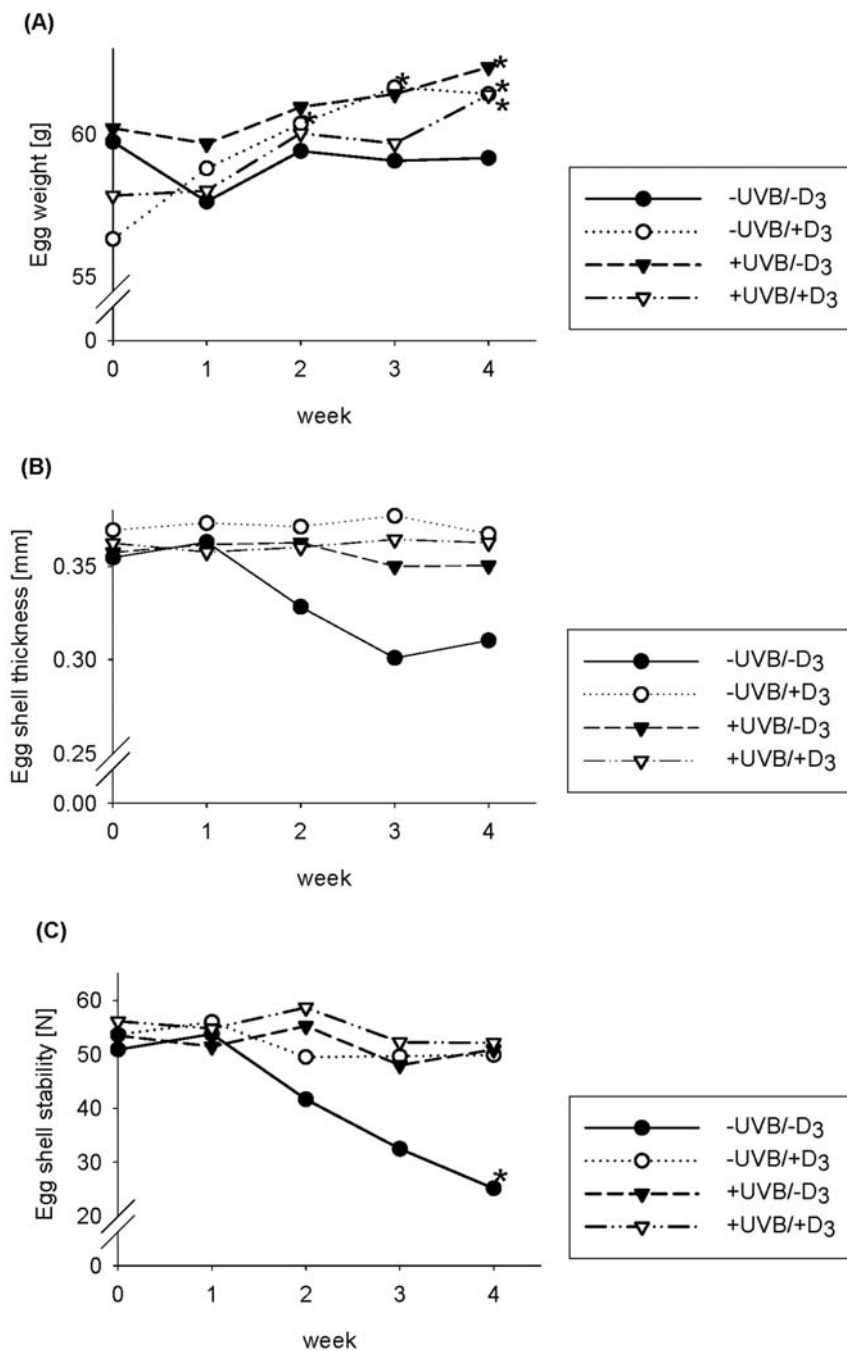


Figure 5. Egg weight and egg shell quality in response to UVB exposure and dietary vitamin D₃. Effects of UVB exposure (UVB) and dietary vitamin D₃ (D₃) on egg weight (A), egg shell thickness (B), and egg shell stability (C) over 4 weeks. Data in the panels represented means (n=9). Data were analyzed by two-way ANOVA with the classification factors UVB exposure, vitamin D₃ in the diet, and the interaction between both factors. (A) No significant difference. (B) Effect of vitamin D₃ (week 2): $p < 0.05$, UVB \times vitamin D₃ (week 2): $p < 0.05$. Effect of vitamin D₃ (week 3 and 4): $p < 0.01$, UVB \times vitamin D₃ (week 3 and 4): $p < 0.10$. (C) Effect of UVB (week 2): $p < 0.05$. Effect of UVB (week 3): $p < 0.10$, vitamin D₃ (week 3): $p < 0.10$. Effect of UVB (week 4): $p < 0.01$, vitamin D₃ (week 4): $p < 0.05$, UVB \times vitamin D₃ (week 4): $p < 0.05$. Data were additionally analyzed by paired *t*-test, *significantly different from baseline.
doi:10.1371/journal.pone.0069418.g005

of 7 g yolk dry matter, an egg from an UVB exposed hen on a vitamin D₃-adequate diet would provide on average 2.5 μ g vitamin D (vitamin D₃+25(OH)D₃) compared to eggs from non-exposed hens on the same diet which contained 0.55 μ g. Vitamin D₃ analysis reveal that meat from the +D₃/+UVB

group contained 0.7 μ g vitamin D/100 g compared to meat of the +D₃/-UVB group that contained 0.2 μ g/100 g.

In 2008, Ko et al. already established UVB radiation as a method to increase the vitamin D₂ content in sliced shiitake and white button mushrooms [27]. In that study, an UVB radiation

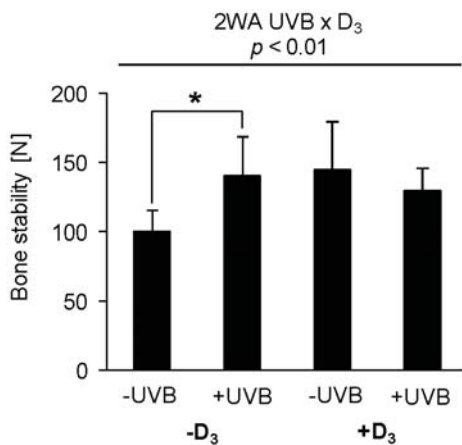


Figure 6. Bone stability in response to UVB exposure and dietary vitamin D₃. Data in represent mean \pm SD (n=9) of tibiotarsus stability of non-treated (-UVB) or UVB-treated (+UVB) hens that were fed either a vitamin D₃-deficient (-D₃) or vitamin D₃-adequate diet (+D₃), respectively. Data were analyzed by two-way ANOVA. Classification factors were UVB exposure, vitamin D₃ in the diet, and the interaction between both factors. Effect of vitamin D₃: $p < 0.10$, vitamin D₃ \times UVB: $p < 0.01$. Individual means between two groups were compared by the unpaired Student's t-test, ** $p < 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0069418.g006

dose of 75 kJ/m² increased the vitamin D₂ contents in gill of shiitake mushrooms from less than 500 μ g/100 g in the non-exposed mushrooms up to 6,000 μ g/100 g in the radiated mushrooms. Sliced button mushrooms exposed to UVB doses of 30 kJ/m² revealed a vitamin D₂ content of 3,500 μ g/100 g. Although irradiation of mushrooms seems to be highly efficient in vitamin D₂ fortification, it should be taken into consideration that the final vitamin D contents per gram food were extremely high and probably of hazardous nature. In contrast to mushrooms, the efficiency of vitamin D₃ synthesis in the skin of animals is not only influenced by UV intensity but also by skin pigmentation and the thickness of hair coat, feathers or horny scales. Currently, there are only few published data that investigated the effectiveness of solar and UV irradiation in raising the levels of vitamin D₃ in animals and animal products (see review [28]). For example, Ferguson et al. have shown that vitamin D content of eggs from chameleons increased in a dose-dependent manner in response to UVB exposure, and Kurmann & Indyk demonstrated lower vitamin D concentrations in bovine milk in winter (2.4 μ g per g milk fat) than in summer (9.2 μ g per g milk fat) [29,30]. We assume that the body part which is exposed to UVB is an essential factor for the efficacy of vitamin D fortification. Data of the current study reveal strong variations of 7-DHC concentrations in the different skin areas of hens, with remarkably high 7-DHC levels in the unfeathered skin of legs that were on average 190 times higher than that of comb skin. The important role of the chicken legs for synthesis of vitamin D₃ has been already reported by Tian and co-workers who found 30 times higher 7-DHC concentrations in skin of the legs and feet of chickens than in body skin [31]. Thus, we assume that "bio-addition" of vitamin D in eggs via UVB radiation only works if the location of the UVB lamps guarantees an irradiation of the feet skin.

An interesting finding of this study was that UVB exposure could increase vitamin D₃ and 25(OH)D₃ concentrations in egg yolk and muscle, whilst an oral administration of vitamin D₃ mainly increased 25(OH)D₃, but had minor impact on vitamin

D₃ in egg yolk and muscle. 25(OH)D₃ is primarily synthesized in liver by 25-hydroxylation of vitamin D₃ from endogenous synthesis or diet. The hepatic 25-hydroxylation is not strictly feedback regulated and therefore mainly reflects vitamin D₃ status [32]. This relationship was confirmed by the observation that the concentrations of 25(OH)D₃ in plasma, egg yolk and muscle increased significantly with dietary vitamin D₃ and also UVB exposure. Domestic fowls synthesize two vitamin D₃-binding proteins, one that binds 25(OH)D₃, and the other which mainly binds vitamin D₃ [19]. It is suggested that the selective mechanism that incorporates vitamin D₃ into yolk gives the chick embryo the opportunity to control its own 25(OH)D₃ supply [33]. UVB irradiation of farm animals seems to provide a safe approach to increase vitamin D₃ without running the risk of vitamin D₃ overdose. In the case of intense UV irradiation or if animals are exposed to excessive or prolonged exposure to sun, previtamin D₃ and vitamin D₃ photoisomerizes to biologically inactive tachysterol and lumisterol, which are desquamated with keratinocytes during normal skin turnover [6,33,34]. Health and performance data further indicate no symptoms of erythema, behavioral disorders or an impaired folate status in consequence of the applied UV treatment. The folate concentrations in plasma and liver of the hens were analyzed since UV irradiation is known to be capable of degrading folate in human blood and skin [35,36]. UVA radiation (315–400 nm) is suggested to be mainly responsible for this effect because it has a greater dermal penetration depth, and can degrade the biological form of folate, 5-methyltetrahydrofolate (5MTHF), in dermal circulation by generation of reactive oxygen species [37,38,39,40]. Other mechanisms such as the direct degradation of folate in the blood by UVA may also contribute to impact folate status [35,37]. In contrast, UVB radiation (280–315 nm) is unable to penetrate into the dermal circulation and has therefore presumably a lower potential to impact blood levels of folate [35,38,39]. Plasma and liver folate data of the current experiment confirm no adverse effect of UVB radiation on folate status, although it should be considered that the period of UVB exposure was relatively short.

This study further reveals that UVB irradiation is capable of optimizing laying performance, egg shell quality, and bone stability in hens that received no vitamin D₃ with their diet. Although hens from the +D₃/+UVB group had significantly higher plasma levels of 25(OH)D₃ and 1,25(OH)₂D₃ than hens from the +D₃/-UVB group, laying performance, egg weight, egg shell thickness, and egg shell stability could not be further improved by the additional treatment with UVB radiation. This is in accordance with previous data that did not show any additional effect of UV radiation on laying performance and egg shell quality in breeders supplemented with sufficient amount of vitamin D₃ [41].

Conclusions

In conclusion, the current study shows that UVB exposure of chickens that ensures irradiation of the whole body, including legs, is highly effective in increasing the vitamin D concentration in eggs, and also meat. We therefore consider UVB treatment of farmed animals as an effective and novel approach for "bio-addition" of foods with vitamin D. Considering the option that free-ranged chickens are still exposed to natural sun light, free-range husbandry could become a cheap alternative to the artificial UVB irradiation to produce vitamin D₃ fortified eggs.

Supporting Information

Table S1 Two-way analysis of variance table for the chicken and egg data. (DOCX)

References

- Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF (2004) Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 79: 820–825.
- Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, Dekker JM, Marz W (2010) Vitamin D deficiency and myocardial diseases. *Mol Nutr Food Res* 54: 1103–1113.
- Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Maugeri NJ, Lincoln MR, et al. (2010) A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res* 20: 1352–1360.
- Ferder M, Incerri F, Manucha W, Ferder L (2013) The world pandemic of vitamin D deficit could possibly be explained by cellular inflammatory response activity induced by the renin angiotensin system. *Am J Physiol Cell Physiol*: in press.
- Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C (2010) Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int* 78: 140–145.
- Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357: 266–281.
- Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, et al. (2007) Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta analysis. *Am J Prev Med* 32: 210–216.
- Lamprecht SA, Lipkin M (2003) Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3: 601–614.
- Holick MF (2004) Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79: 362–371.
- Tremezaygues L, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J (2009) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ protects human keratinocytes against UV-B-induced damage: In vitro analysis of cell viability/proliferation, DNA-damage and -repair. *Dermatoendocrinol* 1: 239–245.
- U.S. Department of Agriculture ARS (2011) USDA National Nutrient Database for Standard Reference. Nutrient Data Laboratory Home Page.
- Ross AC (2011) Dietary reference intakes: Calcium, vitamin D. Washington, DC: National Academies Press.
- Doets EL, de Wit LS, Dhonukshe-Rutten RA, Cavelaers AE, Raats MM, et al. (2008) Current micronutrient recommendations in Europe: towards understanding their differences and similarities. *Eur J Nutr* 47 Suppl 1: 17–40.
- Vinas BR, Barba LR, Ngo J, Gurinovic M, Novakovic R, et al. (2011) Projected prevalence of inadequate nutrient intakes in Europe. *Ann Nutr Metab* 59: 84–95.
- Institute of Medicine FaNB (2010) Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. National Academy Press Washington DC.
- Lietzow J, Kluge H, Brandsch C, Seeburg N, Hirche F, et al. (2012) Effect of short-term UVB exposure on vitamin D concentration of eggs and vitamin D status of laying hens. *J Agric Food Chem* 60: 799–804.
- Duthie SJ (1999) Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 55: 578–592.
- Stanger O (2002) Physiology of folic acid in health and disease. *Curr Drug Metab* 3: 211–223.
- Lewis P, Gous R (2009) Responses of poultry to ultraviolet radiation. *World's Poultry Science Journal* 65: 499–510.
- Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (1999) Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Legehennen und Masthühner (Broiler). DLG-Verlag Frankfurt.
- Bundesamt für Strahlenschutz (2013) Solare bodennahe UV-Strahlung in Deutschland.
- Higashi T, Shibayama Y, Fuji M, Shimada K (2008) Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of salivary 25-hydroxyvitamin D₃: a noninvasive tool for the assessment of vitamin D status. *Anal Bioanal Chem* 391: 229–238.
- Mattila PH, Piironen VI, Uusi-Rauva EJ, Koivisto PE (1995) Contents of cholecalciferol, ergocalciferol, and their 25-hydroxylated metabolites in milk products and raw meat and liver as determined by HPLC. *J Agric Food Chem* 43: 2394–2399.
- Yao L, Wang T, Persia M, Horst RL, Higgins M (2013) Effects of vitamin D₃-enriched diet on egg yolk vitamin D₃ content and yolk quality. *J Food Sci* 78: C178–183.
- Mattila P, Lehtikoinen K, Kiiskinen T, Piironen V (1999) Cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol content of chicken egg yolk as affected by the cholecalciferol content of feed. *J Agric Food Chem* 47: 4089–4092.
- Leeson S, Caston LJ (2003) Vitamin enrichment of eggs. *J Appl Poult Res* 12: 24–26.
- Ko JA, Lee BH, Lee JS, Park HJ (2008) Effect of UV-B exposure on the concentration of vitamin D₂ in sliced shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) and white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *J Agric Food Chem* 56: 3671–3674.
- Dittmer KE, Thompson KG (2011) Vitamin D metabolism and rickets in domestic animals: a review. *Vet Pathol* 48: 389–407.
- Ferguson GW, Gehrman WH, Chen TC, Holick MF (2005) Vitamin D-content of the eggs of the panther chameleon *Furcifer pardalis*: its relationship to UVB exposure/vitamin D-condition of mother, incubation and hatching success. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 15: 9–13.
- Kurmann A, Indyk H (1994) The endogenous vitamin D content of bovine milk: influence of season. *Food Chemistry* 50: 75–81.
- Tian XQ, Chen TC, Lu Z, Shao Q, Holick MF (1994) Characterization of the translocation process of vitamin D₃ from the skin into the circulation. *Endocrinology* 135: 655–661.
- Zhu J, DeLuca HF (2012) Vitamin D 25-hydroxylase - Four decades of searching, are we there yet? *Arch Biochem Biophys* 523: 30–36.
- Fraser DR, Emtage JS (1976) Vitamin D in the avian egg. Its molecular identity and mechanism of incorporation into yolk. *Biochem J* 160: 671–682.
- Holick MF (2003) Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem* 88: 296–307.
- Williams JD, Jacobson MK (2010) Photobiological implications of folate depletion and repletion in cultured human keratinocytes. *J Photochem Photobiol B* 99: 49–61.
- Lucock M (2011) Folic acid: Beyond metabolism. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 16: 102–113.
- Off MK, Steindal AE, Porojnicu AC, Juzeniene A, Vorobey A, et al. (2005) Ultraviolet photodegradation of folic acid. *J Photochem Photobiol B* 80: 47–55.
- Steindal AH, Tam TT, Lu XY, Juzeniene A, Moan J (2008) 5-Methyltetrahydrofolate is photosensitive in the presence of riboflavin. *Photochem Photobiol Sci* 7: 814–818.
- Steindal AH, Juzeniene A, Johnsson A, Moan J (2006) Photodegradation of 5-methyltetrahydrofolate: biophysical aspects. *Photochem Photobiol* 82: 1651–1655.
- Tam TT, Juzeniene A, Steindal AH, Iani V, Moan J (2009) Photodegradation of 5-methyltetrahydrofolate in the presence of uroporphyrin. *J Photochem Photobiol B* 94: 201–204.
- Carson JR, Beall G (1955) Absence of response by breeder hens to ultraviolet energy. *Poultry Science* 34: 256–262.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GIS. Performed the experiments: AS JK HK. Analyzed the data: AS JK FH AK TT. Contributed reagents/materials/analysis tools: AK TT. Wrote the paper: AS JK GIS.

Table S1 Two-way analysis of variance table for the chicken and egg data.

		Two-way ANOVA (<i>p</i> value)		
		UVB	D ₃	UVB x D ₃
Food intake	week 1	0.222	0.630	0.996
	week 2	0.525	0.439	0.361
	week 3	0.822	0.851	0.078
	final	0.256	0.345	0.067
Body weight	basal	0.078	0.219	0.117
	week 1	0.079	0.118	0.145
	week 2	0.072	0.121	0.162
	week 3	0.074	0.421	0.048
	final	0.051	0.518	0.063
Plasma 25(OH)D₃	basal	0.682	0.134	0.642
	final	0.000	0.000	0.000
Plasma 1,25(OH)₂D₃	basal	0.513	0.120	0.912
	final	0.009	0.000	0.390
Plasma calcium	basal	0.714	0.481	0.175
	final	0.482	0.089	0.607
Plasma inorganic phosphate	basal	0.993	0.339	0.608
	final	0.592	0.111	0.810
Vitamin D₃ in egg yolk	basal	0.937	0.622	0.212
	final	0.000	0.000	0.036
25(OH)D₃ in egg yolk	basal	0.760	0.906	0.181
	final	0.000	0.000	0.000
Vitamin D₃ in muscle	final	#	#	#
25(OH)D₃ in muscle	final	#	#	#
Egg weight	basal	0.672	0.225	0.825
	week 1	0.686	0.873	0.361
	week 2	0.728	0.991	0.587
	week 3	0.918	0.807	0.220
	final	0.395	0.730	0.385
Egg shell thickness	basal	0.792	0.220	0.541
	week 1	0.228	0.660	0.306
	week 2	0.216	0.035	0.019
	week 3	0.226	0.008	0.064
	final	0.121	0.004	0.053
Egg shell stability	basal	0.498	0.468	0.993
	week 1	0.608	0.424	0.872
	week 2	0.018	0.224	0.872
	week 3	0.070	0.091	0.171
	final	0.005	0.018	0.046
Bone stability	final	0.146	0.062	0.003
Plasma folate	basal	0.232	0.402	0.371
	final	0.800	0.114	0.366
Liver folate	final	0.997	0.663	0.441

[#]Two-way ANOVA analysis not possible because of non-detectable vitamin D₃ and 25(OH)D₃ in muscles of the –UVB/–D₃ and –UVB/+D₃ group, respectively. Detection limit was 0.17 µg/100 g for vitamin D₃, and 0.1 µg/100 g for 25(OH)D₃.

3.2 Studie 2

KÜHN J, Schutkowski A, Hirche F, Baur AC, Mielenz N, Stangl GI: Non-linear increase of vitamin D content in eggs from chicks treated with increasing exposure times of ultraviolet light. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015; 148: 7 - 13



Review

Non-linear increase of vitamin D content in eggs from chicks treated with increasing exposure times of ultraviolet light



Julia Kühn*, Alexandra Schutkowski, Frank Hirche, Anja C. Baur, Norbert Mielenz, Gabriele I. Stangl

Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Von-Danckelmann-Platz 2, Halle (Saale) 06120, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2014
Received in revised form 25 September 2014
Accepted 22 October 2014
Available online 27 October 2014

Keywords:

Vitamin D
Laying hen
UVB
Egg
Bio-addition

ABSTRACT

Vitamin D fortified food can help to reduce the prevalence for vitamin D deficiency. Previous data provided evidence that eggs from hens exposed to ultraviolet (UV) light contain large quantities of vitamin D. In the current study, we assessed the efficacy of vitamin D enrichment in eggs upon increasing daily UVB exposure times. We further addressed the question whether extended UVB irradiation affects the skin content of 7-dehydrocholesterol.

To this end, 35 hens were assigned to 7 groups of 5 animals each and were exposed to UVB light ($76 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) for 0, 15, 30, 60, 120, 180 and 300 min per day, respectively. Eggs from the treatment groups were collected at baseline and after 2, 3 and 4 weeks of treatment, respectively. Skin samples were gained at the end of 4 weeks. Vitamin D metabolites were quantified by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

The contents of vitamin D₃ and 25(OH)D₃ in egg yolk raised non-linear in response to increasing daily UVB exposure times. The vitamin D₃ content did not reach a clear-cut plateau within the chosen UVB treatment times. A daily UVB exposure time of 300 min resulted in vitamin D₃ contents of 28.6 $\mu\text{g}/100 \text{g}$ egg yolk dry matter. In contrast to vitamin D₃, the 25(OH)D₃ content in the egg yolk achieved a maximum upon an UVB irradiation time of 60 min/d. The cutaneous 7-dehydrocholesterol contents were not altered in response to the chosen UVB irradiation times.

In conclusion, the data show a distinct non-linear dose–response relationship of UVB exposure times on the total vitamin D content in eggs.

This article is part of a special issue entitled '17th Vitamin D Workshop'.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	8
2. Materials and methods	8
2.1. Animals and treatment	8
2.2. Sample collection	8
2.3. Analysis of vitamin D metabolites in plasma	8
2.4. Analysis of vitamin D metabolites and photoisomers in egg yolk and skin tissue	8
2.5. Analysis of cholesterol content in egg yolk	9
2.6. Analysis of egg shell thickness and egg shell stability	9
2.7. Statistical analysis	9

* Corresponding author. Tel.: +49 345 5522717.

E-mail addresses: julia.kuehn@landw.uni-halle.de (J. Kühn),
alexandra.schutkowski@landw.uni-halle.de (A. Schutkowski),
frank.hirche@landw.uni-halle.de (F. Hirche),
anja-christina.baur@student.uni-halle.de (A.C. Baur),
norbert.mielenz@landw.uni-halle.de (N. Mielenz),
gabriele.stangl@landw.uni-halle.de (G.I. Stangl).

3.	Results	9
3.1.	Food intake, body weight and laying performance	9
3.2.	Vitamin D metabolites in plasma	9
3.3.	Vitamin D metabolites in egg yolk	10
3.4.	Vitamin D metabolites and photoproducts in skin tissue	11
3.5.	Egg weight, egg shell thickness and egg shell stability	11
4.	Discussion	12
5.	Conclusion	13
	Author contributions	13
	References	13

1. Introduction

The global prevalence of vitamin D insufficiency is very high due to inadequate sun exposure and poor dietary intake [1,2]. Fatty fish and mushrooms are valuable sources of vitamin D but they are consumed in only small amounts [3,4]. To enrich foods with added vitamin D is one option to improve vitamin D status. A novel approach to fortify food with vitamin D is “bio-addition” in which food staples are produced or processed in a way to obtain added value. An example of bio-addition is the exposure of mushrooms to ultraviolet (UV) light to increase vitamin D₂ [5,6]. Results from our recent studies demonstrate quite clearly the improvement of vitamin D₃ content in eggs upon artificial UVB and sunlight exposure of chicks [7,8]. Chicks seem to be capable of endogenous vitamin D₃ synthesis in skin after UV exposure, especially in their unfeathered legs which, in comparison to other skin parts, contain extremely high amounts of 7-dehydrocholesterol (7-DHC) [7,9]. Recent findings show that eggs from chicks that were exposed to UVB light for three hours per day contained 4- to 5-fold higher vitamin D contents than eggs from non-exposed, but dietary adequate supplied chicks [7]. The vitamin D₃ which is formed in exposed skin and transferred to the circulation, seems to be subsequently incorporated into the egg yolk as non-hydroxylated vitamin D₃ [7]. Currently, we lack information about the efficacy of vitamin D enrichment in eggs upon different UVB exposure times, and it has not yet been clarified whether vitamin D content in eggs will reach a plateau within a maximum of 300 min UVB irradiation per day. Since UVB induced vitamin D₃ synthesis is associated with a marked suppression of available 7-DHC and an increased formation of photoisomers [10], we analysed the contents of 7-DHC, tachysterol₃ and lumisterol₃ in skin.

2. Materials and methods

2.1. Animals and treatment

The experimental procedure was performed according to the established guidelines for care and handling of laboratory animals and was approved by the council of Saxony-Anhalt, Germany (No. 42502-3-688MLU).

The study was conducted with 35 laying hens (Lohmann brown) with an initial age of 26 weeks. After a run-in period of 2 weeks, hens were randomly assigned into 7 groups of 5 animals each. The hens were housed individually and were daily UVB exposed for 0, 15, 30, 60, 120, 180 and 300 min, respectively, for 4 weeks. Longer UVB exposure times were given to the animals in intervals with a maximum time of 60 min. The UVB lamps (Hobby UV Kompakt Desert 8% UVB, Dohse Aquaristik KG, Gelsdorf, Germany) were placed in lower front part of the cages to ensure an irradiation of the legs. Emitted UV light ranged in wavelengths from 280 to 310 nm. The UV intensity was 76 μW/cm² at a distance of 20 cm (as specified by the manufacturer). The lamps were shielded between the single cages to avoid an unintended irradiation of other hens. The room was tempered at 18 °C with a 14 h light cycle. Feed and water from nipple

drinkers were available ad libitum during the whole experiment. All hens received a standard diet (Deuka, Könnern, Germany) that met the nutrient recommendations for laying hens [11], and contained 2500 IU vitamin D₃/kg. Food intake and body weight was recorded weekly.

2.2. Sample collection

Blood samples from each animal were drawn at the beginning and at the end of the study. Blood was collected in heparin tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and centrifuged at 2000 × g for 10 min at 4 °C to obtain plasma. Eggs were weighed daily. The egg shell thickness was assessed once a week and egg shell stability was determined at baseline and after 4 weeks of the experiment. Contents of vitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃), and 7-DHC were determined in freeze-dried egg yolks at the beginning of the study and after 2, 3 and 4 weeks of the experiment. After 4 weeks of intervention, hens were killed by decapitation and skin samples from the feathered and unfeathered parts of the legs were removed for quantification of vitamin D metabolites and the photoisomers tachysterol₃ and lumisterol₃. All samples were stored at –80 °C until further analyses.

2.3. Analysis of vitamin D metabolites in plasma

The concentrations of 25(OH)D₃ and unesterified 7-DHC in plasma were determined by coupled liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS/MS) as described elsewhere [7,12]. In brief, samples were mixed with internal standard (deuterated 25(OH)D₃, Chemaphor Incorporation, Ottawa, Canada; ergosterol, Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany), extracted with *n*-hexane and washed with ultrapure water. Samples were further derivatized with 4-phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dione (PTAD), solved in the mobile phase, transferred into a HPLC vial and analysed by HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a Hypersil ODS-column 100 × 2 mm², 5 μm (Agilent Technologies), coupled to a MS system (API 2000, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

The plasma concentration of 1,25(OH)₂D₃ was determined by means of a commercial enzyme-linked immunoassay (Immunodiagnostic Systems GmbH, Frankfurt am Main, Germany) according to manufacturer's protocol.

2.4. Analysis of vitamin D metabolites and photoisomers in egg yolk and skin tissue

Egg yolk and skin samples were analysed for their contents of vitamin D₃, 25(OH)D₃ and 7-DHC as described elsewhere [7,13]. Leg skin was additionally analysed for the concentrations of tachysterol₃ and lumisterol₃ by LC–MS/MS. Sample preparation was the same as described for the vitamin D metabolites. Deuterated vitamin D₃ (Sigma–Aldrich Chemie GmbH) was used as internal standard for the quantification of tachysterol₃. An internal reference for the quantification of lumisterol₃ was generated by

exposing a solution of deuterated 7-DHC (Sigma–Aldrich Chemie GmbH) to UV light to obtain deuterated lumisterol. Prepared samples were injected to HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies) equipped with a Hypersil ODS–column $150 \times 2 \text{ mm}^2$, $5 \mu\text{m}$ (VDS Optilab, Berlin, Germany), coupled to a MS system (API 2000, Applied Biosystems). Data were recorded in the multiple reactions monitoring (MRM) mode using following transitions: tachysterol₃ 591 > 383, lumisterol₃ 591 > 365.

2.5. Analysis of cholesterol content in egg yolk

Cholesterol was analysed using a commercial colorimetric enzymatic test (Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Germany) according to manufacturer's protocol. Before conducting the test kit, freeze-dried egg yolk samples were extracted with *n*-hexane/isopropyl alcohol (3/2, v/v) [14]. Aliquots of the extracts were evaporated and subsequently resolved in chloroform/Triton X-100 (1/1, w/w).

2.6. Analysis of egg shell thickness and egg shell stability

Egg shell thickness was measured once a week using a micrometer screw with an accuracy of $10 \mu\text{m}$. Shell fragments were collected from the equatorial area of each egg and the inner amniotic membrane was removed. Egg shell stability was determined by an electronically controlled breaking strength tester (Messtechnik Gutsch, Nauendorf, Germany).

2.7. Statistical analysis

If not otherwise specified, data are presented as means \pm standard error mean. Statistical analyses were performed by use of SAS 9.4 (SAS Inst. Inc. Cary, USA). Data that were gathered twice and more per animal, were analysed by two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA). The model included sampling week (week), UVB exposure time (UVB) and the interaction between week and UVB exposure time (week \times UVB). In the ANOVA, the repeated observations per animal were modeled by correlated residuals effects. Different variance–covariance structures were tested and the best was selected on the basis of corrected Akaike Information Criteria (AICC). For estimation of the model parameters, procedure MIXED was used. The *F*-test and multiple comparison tests (least square means (LSM), Tukey adjustment) were applied to identify differences between weeks, groups and interaction terms. For parameters with significant interaction terms, differences between weeks within the groups were analysed (LSM, multiple *t*-test corrected by Bonferroni). In all comparisons, Kenward–Rogers adjustment for degree of freedom

was used. The studentized residuals of the linear models were tested for normality (procedure UNIVARIATE).

Data that were gathered without repeated observations per animal were analysed by one-way ANOVA. For selection between models with and without homogeneous residual variances AICC-values were used. We estimated upper asymptotic bounds for vitamin D₃ and 25(OH)D₃ of egg yolk in response to increasing UVB exposure time by using exponential regression models. In the regression model, the repeated measures were considered by including random animal effects. The regression coefficients of week 2, 3 and 4 were estimated simultaneously by using procedure NLMIXED. Data were considered significantly different at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Food intake, body weight and laying performance

None of the treated chicks showed signs of impaired health or developed an erythema upon UVB irradiation. Data show that the food intake ($P < 0.01$) and body weight ($P < 0.001$) increased with the sampling week, whereas the laying performance (number of eggs per hen and week) remained unchanged over the experimental period. The UVB treatment displayed no impact on food intake (0 min/d: $862 \pm 53.9 \text{ g}$, 15 min/d: $891 \pm 41.5 \text{ g}$, 30 min/d: $798 \pm 77.4 \text{ g}$, 60 min/d: $899 \pm 20.4 \text{ g}$, 120 min/d: $891 \pm 47.9 \text{ g}$, 180 min/d: $886 \pm 23.3 \text{ g}$, 300 min/d: $881 \pm 32.2 \text{ g}$), body weight (0 min/d: $1.73 \pm 0.08 \text{ kg}$, 15 min/d: $1.75 \pm 0.07 \text{ kg}$, 30 min/d: $1.65 \pm 0.11 \text{ kg}$, 60 min/d: $1.72 \pm 0.06 \text{ kg}$, 120 min/d: $1.78 \pm 0.13 \text{ kg}$, 180 min/d: $1.69 \pm 0.08 \text{ kg}$, 300 min/d: $1.71 \pm 0.05 \text{ kg}$) and laying performance (0 min/d: $6.75 \pm 0.14 \text{ eggs}$, 15 min/d: $6.55 \pm 0.34 \text{ eggs}$, 30 min/d: $6.15 \pm 0.68 \text{ eggs}$, 60 min/d: $6.95 \pm 0.05 \text{ eggs}$, 120 min/d: $6.70 \pm 0.20 \text{ eggs}$, 180 min/d: $6.85 \pm 0.10 \text{ eggs}$, 300 min/d: $6.90 \pm 0.10 \text{ eggs}$).

3.2. Vitamin D metabolites in plasma

The vitamin D status of the laying hens was assessed by analysing the concentrations of 25(OH)D₃ and 1,25(OH)₂D₃ in plasma at baseline and after 4 weeks of treatment. Data show that the plasma levels of 25(OH)D₃ increased from baseline to week 4 of the experiment, whereas plasma 25(OH)D₃ concentrations tended to rise ($P < 0.10$) upon UVB treatment (Table 1).

The concentration of plasma 1,25(OH)₂D₃ was not altered from baseline to week 4 (Table 1). The plasma concentration of 1,25(OH)₂D₃ did not increase in response to UVB treatment (Table 1). To elucidate potential impact of UVB irradiation on the vitamin D precursor molecule, the plasma concentration of 7-DHC was

Table 1
Plasma vitamin D metabolite concentrations in response to increasing UVB exposure times.

	UVB exposure time							P-values (two-way ANOVA)		
	0 min/d	15 min/d	30 min/d	60 min/d	120 min/d	180 min/d	300 min/d	Week	UVB	Week \times UVB
25(OH)D ₃ [nmol/l]										
Baseline	41.0 \pm 7.59	40.8 \pm 4.66	52.5 \pm 4.57	38.1 \pm 8.70	39.5 \pm 5.24	41.4 \pm 9.76	37.7 \pm 6.45	<0.001	Ns	Ns
Week 4	52.3 \pm 1.66	71.3 \pm 4.30	81.1 \pm 6.36	75.3 \pm 4.69	77.2 \pm 9.47	76.6 \pm 7.47	79.2 \pm 5.76			
1,25(OH) ₂ D ₃ [nmol/l]										
Baseline	1.07 \pm 0.28	1.40 \pm 0.40	1.38 \pm 0.15	1.47 \pm 0.07	1.32 \pm 0.31	0.94 \pm 0.17	1.00 \pm 0.17	Ns	Ns	Ns
Week 4	1.18 \pm 0.18	1.67 \pm 0.36	1.10 \pm 0.37	1.81 \pm 0.14	1.64 \pm 0.47	1.08 \pm 0.35	1.50 \pm 0.37			
7-DHC [nmol/l]										
Baseline	343 \pm 73.3	286 \pm 53.7	348 \pm 60.9	371 \pm 72.4	256 \pm 60.3	303 \pm 61.5	315 \pm 27.8	<0.01	Ns	Ns
Week 4	561 \pm 110	447 \pm 57.6	437 \pm 98.1	425 \pm 144	359 \pm 110	469 \pm 119	383 \pm 67.1			

Data are presented as means \pm standard error mean. Not significant (ns).

Table 2
Vitamin D₃ and 25(OH)D₃ egg yolk content for each week of sampling in response to increasing UVB exposure times.

UVB exposure time	Vitamin D ₃ [$\mu\text{g}/100\text{g DM}$] ¹				25(OH)D ₃ [$\mu\text{g}/100\text{g DM}$] ²			
	Baseline	Week 2	Week 3	Week 4	Baseline	Week 2	Week 3	Week 4
0 min/d	2.44 ^b	2.92 ^{ab}	3.46 ^a	3.43 ^{ab}	2.10	2.14	3.02	2.52
15 min/d	1.95	5.55	7.09	6.79	1.89 ^b	2.74 ^{ab}	3.64 ^a	3.38 ^{ab}
30 min/d	2.91 ^c	8.60 ^b	12.4 ^a	11.8 ^a	2.38 ^b	3.40 ^a	4.25 ^a	3.69 ^{ab}
60 min/d	2.18 ^c	11.1 ^b	15.8 ^a	15.3 ^a	1.76 ^b	3.28 ^a	4.14 ^a	3.96 ^a
120 min/d	2.34 ^c	15.7 ^b	17.9 ^b	20.0 ^a	2.13 ^b	4.02 ^a	4.04 ^a	3.99 ^a
180 min/d	3.14 ^c	24.4 ^b	27.3 ^a	25.9 ^{ab}	1.98 ^b	3.69 ^a	3.84 ^a	3.86 ^a
300 min/d	2.40 ^c	23.2 ^b	29.0 ^a	28.6 ^a	1.75 ^b	3.80 ^a	4.07 ^a	4.35 ^a
Se (0 min/d)	0.79	0.54	0.92	0.52	0.40	0.29	0.41	0.28
Se (>0 min/d)	0.58	1.75	2.19	2.43	0.40	0.29	0.41	0.28

Data are presented as least square means (LSM) and standard error of LSM (se). Different superscript letters indicate significant differences within a row (multiple *t*-test, Bonferroni correction, $P < 0.05$). Dry matter (DM).

¹ *P*-values (two-way ANOVA): week: <0.001 ; UVB: <0.001 ; week \times UVB: <0.001 .

² *P*-values (two-way ANOVA): week: <0.001 ; UVB: <0.05 ; week \times UVB: <0.05 .

analysed. The 7-DHC concentration was affected by the sampling week but not upon UVB exposure (Table 1).

3.3. Vitamin D metabolites in egg yolk

The contents of vitamin D₃, 25(OH)D₃ and 7-DHC were analysed in egg yolk at baseline and after 2, 3 and 4 weeks of the experiment. Vitamin D₃ content in egg yolk was significantly affected by the sampling week and the UVB treatment (Table 2). Compared to non-exposed hens, an UVB exposure of at least 15 min/d was sufficient to achieve a 2-fold higher vitamin D₃ content. Longer UVB exposure times lead to a further increase of vitamin D₃ content. Fig. 1 demonstrates curves which represent the vitamin D₃ content in eggs that were collected after 2, 3 and 4 weeks from UVB-exposed and non-exposed hens. The curves exponentially converge to an asymptotic upper bound with increasing UVB exposure time. At irradiation times of 180 min/d the relative increase of vitamin D₃ became smaller, without reaching a clear-cut plateau at 300 min/d. After 4 weeks of UVB treatment, 95% of the putative maximum vitamin D content was achieved when hens were exposed to UVB light for about 300 min/d. Our data indicate a significant interaction between sampling week and UVB exposure time for the vitamin D₃ content in egg yolk (Table 2). Multiple *t*-test analysis show that eggs from the UVB treatment groups which were collected after two weeks of treatment had predominantly

lower vitamin D₃ contents than those collected after 3 and 4 weeks (Table 2). No differences in vitamin D₃ content were observed between eggs collected after 3 and 4 weeks, respectively.

Table 2 and Fig. 2 show that the 25(OH)D₃ content of egg yolk was less influenced by UVB treatment than the vitamin D₃ content in egg yolk. Nevertheless, the egg yolk content of 25(OH)D₃ was affected by the sampling week and the UVB treatment (Table 2). Data from the exponential regression model show a distinct plateau beginning at an UVB exposure time of 30 min/d (Fig. 2). After 4 weeks of treatment, 95% of the maximum response was reached when hens were exposed to UVB for 47 min/d. The alteration in 25(OH)D₃ content was characterized by a significant interaction between sampling week and UVB exposure time (Table 2). Multiple *t*-test showed that, in contrast to vitamin D₃, the maximum 25(OH)D₃ contents in egg yolk were reached after 2 weeks of treatment (Table 2).

The content of 7-DHC in egg yolk showed pronounced inter-individual variability and was significantly affected by sampling week ($P < 0.001$) but not by the UVB exposure time (0 min/d: $925 \pm 254 \mu\text{g}/\text{g DM}$, 15 min/d: $1159 \pm 317 \mu\text{g}/\text{g DM}$, 30 min/d: $818 \pm 203 \mu\text{g}/\text{g DM}$, 60 min/d: $995 \pm 238 \mu\text{g}/\text{g DM}$, 120 min/d: $769 \pm 159 \mu\text{g}/\text{g DM}$, 180 min/d: $1288 \pm 393 \mu\text{g}/\text{g DM}$, 300 min/d: $1119 \pm 211 \mu\text{g}/\text{g DM}$).

Cholesterol content in egg yolk was determined at baseline and after week 4 of the experimental period. Data show a decrease of

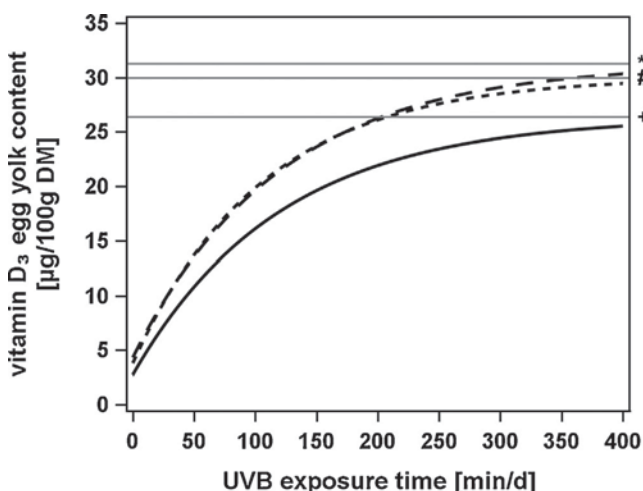


Fig. 1. Vitamin D₃ egg yolk content in response to UVB exposure time. Data from week 2 (solid line), week 3 (dashed line) and week 4 (short dashed line) are presented as least square means (LSM). Data and upper asymptotic bounds for each week were estimated by use of an exponential regression model. +26.4 $\mu\text{g}/100\text{g}$ dry matter (DM); *31.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ DM; # 30.0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ DM.

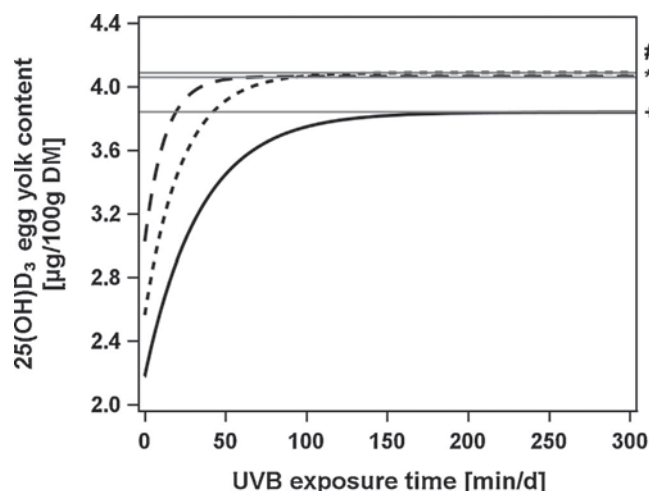


Fig. 2. 25(OH)D₃ egg yolk content in response to UVB exposure time. Data from week 2 (solid line), week 3 (dashed line) and week 4 (short dashed line) are presented as least square means (LSM). Data and upper asymptotic bounds for each week were estimated by use of an exponential regression model. +3.84 $\mu\text{g}/100\text{g}$ dry matter (DM); *4.06 $\mu\text{g}/100\text{g}$ DM; # 4.09 $\mu\text{g}/100\text{g}$ DM.

Table 3
Vitamin D metabolites and photoisomers in feathered and unfeathered leg skin.

	UVB exposure time			P-values (One-way ANOVA)
	0 min/d	180 min/d	300 min/d	
Feathered leg skin				
Vitamin D ₃ [ng/g]	14.3 ± 4.28	18.3 ± 4.28	18.1 ± 4.28	Ns
25(OH)D ₃ [ng/g] ¹	5.79 ± 2.12	6.67 ± 1.64	5.21 ± 0.19	Ns
7-DHC [μg/g]	0.31 ± 0.07	0.30 ± 0.07	0.33 ± 0.07	Ns
Tachysterol ₃	Not detectable			
Lumisterol ₃	Not detectable			
Unfeathered leg skin				
Vitamin D ₃ [μg/g]	0.21 ± 0.05 ^b	14.5 ± 2.03 ^a	17.4 ± 2.30 ^a	<0.001
25(OH)D ₃ [ng/g]	1.84 ± 0.30 ^b	4.57 ± 0.30 ^a	4.84 ± 0.30 ^a	<0.001
7-DHC [mg/g]	0.93 ± 0.08	0.79 ± 0.08	0.71 ± 0.08	Ns
Tachysterol ₃ [ng/g] ¹	0.98 ± 0.31 ^b	368 ± 151 ^a	1844 ± 1146 ^a	<0.001
Lumisterol ₃ [μg/g]	7.12 ± 2.33 ^b	197 ± 63.4 ^a	209 ± 57.7 ^a	<0.05

Data are presented as least square means (LSM) ± standard error of LSM. Different superscript letters indicate significant differences within a row (Tukey test, $P < 0.05$). Not significant (ns).

¹ Data were log transformed (base = 10) for statistical analyses.

the cholesterol content from baseline to week 4 of the experiment ($P < 0.01$). The UVB treatment did not reveal an impact on the cholesterol content of the eggs (0 min/d: 26.3 ± 1.09 mg/g DM, 15 min/d: 25.0 ± 1.93 mg/g DM, 30 min/d: 26.0 ± 0.37 mg/g DM, 60 min/d: 27.0 ± 1.00 mg/g DM, 120 min/d: 27.6 ± 0.92 mg/g DM, 180 min/d: 25.8 ± 0.95 mg/g DM, 300 min/d: 24.5 ± 1.80 mg/g DM).

3.4. Vitamin D metabolites and photoproducts in skin tissue

Vitamin D metabolites and photoproducts were analysed in skin samples of the feathered and unfeathered legs after 4 weeks of UVB treatment for 0, 180 and 300 min/d, respectively. The cutaneous vitamin D₃ contents of the feathered leg were very low and could not be improved by UVB treatment (Table 3). In contrast to that, there was a strong impact of UVB treatment on the vitamin D₃ content of the unfeathered leg skin (Table 3). UVB treated groups had considerably higher vitamin D₃ contents than the non-exposed group.

UVB treatment did not alter 25(OH)D₃ in the skin of the feathered legs (Table 3). In the unfeathered legs, the cutaneous 25(OH)D₃ content was higher in the UVB treated groups than in the

non-exposed group (Table 3). In contrast to vitamin D₃, the cutaneous 25(OH)D₃ content was higher in the feathered than in the unfeathered legs of the non-exposed group.

As observed for vitamin D₃, the cutaneous 7-DHC content of the feathered legs was low and not altered by UVB treatment (Table 3). The unfeathered leg skin contained considerably more 7-DHC than the feathered part of the leg. The 7-DHC content was 3000-fold higher than that of the feathered leg, but remained unaffected by UVB treatment as well (Table 3).

Tachysterol₃ and lumisterol₃ were not detectable in the feathered skin area (detection limit tachysterol₃: 50 ng/g and lumisterol₃: 2 μg/g) in all groups of chicks. In skin of the unfeathered legs, tachysterol₃ as well as lumisterol₃ was higher in UVB exposed groups compared to non-exposed groups (Table 3).

3.5. Egg weight, egg shell thickness and egg shell stability

Egg weight and egg shell thickness increased with the sampling week, whereas egg shell stability remained constant within the experimental period (Table 4). Neither egg weight, nor egg shell thickness and stability were influenced by UVB irradiation (Table 4).

Table 4
Egg weight and egg shell quality in response to increasing UVB exposure times.

	UVB exposure time							P-values (two-way ANOVA)		
	0 min/d	15 min/d	30 min/d	60 min/d	120 min/d	180 min/d	300 min/d	Week	UVB	Week × UVB
Egg weight [g]										
Week 1	61.4 ± 3.55	60.5 ± 1.44	61.1 ± 1.04	57.0 ± 0.80	60.0 ± 0.87	56.8 ± 2.93	57.3 ± 1.65	<0.001	Ns	Ns
Week 2	62.4 ± 3.57	62.3 ± 0.93	61.8 ± 1.38	58.1 ± 0.71	62.0 ± 1.78	59.5 ± 3.05	58.9 ± 1.60			
Week 3	62.7 ± 2.85	64.8 ± 1.59	63.3 ± 1.71	59.5 ± 0.81	60.5 ± 1.15	60.4 ± 3.30	60.3 ± 1.35			
Week 4	64.8 ± 2.73	64.5 ± 2.04	64.8 ± 2.63	59.2 ± 1.24	61.5 ± 1.25	62.0 ± 2.64	60.6 ± 1.41			
Egg shell thickness [μm]										
Baseline	330 ± 8.68	358 ± 8.12	347 ± 9.70	344 ± 10.9	360 ± 10.9	341 ± 14.9	332 ± 27.5	<0.01	Ns	Ns
Week 1	333 ± 8.60	352 ± 11.0	345 ± 7.67	355 ± 11.6	374 ± 7.00	351 ± 15.9	358 ± 6.98			
Week 2	339 ± 9.15	376 ± 8.52	334 ± 15.4	365 ± 7.02	368 ± 5.85	368 ± 12.9	369 ± 5.23			
Week 3	345 ± 18.7	359 ± 9.00	340 ± 14.7	369 ± 6.76	356 ± 11.7	369 ± 5.66	356 ± 12.2			
Week 4	337 ± 11.2	366 ± 5.84	348 ± 10.8	361 ± 4.90	352 ± 7.18	377 ± 8.00	362 ± 12.2			
Egg shell stability [N]										
Baseline	44.4 ± 5.33	58.0 ± 3.42	49.3 ± 2.54	51.8 ± 4.09	53.6 ± 2.77	49.8 ± 6.01	51.2 ± 9.73	Ns	Ns	Ns
Week 4	40.2 ± 3.89	55.2 ± 2.35	47.0 ± 3.85	57.6 ± 3.26	45.6 ± 4.20	59.0 ± 7.46	58.8 ± 4.41			

Data are presented as means ± standard error mean; not significant (ns).

4. Discussion

The current study demonstrates a non-linear increase of the vitamin D content in eggs in response to increasing UVB exposure times. Data from the exponential regression model also show that the relative efficacy of vitamin D fortification in the egg became smaller the longer the UVB irradiation times. Hence, the vitamin D₃ content of eggs from hens exposed to UVB light for 300 min per day was marginally higher than that of eggs produced by hens UVB exposed for 180 min. Despite the advertising efficiency of vitamin D fortification upon long exposure times, a clear-cut plateau at which no further change of vitamin D occurs was not seen even at UVB exposure times of 300 min per day. We believe, however, that exposure times longer than 300 min are not useful for two reasons: Firstly, the disadvantages caused by long operating times of UV-emitting lamps, such as higher costs for energy or reduced life span of the lamps, would exceed the additional benefits of vitamin D enrichment upon very long UVB irradiation times. Our findings show that UVB exposure times of 300 min per day resulted in 95% of the maximum attainable vitamin D contents of eggs. Thus, exposure times beyond the 300 min per day would not contribute significantly to improve the vitamin D content of eggs. Secondly, we cannot rule out detrimental health impacts of excessive UVB irradiation, such as erythema.

Regression data show that the maximum of vitamin D₃ in eggs in response to the respective UVB exposure time was only achieved after 3 weeks of daily UVB treatment. Eggs collected after two weeks had on average 20% less vitamin D₃ compared to those collected after 3 and 4 weeks. These findings confirm previous data from studies with chicks that received a vitamin D enriched diet [15,16]. Thus, plateauing of vitamin D₃ content in egg yolk in response to endogenous vitamin D₃ synthesis or dietary vitamin D₃ supplementation seems to attain only after more than two weeks of treatment.

In contrast to vitamin D₃ whose content in eggs could be increased 8-fold by an UVB exposure time of 300 min per day, the egg content of 25(OH)D₃ was less strongly modifiable. The maximum 25(OH)D₃ content in the egg yolk was also achieved after 60 min of UVB irradiation. Considering the 25(OH)D₃ in plasma there was even a maximum after 15 min of daily UVB treatment. This is remarkable because in humans most of the synthesized or absorbed vitamin D₃ is hydroxylated predominantly in liver to 25(OH)D₃ and then released into the plasma. Based on its half-life period in plasma, 25(OH)D₃ is considered as a valid biomarker for an assessment of vitamin D status [17]. Vitamin D₃ and 25(OH)D₃ are usually bound in plasma to a vitamin D binding protein which functions as a carrier. Laying hens are capable of producing two different types of vitamin D binding proteins, one for carrying vitamin D₃ and another for the transport of 25(OH)D₃ [18]. The substantial increase of vitamin D₃ and the comparably moderate increase of 25(OH)D₃ in the egg by UVB treatment, assume that the synthesized vitamin D₃ in skin is mainly bound in the non-hydroxylated form to the vitamin D binding protein and transferred into the egg. This in turn would reduce the available amount of vitamin D₃ for hydroxylation to 25(OH)D₃ in chicks, and could explain the slight increase of 25(OH)D₃ plasma levels upon UVB irradiation. It is suggested that the preferred transport of non-hydroxylated vitamin D₃ into the egg allows the embryo to control its own 25(OH)D₃ status [19]. Besides the importance of vitamin D for the development of chicks, the 25(OH)D₃ in the egg yolk can contribute considerably to the vitamin D supply of humans, as it is proposed to possess a five time higher activity than vitamin D₃ [20]. The following example may illustrate the significance of this issue. One egg from chicks that were exposed to UVB light for 300 min per day provides on average 2.21 µg vitamin D₃ and 0.33 µg 25(OH)D₃ which in sum corresponds to 17%

of the recommended daily intake [21]. Considering the 5-fold higher biological activity of 25(OH)D₃ compared to vitamin D₃, we obtain contents of 3.88 µg vitamin D equivalents per egg. This amount would meet 25% of recommended daily intake [21].

Vitamin D₃ is formed in skin by UVB-induced conversion of 7-DHC to previtamin D₃ and a subsequent temperature-dependent isomerization step. Ongoing UVB irradiation usually leads to the formation of inactive vitamin D metabolites such as toxisterols, suprasterols, tachysterol and lumisterol [10,22]. The latter were detected in unfeathered leg skin of chicks exposed for 180 and 300 min to UVB light. The increased synthesis of inactive vitamin D metabolites in skin upon UVB irradiation could, at least in part, explain the observed decline in the effectiveness of vitamin D enrichment in eggs. However, the increased transformation of vitamin D to non-active photoisomers by excessive UVB irradiation prevents an uncontrolled storage of vitamin D in the egg and warrants the safety of bio-added eggs for the consumers. We feel that a single food product should not contain the complete amount of daily recommended vitamin D as people with a high vitamin D intake would run the risk of hypervitaminosis. Recent findings from a free-range farming experiment of our research group showed that eggs from hens that were reared out of the barn for 9 h per day during the summer months had increased vitamin D contents of 1.0 µg per egg [8]. In contrast to UVB exposure of mushrooms, which resulted in extremely high vitamin D contents of up to 105 µg/g [23], the vitamin D fortification of eggs by means of UVB treatment is a safe procedure.

Vitamin D data from skin demonstrate that vitamin D₃ was not synthesized in the upper leg skin, which is covered by feathers, as these feathers might block most of the UV rays. In comparison to the unfeathered parts of the legs, the feathered skin contained also very low amounts of 7-DHC. Takada observed an increase of 7-DHC in rat skin when animals were exposed to UV light and proposed an inhibition of 7-DHC reductase through vitamin D₃ [24]. However, in our study we could not observe any differences in the 7-DHC content of the unfeathered leg skin in response to the UVB treatment. Previous data from in vitro studies have shown a restricted production of vitamin D₃ through initial 7-DHC concentration [25]. We hypothesized that the treatment of chicks to UVB light could reduce their cutaneous 7-DHC content in the legs which in turn might limit the vitamin D synthesis. However, the current data do not indicate such a UVB induced reduction of cutaneous 7-DHC. Thus, the 7-DHC content in skin appears to be no limiting factor for the endogenous synthesis of vitamin D. Remarkable is the high amount and high inter individual variation of incorporated 7-DHC in the egg yolk. Since high 7-DHC levels were observed for all groups of chicks, the non-exposed and the UVB exposed ones, we assume that 7-DHC is not a specific characteristic of UVB exposure but rather a marker of a vigorous cholesterol metabolism. In this study, the cholesterol content of the eggs was not altered upon the UVB treatment, suggesting that the cholesterol transfer into the egg yolk remained unaffected by an altered transfer of vitamin D.

Biological active vitamin D hormone plays a pivotal role in calcium homeostasis. Laying hens have a high demand of this mineral for an adequate egg shell formation [26]. The intestinal calcium uptake is achieved by apical and basolateral calcium transporters and the cytoplasmatic calcium binding protein calbindin D_{28K} [27], both being controlled by 1,25(OH)₂D₃ levels [28]. Thus, egg shell formation and stability largely depend on vitamin D status [29]. Results of Chennaiah et al. provided evidence for increasing egg shell thickness by feeding a plant source of 1,25(OH)₂D₃ [30]. Since cracked and damaged eggs may contribute to 6–8% of the total production [31] and thus constitute to a large economic problem, we wanted to elucidate the egg shell quality in response to UVB irradiation. Here, we found no impact of UVB

irradiation on egg shell thickness and egg shell stability. This is not actually surprising, because all chicks had comparable plasma concentrations of 1,25(OH)₂D₃.

5. Conclusion

In conclusion, the current study shows a non-linear increase of the vitamin D₃ content in egg yolk in response to increasing daily UVB exposure of chicks. A daily UVB exposure of 300 min could contribute to reach 95% of the maximum attainable vitamin D content in eggs, whereby also 60 min of UVB irradiation could lead to 50% of the achievable increase. The 25(OH)D₃ content in eggs could also be increased by UVB irradiation, although to a lesser extent as the non-hydroxylated vitamin D. Considering the different biological activities of these two vitamin D forms and daily UVB exposure times of 180 and 300 min, the consumption of an egg may provide 3.4 and 3.9 µg vitamin D, respectively.

Author contributions

Conceived and designed the experiment: JK, GIS, AS. Performed the experiment: JK, AB. Analyzed the data: JK, FH, AB. Performed statistical analyses: NM. Wrote the manuscript: JK, GIS.

References

- [1] P. Lips, Worldwide status of vitamin D nutrition, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 121 (2010) 297–300.
- [2] M.F. Holick, Vitamin D deficiency, *N. Engl. J. Med.* 357 (3) (2007) 266–281.
- [3] J. Liu, Vitamin D content of food and its contribution to vitamin D status: a brief overview and Australian focus, *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (2012) 1802–1807.
- [4] M.S. Calvo, S.J. Whiting, C.N. Barton, Vitamin D intake: a global perspective of current status, *J. Nutr.* 135 (2005) 310–316.
- [5] M.S. Calvo, S.J. Whiting, Survey of current vitamin D food fortification practices in the United States and Canada, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 136 (2013) 211–213.
- [6] M.D. Kalaras, R.B. Beelman, R.J. Elias, Effects of postharvest pulsed UV light treatment of white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) on vitamin D₂ content and quality attributes, *J. Agric. Food. Chem.* 60 (2012) 220–225.
- [7] A. Schutkowski, J. Krämer, H. Kluge, F. Hirche, A. Krombholz, T. Theumer, G.I. Stangl, UVB exposure of farm animals: study on a food-based strategy to bridge the gap between current vitamin D intakes and dietary targets, *PLoS One* 8 (7) (2013) e69418.
- [8] J. Kühn, A. Schutkowski, H. Kluge, F. Hirche, G.I. Stangl, Free-range farming: a natural alternative to produce vitamin D-enriched eggs, *Nutrition* 30 (2014) 481–484.
- [9] X.Q. Tian, T.C. Chen, Z. Lu, Q. Shao, M.F. Holick, Characterization of the translocation process of vitamin D₃ from the skin into the circulation, *Endocrinology* 135 (2) (1994) 655–661.
- [10] M.F. Holick, J.A. MacLaughlin, S.H. Doppelt, Regulation of cutaneous previtamin D₃ photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator, *Science* 211 (1981) 590–593.
- [11] Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Legehennen und Masthühner (Broiler), DLG-Verlag (1999) Frankfurt.
- [12] T. Higashi, Y. Shibayama, M. Fuji, K. Shimada, Liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the determination of salivary 25-hydroxyvitamin D₃: a noninvasive tool for the assessment of vitamin D status, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 229–238.
- [13] P.H. Mattila, V.I. Piironen, E.J. Uusi-Rauva, P.E. Koivisto, Contents of cholecalciferol, ergocalciferol, and their 25-hydroxylated metabolites in milk products and raw meat and liver as determined by HPLC, *J. Agric. Food Chem.* 43 (9) (1995) 2394–2399.
- [14] A. Hara, N.S. Radin, Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent, *Anal. Biochem.* 90 (1978) 420–426.
- [15] L.C. Browning, A.J. Cowieson, Vitamin D fortification of eggs for human health, *J. Sci. Food Agric.* 94 (2014) 1389–1396.
- [16] P. Mattila, T. Rokka, K. Könkö, J. Valaja, L. Rossow, E.-L. Ryhänen, Effect of cholecalciferol-enriched hen feed on egg quality, *J. Agric. Food Chem.* 51 (1) (2003) 283–287.
- [17] K.M. Seamans, K.D. Cashman, Existing and potentially novel functional markers of vitamin D status: a systematic review, *Am. J. Clin. Nutr.* 89 (2009) 1997S–2008S.
- [18] P.D. Lewis, R.M. Gous, Responses of poultry to ultraviolet radiation, *World Poult. Sci. J.* 65 (2009) 499–510.
- [19] D.R. Fraser, J.S. Emtage, Vitamin D in the avian egg. Its molecular identity and mechanism of incorporation into yolk, *Biochem. J.* 160 (1976) 671–682.
- [20] K.D. Cashman, The role of vitamins and dietary-based metabolites of vitamin D in prevention of vitamin D deficiency, *Food. Nutr. Res.* 56 (2012) 5383.
- [21] Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D, The National Academies Press, Washington D.C, 2011.
- [22] A.R. Webb, B.R. DeCosta, M.F. Holick, Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D₃ by causing its photodegradation, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68 (5) (1989) 882–887.
- [23] J.A. Ko, B.H. Lee, J.S. Lee, H.J. Park, Effect of UV-B exposure on the concentration of vitamin D₂ in sliced shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) and white button mushroom (*Agaricus bisporus*), *J. Agric. Food Chem.* 56 (10) (2008) 3671–3674.
- [24] K. Takada, Effect of u.v. rays on 7-dehydrocholesterol content in rat skin, *J. Steroid. Biochem.* 18 (4) (1983) 507–509.
- [25] W.J. Olds, A.R. McKinley, M.R. Moore, M.G. Kimlin, In vitro model of vitamin D₃ (cholecalciferol) synthesis by UV radiation: dose-response relationships, *J. Photochem. Photobiol. B* 93 (2008) 88–93.
- [26] V.V. Jonchere, A.B. Brionne, J.J. Gautron, Y.Y. Nys, Identification of uterine ion transporters for mineralisation precursors of the avian eggshell, *BMC Physiol.* 12 (10) (2012) 1–17.
- [27] A. Bar, Calcium homeostasis and vitamin D metabolism and expression in strongly calcifying laying birds, *Comp. Biochem. Physiol.* 151 (4) (2008) 477–490.
- [28] T. Sugiyama, H. Kikuchi, S. Hiyama, K. Nishizawa, S. Kusuhara, Expression and localisation of calbindin D28k in all intestinal segments of the laying hen, *Br. Poult. Sci.* 48 (2) (2007) 233–238.
- [29] J. Roberts, Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens, *J. Poult. Sci.* 41 (3) (2004) 161–177.
- [30] S. Chennaiah, S.S.Y.H. Qadri, S.V. Rama Rao, G. Shyamsunder, N. Raghuramulu, *Cestrum diurnum* leaf as a source of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ improves egg shell thickness, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 89–90 (89) (2004) 589–594.
- [31] R.M.J. Hamilton, K.G. Hollands, P.W. Voisey, A.A. Grunder, Relationship between egg shell quality and shell breakage and factors that affect shell breakage in the field – a review, *World Poult. Sci. J.* 35 (3) (1979) 177–190.

3.3 Studie 3

KÜHN J, Schutkowski A, Kluge H, Hirche F, Stangl GI: Free-range farming: a natural alternative to produce vitamin D-enriched eggs. *Nutrition* 2014; 30 (4): 481 - 484



Contents lists available at ScienceDirect

Nutrition

journal homepage: www.nutritionjrn.com

Basic nutritional investigation

Free-range farming: A natural alternative to produce vitamin D-enriched eggs

Julia Kühn, Alexandra Schutkowski Ph.D., Holger Kluge Ph.D., Frank Hirche Ph.D., Gabriele I. Stangl Ph.D.*

Institute of Agricultural and Nutritional Sciences, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2013
Accepted 8 October 2013

Keywords:

Free-range farming
Natural sunlight
Vitamin D
Eggs
Hen

ABSTRACT

Objective: Food-based strategies need to be developed to improve the vitamin D status of individuals. Recent studies identified ultraviolet B irradiation as an efficient method to enrich mushrooms and eggs with vitamin D. The aim of this study was to determine whether free-range farming of hens could provide a valuable method to produce vitamin D-enriched eggs.

Methods: Laying hens were randomly assigned to three groups of 33 to 34 animals each, and were kept either indoors (indoor group), outdoors (outdoor group), or with an indoor/outdoor option (indoor/outdoor group) over 4 wk.

Results: The study shows that the vitamin D₃ content of egg yolk was three- to fourfold higher in the groups that were exposed to sunlight (outdoor and indoor/outdoor groups) compared with the indoor group ($P < 0.001$). Egg yolk from the outdoor group revealed the highest vitamin D₃ content, which averaged 14.3 µg/100 g dry matter (DM), followed by that from the indoor/outdoor group (11.3 µg/100 g DM). Yolk from indoor eggs contained only 3.8 µg vitamin D/100 g DM. The 25-hydroxyvitamin D (25[OH]D₃) content of egg yolk was also influenced by sunlight exposure, although less pronounced than the vitamin D content ($P < 0.05$). In contrast, free-range eggs randomly acquired from supermarkets had relatively low vitamin D contents.

Conclusion: Free-range farming offers an efficient alternative to fortify eggs with vitamin D, provided that farming conditions are sufficiently attractive for hens to range outside.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The main source of vitamin D in humans is the conversion of 7-dehydrocholesterol (7-DHC) in the epidermis to previtamin D₃, which isomerizes to form vitamin D₃. Seasonal and local variations of ultraviolet (UV) radiation, increasing indoor activities, but also public awareness of the hazardous effects of sun exposure that lead to sun avoidance strategies or the use of sunscreens limit the endogenous synthesis of vitamin D₃. As a consequence, the need for vitamin D from food sources is on the rise.

In contrast to vitamin D from sunlight, dietary vitamin D is available during any season and offers a reliable source of the vitamin for individuals who do not have access to sunlight

exposure. Oily fish is the most important dietary source of vitamin D [1], whereas most other foods from animal origin contain very low amounts and do not significantly contribute to an improvement of vitamin D status. A recent study was able to ascertain UVB exposure of hens as a highly effective approach to increase the vitamin D content in eggs [2]. Data from that study showed that UVB radiation increased the vitamin D content much stronger than feeding the maximum permissible dosages of dietary vitamin D₃.

Currently, three farming systems for laying hens are frequently implemented in practice: Free-range farming, floor management, and small-group systems, whereby mixed forms of these housing systems are also common. In free-range systems, hens have the possibility to go outside and become exposed to natural sunlight, whereas floor management and small-group systems operate with UV-free light regimens. Therefore, we hypothesized that eggs from free-range hens might contain higher vitamin D contents than barn eggs. The present study aimed to investigate the vitamin D content of eggs in response to different housing conditions.

GIS, JK, and AS conceived and designed the experiment. JK, AS, and HK performed the experiment. JK and FH analyzed the data. JK, GIS, and AS wrote the article.

* Corresponding author: Tel.: +49-345-5522707; fax: +49-345-5527124.
E-mail address: Gabriele.stangl@landw.uni-halle.de (G. I. Stangl).

Materials and methods

Animals and treatment

The study was conducted with 101 25-wk-old laying hens (Lohmann silver). The hens were randomly assigned to three groups. Group 1 ($n = 34$, indoor group) was kept indoors without any exposure to natural sun light over the entire study period; group 2 ($n = 34$, outdoor group) was placed outside for 9 h/d from 0700 h to 1600 h. Group 3 ($n = 33$, indoor/outdoor group) could choose freely between inside and outside (outside option from 0700 h to 1600 h). The free-range area was partly covered by UV-permeable acrylic glass to provide rain protection. All hens received a standard feed with 2500 IU vitamin D/kg (Deuka, Könnern, Germany). Feed and water were offered ad libitum. The indoor group was fed inside the barn; the outdoor and indoor/outdoor groups were provided with feed and water, both indoors and outdoors.

Study protocol

The study was performed from August 22 to September 19, 2012 at the experimental facility of the Martin-Luther-University Halle-Wittenberg (51° latitude). Before the experiment, all hens were housed in a barn system for 2 wk. The experimental period lasted 4 wk. Eggs were collected at the beginning of the study (basal) and after the fourth week (final) of the experiment. To study the choice behavior of the indoor/outdoor group, hens were monitored on three randomly selected days during the experimental period.

Additionally, free-range and barn eggs were collected randomly from supermarkets and analyzed for their vitamin D content. To ensure that the commercial free-range eggs were produced under similar weather and sunlight conditions as the experimental eggs, we acquired eggs from two different hen farms located near the experimental facility. The eggs were collected in September and January to determine out seasonal influence on the vitamin D.

Sun light exposure conditions and sunshine duration

The outdoor enclosure conditions (location, incidence of sun light) were arranged to ensure an optimal UVB exposure from 1000 h to 1600 h. The UV permeability of the coverage was $>90\%$ (manufacturer's specification). Sunshine duration, defined as the time during which the solar irradiance exceeds 120 W/m^2 , was recorded daily.

Analysis of eggshell thickness and stability

Eggshell stability was determined by an electronically controlled breaking strength tester (Messtechnik Gutsch, Nauendorf, Germany). Eggshell thickness was measured using a micrometer screw with an accuracy of $10.0 \mu\text{m}$. Shell fragments were collected from the equatorial area and mechanically purified from organic materials.

Analysis of vitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₃, and 7-DHC contents in egg yolk

Pooled egg yolk samples (of three yolks each) of each group were used for the analysis of vitamin D metabolites. Commercial eggs were analyzed individually. Vitamin D₃, 25-hydroxyvitamin D₃ (25[OH]D₃) and 7-DHC were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, as described previously [2].

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using SPSS Statistics version 20 (IBM, Armonk, NY, USA). Differences in the vitamin D content of eggs from basal to final were analyzed by a paired t test. Differences between the three groups of hens were analyzed by one-way analysis of variances (ANOVA). Vitamin D content of the purchased eggs was compared by two-way ANOVA with the factors "farming" and "season," and the interaction between these two factors. When two-way ANOVA revealed significance for one of these factors, a post hoc comparison was performed. In case of variance homogeneity, means of the four groups were compared by Tukey's test, or in case of variance heterogeneity, by Games-Howell test. Means were considered significantly different at $P < 0.05$.

Results

Sunshine duration and behavior of hens

The average weekly daily sunshine durations were 6.6, 5.5, 5.9, and 7 h, respectively (Fig. 1). Observations from three randomly selected days showed that hens from the indoor/outdoor group spent most of their time outside the barn. Thus, we

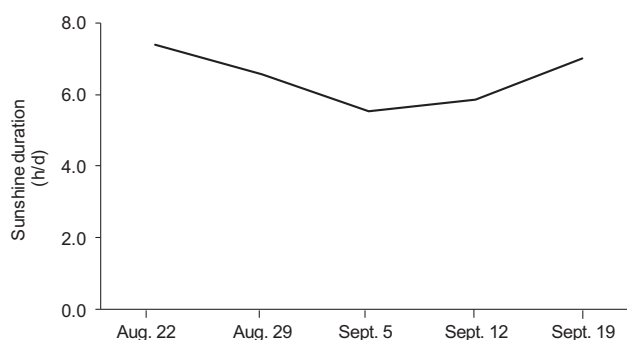


Fig. 1. Sunshine duration at the trial site (data averaged to weekly sunshine duration).

assumed that UVB exposure of this group was comparable to that of the outdoor group.

Egg weight and eggshell quality

Egg weight, eggshell thickness, and stability did not differ between the three groups of hens at basal (Table 1). In all groups of hens, egg weights significantly increased from basal to final ($P < 0.05$). The housing systems did not reveal any effect on final egg weights and eggshell stability (Table 1). The eggshell thickness increased from basal to final in the outdoor and indoor/outdoor groups ($P < 0.05$), but not in the indoor group (Table 1). Final eggshell thickness was highest in the outdoor group, lowest in the indoor group, and showed intermediate values in the indoor/outdoor group.

Vitamin D content of egg yolk in response to the housing system

Analysis of vitamin D metabolites in pooled egg yolks from the treatment groups was performed at basal and after 4 wk of the experiment (Fig. 2). Egg yolk data did not reveal any differences in basal contents of vitamin D₃, 25(OH)D₃, and 7-DHC between the three groups of hens. At the end of the experiment, the vitamin D₃ content of egg yolk was three- to fourfold higher in the sunlight-exposed groups (outdoor group and indoor/outdoor group) than in the indoor group ($P < 0.001$; Fig. 2A). Egg yolks from the outdoor group revealed the highest vitamin D₃ content, which averaged $14.3 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ dry matter (DM), followed by yolk from the indoor/outdoor group with $11.3 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ DM. Egg yolk

Table 1
Egg weights and eggshell quality in response to the housing system

	Indoor group	Outdoor group	Indoor/outdoor group
Egg weight (g)			
Basal	54.3 ± 3.1	52.7 ± 2.4	52.9 ± 1.9
Final	62.2 ± 4.8*	59.8 ± 1.9*	59.3 ± 2.6*
Eggshell thickness (μm)			
Basal	352 ± 17	337 ± 20	333 ± 14
Final	362 ± 14 ^b	380 ± 16 ^a	368 ± 13 ^{a,b}
Eggshell stability (N)			
Basal	39.3 ± 7.7	36.8 ± 5.1	38.1 ± 4.4
Final	46.5 ± 7.2	49.6 ± 7.5*	49.3 ± 9.1*

Values are presented as mean ± SD ($n = 7$ to 11)

Means not sharing the same superscripts (a,b) are significantly different ($P < 0.05$, Tukey's test).

* Means are significantly different compared with basal ($P < 0.05$, paired t test).

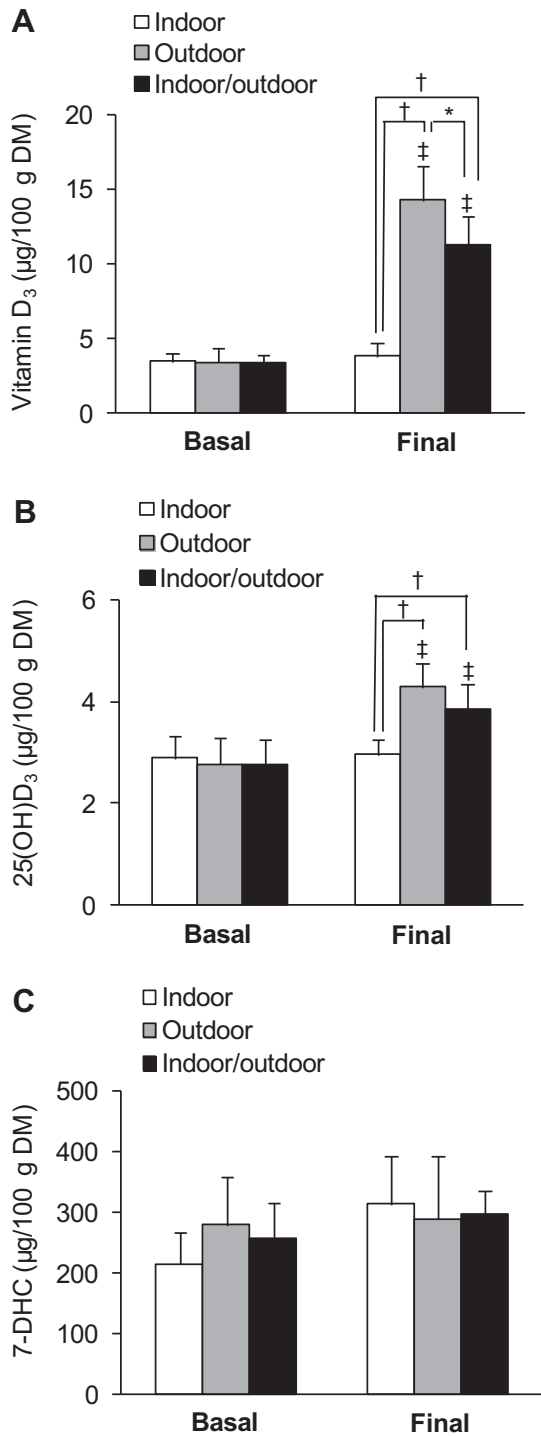


Fig. 2. Content of (A) vitamin D₃, (B) 25(OH)D₃, and (C) 7-dehydrocholesterol (7-DHC) in dry matter (DM) of pooled egg yolks from three hens each (n = 7 to 11, resulting from inconsistent numbers of laid eggs). Values are expressed as mean ± SD. Data were analyzed by one-way ANOVA using multiple comparison procedures to analyze means of the groups (Tukey's test or Games-Howell test). *P < 0.05, †P < 0.001, ‡significantly different from basal (P < 0.05, paired t test).

of the indoor group revealed the lowest vitamin D levels. The content of 25(OH)D₃ in egg yolk also increased in response to sunlight exposure, although less pronounced than the vitamin D₃ content (P < 0.05; Fig. 2B). The 7-DHC contents of eggs were not influenced by the housing system (Fig. 2C).

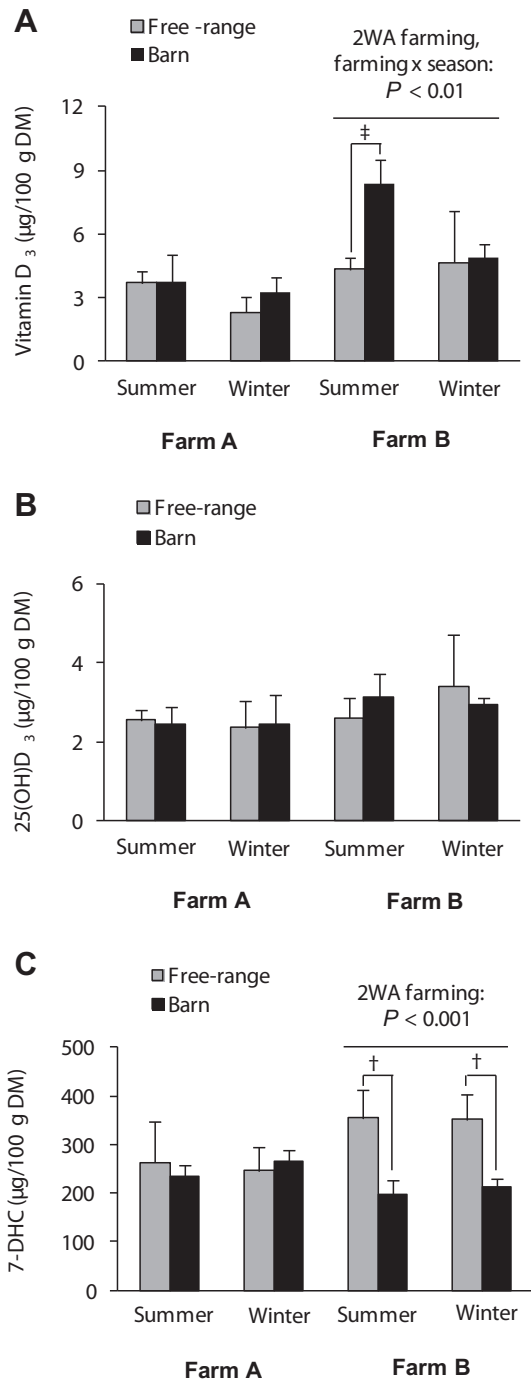


Fig. 3. Content of (A) vitamin D₃, (B) 25(OH)D₃, and (C) 7-dehydrocholesterol (7-DHC) in dry matter (DM) of yolks from commercial eggs (n = 6 per set). Values are expressed as mean ± SD. Data were analyzed by two-way ANOVA (2 WA) with the factors “farming” and “season” and the interaction between these factors, respectively. Tukey's test and Games-Howell test were applied to compare means: †P < 0.001, ‡P < 0.01.

Vitamin D content of commercial eggs

Vitamin D data did not show a consistent picture of free-range and barn eggs. Regardless of the housing system and the season, the vitamin D₃ content of commercial eggs from farm A was low and ranged between 2 and 4 µg/100 g DM (Fig. 3A). Also, free-range eggs from farm B were not characterized by higher

vitamin D content compared with barn eggs (Fig. 3A). The yolk content of 25(OH)D₃ did not differ between the commercial eggs analyzed (Fig. 3B). The 7-DHC content was not different between eggs from farm A, but was higher in free-range eggs than in barn eggs from farm B ($P < 0.05$; Fig. 3C).

Discussion

UV radiation is essential for endogenous vitamin D synthesis in humans and animals [3]. Recent data show that eggs from hens exposed for 3 h to artificial UVB radiation contained sixfold higher amounts of vitamin D₃ than eggs from non-exposed animals [2]. Here, we show that free-range versus barn-rearing systems for laying hens could offer an appropriate and cheap alternative to fortify eggs with vitamin D. Eggs from free-range hens that spent 9 h/d outdoors contained on average fourfold higher amounts of vitamin D₃ and 45% higher amounts of 25(OH)D₃ than barn eggs. However, we need to acknowledge that the findings are specific to the season (August 22 to September 19) and latitude (51°, Central Germany) under which the experiment was conducted. It is to be expected that the efficacy of free-range systems to fortify animal-based foods such as eggs, largely depend on weather, season, and the latitude of the area where the animals are housed [4,5]. We further found that eggs from chickens with the inside/outside option contained markedly more vitamin D₃ than the indoor group, although the vitamin D₃ contents of the outdoor group were not fully reached. Although such eggs may not cover the daily vitamin D recommendation, the idea of vitamin D bio-addition by sunlight could be used for other animal housing systems to improve the vitamin D content of meat or milk. The fact that the vitamin D content of milk could be increased by sunlight exposure of cows [6,7] indicates the effectiveness of the free-range system in production of other vitamin D-enriched food.

Owing to the efficient bio-addition of eggs with vitamin D by natural sunlight exposure of hens, we hypothesized that commercial free-range eggs produced in summer should contain higher amounts of vitamin D than barn eggs or free-range eggs from winter. However, the vitamin D analysis did not support our hypothesis. After visiting the farms, we assume that the free-range housing conditions are crucial for the choice behavior of the chickens. An important aspect that could influence the movement of chickens in and out of the hen house is the offered space for feeding [8]. We observed that chickens in a free-range husbandry avoided moving outside if they received their feed exclusively inside the barn. Besides the feeding points, habitat preferences of free-range chickens are also important. One study observed that the number of chickens found to be ranging outside was positively correlated with the amount of tree cover

the range area contained [9]. Thus, the efficiency of sunlight exposure to produce vitamin D-enriched eggs also depends on the habitat conditions.

Another interesting finding from this study was an increase in the stability of eggshells from basal to final in the sunlight-exposed groups, but not in the indoor group. Eggshell quality could be affected by diverse factors [10]. Most of the studies did not found any effect of the housing system on eggshell quality [11–13], but it is still a subject of controversy whether UVB radiation could improve the eggshell quality.

Conclusion

Data show that the free-range farming system could be an appropriate method to fortify eggs with vitamin D, provided free-range farming conditions are sufficiently attractive for the hens to range outside.

References

- [1] Mattila PH, Piironen VI, Uusi-Rauva EJ, Koivistoinen PE. Contents of cholecalciferol, ergocalciferol, and their 25-hydroxylated metabolites in milk products and raw meat and liver as determined by HPLC. *J Agric Food Chem* 1995;43:2394–9.
- [2] Schutkowski A, Krämer J, Kluge H, Hirche F, Krombholz A, Theumer T, et al. UVB exposure of farm animals: Study on a food-based strategy to bridge the gap between current vitamin D intakes and dietary targets. *PLoS ONE* 2013;8:e69418.
- [3] Webb AR. Who, what, where and when—influences on cutaneous vitamin D synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;92:17–25.
- [4] Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃: Exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:373–8.
- [5] Sherman SS, Hollis BW, Tobin JD. Vitamin D status and related parameters in a healthy population: The effects of age, sex, and season. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:405–13.
- [6] Kurmann A, Indyk H. The endogenous vitamin D content of bovine milk: Influence of season. *Food Chem* 1994;50:75–81.
- [7] Hymoller L, Jensen SK. Vitamin D(3) synthesis in the entire skin surface of dairy cows despite hair coverage. *J Dairy Sci* 2010;93:2025–9.
- [8] Bubier NE. Movement of flocks of laying hens in and out of the hen house in four free range systems. *Br Poult Sci* 1998;39:5–6.
- [9] Stamp Dawkins M, Cook PA, Whittingham MJ, Mansell KA, Harper AE. What makes free-range broiler chickens range? In situ measurement of habitat preference. *Animal Behaviour* 2002;66:151–60.
- [10] Roberts JR. Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. *J Poult Sci* 2004;41:161–77.
- [11] Minelli G, Sirri F, Folegatti E, Meluzzi A, Franchini A. Egg quality traits of laying hens reared in organic and conventional systems. *Ital J Anim Sci* 2007;6:728–30.
- [12] Van Den Brand H, Parmentier HK, Kemp B. Effects of housing system (outdoor vs cages) and age of laying hens on egg characteristics. *Br Poult Sci* 2004;45:745–52.
- [13] Mugnai C, dal Bosco A, Castellini C. Effect of rearing system and season on the performance and egg characteristics of ancona laying hens. *Ital J Anim Sci* 2009;8:175–88.

3.4 Studie 4

Im Rahmen der **Studie 4** wurde der Einfluss einer oralen 7-DHC-Zufuhr auf den Vitamin D-Metabolismus am Mausmodell untersucht. Der Versuchsaufbau sowie ausgewählte Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

3.4.1 Studiendesign

24 männliche Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6 (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurden im Alter von vier Wochen zufällig auf zwei Gruppen (n = 12) verteilt. Die Kontrollgruppe (- 7-DHC) erhielt eine Diät ohne 7-DHC, während die Tiere der Interventionsgruppe (+ 7-DHC) 7-DHC in einer Konzentration von 5 mg/kg Diät erhielten. Beide Gruppen wurden adäquat mit Vitamin D versorgt (25 µg/kg) [National Research Council 1995]. Das Verhältnis von 7-DHC zu Vitamin D in der Diät wurde in Anlehnung an das Konzentrationsverhältnis im Hühnerei berechnet. Die Tiere erhielten eine fettreiche Diät, welche aus 53,8 % Kohlenhydraten, 20,0 % Fett, 20,0 % Protein, 6,0 % Vitaminen und Mineralien sowie 0,2 % Methionin bestand. Als Fettkomponente fungierten Kokosfett und Sojaöl, um einen zusätzlichen Eintrag von 7-DHC oder Vitamin D durch Verwendung tierischer Produkte auszuschließen. Die Vitamin- und Mineralstoffgehalte der Diäten wurden nach den Empfehlungen des National Research Council [1995] kalkuliert. Während des gesamten Experiments stand den Tieren Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Die Futteraufnahme pro Käfig sowie das Körpergewicht pro Tier wurden wöchentlich erfasst.

Jeweils zwei Tiere wurden in einem Makrolonkäfig bei konstanter Raumtemperatur und 12-stündigem Hell-Dunkelrhythmus gehalten. Die Versuchsdauer betrug sechs Wochen. Zu Versuchsende wurden die Mäuse über einen Zeitraum von vier Stunden das Futter entzogen und zur anschließenden Probenentnahme mittels Diethylether betäubt und anschließend dekapitiert. Das Blut wurde in Serumgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt und im Anschluss für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die Serumproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Ferner wurde den Tieren die Leber sowie perirenales Fettgewebe entnommen. Die Gewebeproben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -80 °C gelagert. Der Versuch wurde unter Einhaltung der Richtlinien zur Pflege und Handhabung von Labortieren [National Research Council 2011] durchgeführt.

3.4.2 Analysen

Der Gehalt an 7-DHC, Vitamin D₃ und 25(OH)D₃ wurde in Serum, Leber und perirenalem Fettgewebe mittels Flüssigchromatografie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) quantifiziert. Die Probenaufarbeitung erfolgte gemäß **Studie 1**, **Studie 2** und **Studie 3**. Alle Metaboliten wurden als Derivate des 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD) mittels positiver Elektrospray-Ionisation (ESI⁺) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte im *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) Modus. Die entsprechenden Massenübergänge der Zielmetaboliten sowie der internen Standardsubstanzen sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Die Auswertung wurde anhand der Software Analyst 1.4 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 3-1 Massenübergänge und substanzspezifische Einstellungen der LC-MS/MS für alle quantifizierten Metaboliten.

Metabolit	Massenübergang [m/z] *	Declustering Potential [V]	Collisions Energy [V]	Collisions Cell Exit Potential [V]
7-DHC	591 > 365	11,0	26,7	7,00
Ergosterol **	603 > 377	4,30	19,9	10,2
Vitamin D ₃	591 > 298	25,0	25,0	6,00
Vitamin D ₃ -d ₃ **	594 > 301	25,0	25,7	6,00
25(OH)D ₃	607 > 298	14,5	30,7	5,90
25(OH)D ₃ -d ₆ **	614 > 298	15,0	30,7	5,20

* Das Mutterion stellt ein Methylamin-Addukt dar [M+CH₃NH₃]⁺.

** Interne Standardsubstanz.

In den Leberproben wurde überdies die relative *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) Konzentration ausgewählter Gene des Vitamin D-Stoffwechsels mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*realtime* RT-PCR) untersucht. Aus dem Lebergewebe erfolgte zunächst eine Isolierung der gesamten RNA unter Zuhilfenahme des Kits peqGOLD TriFastTM (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Die Aufarbeitung der homogenisierten Proben wurde entsprechend der Protokollvorgabe des Herstellers durchgeführt. Anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm konnte die RNA-Konzentration in den Proben ermittelt werden. Ferner erfolgte eine qualitative Kontrolle der isolierten RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese sowie optischer Dichte bei 260/280 nm. Die anschließende Umschreibung zur *complementary* Desoxyribonukleinsäure (cDNA) wurde entsprechend der Protokollvorgabe für das

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Dieses Prinzip basiert auf der spezifischen Selektion polyadeninhaltiger mRNA-Sequenzen mittels Überschusszugabe von Thymin. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die relativen mRNA-Konzentrationen wurden mittels *realtime* RT-PCR bestimmt [Radtko et al. 2014]. Für die Amplifizierung der cDNA-Templates wurden 20-35 PCR-Zyklen durchgeführt. Ein solcher PCR-Zyklus setzt sich zusammen aus der Denaturierung des cDNA-Templates bei 95 °C, der Primerbindung bei einer spezifischen Annealingtemperatur sowie der Produktverlängerung (Elongation) bei 72 °C. Die *realtime* RT-PCR wurde mit dem Rotorgene 6000 sowie der Rotorgene Software 5.0 (Corbett Research, Mortlake, Australien) durchgeführt. Eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese diente der Qualitätskontrolle des amplifizierten Produktes. Die Kalkulation der relativen mRNA-Konzentration erfolgte nach Pfaffl et al. [2001]. Als Referenzgene wurden Beta-2-Mikroglobulin (B2M) sowie das Große Ribosomale Protein P0 (RPLP0) verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3-2 gezeigt.

Tabelle 3-2 Charakteristika der verwendeten Primer zur Untersuchung relativer mRNA-Expressionen in der Leber.

Gen	Forward Primer (von 5' nach 3')	Reverse Primer (von 5' nach 3')	Produktgröße [bp]
B2M *	TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA	CAGTATGTTTCGGCTTCCCATT	104
CYP2R1	CAAAAATGGGAGGCTTACTC	GTTATCAGTTGCTTGAGGTC	196
CYP27A1	CTTTCTCTTCCCAAGAATAC	TTATCAGCCTCTTTCTTCCTC	126
LDLR	TGTCCATCTTCTTCCCTATTG	GTCTTGAGGGGTAGGTATAG	183
LRP1	CCTACCTAGACTACATCGAG	GCGTAGAGATAGTTCTCAAAC	118
RPLP0 *	GAAACTGCTGCCTCACATCCG	CTGGCACAGTGACCTCACACG	146

* Referenzgen. Die Gene kodieren folgende Proteine: Beta-2-Mikroglobulin (B2M), Vitamin D 25-Hydroxylase (CYP2R1), Sterol 27-Hydroxylase (CYP27A1), *Low Density Lipoprotein Receptor* (LDLR), *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1* (LRP1), Großes Ribosomales Protein P0 (RPLP0).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels SPSS Version 22 (IBM, Armonk, USA). Alle Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Die Normalverteilung der Daten wurde anhand des Shapiro-Wilk Tests überprüft. Waren die Daten nicht normalverteilt, so erfolgte eine logarithmische Transformation der entsprechenden Stichproben. Beide Gruppen wurden auf bestehende Unterschiede

mittels unabhängigem t-Test, anhand der nicht-transformierten bzw. logarithmierten Daten, untersucht. Das Signifikanzniveau wurde mit $P < 0,05$ definiert.

3.4.3 Ergebnisse

Die mittlere Gewichtszunahme (- 7-DHC: $178 \pm 41,6$ mg/d; + 7-DHC: $163 \pm 33,0$ mg/d) und die durchschnittliche tägliche Futtermittelaufnahme (- 7-DHC: $2,37 \pm 0,15$ g/d; + 7-DHC: $2,41 \pm 0,10$ g/d) unterschieden sich nicht zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe. Für die Interventionsgruppe ergab sich daraus eine mittlere 7-DHC-Aufnahme von $12,0 \pm 0,50$ µg/d. Das Verhältnis 7-DHC/Vitamin D₃ in der Diät betrug 200/1.

Zu Versuchsende wurde bei allen Tieren der Gehalt an 7-DHC sowie 25(OH)D₃ im Plasma bestimmt. Trotz der hohen 7-DHC-Aufnahme wurde gegenüber den Kontrolltieren kein Unterschied im 7-DHC-Plasmagehalt festgestellt (Abbildung 3-1A). Ferner zeigte die Behandlung keinen Einfluss auf die Gehalte an 25(OH)D₃ (Abbildung 3-1B).

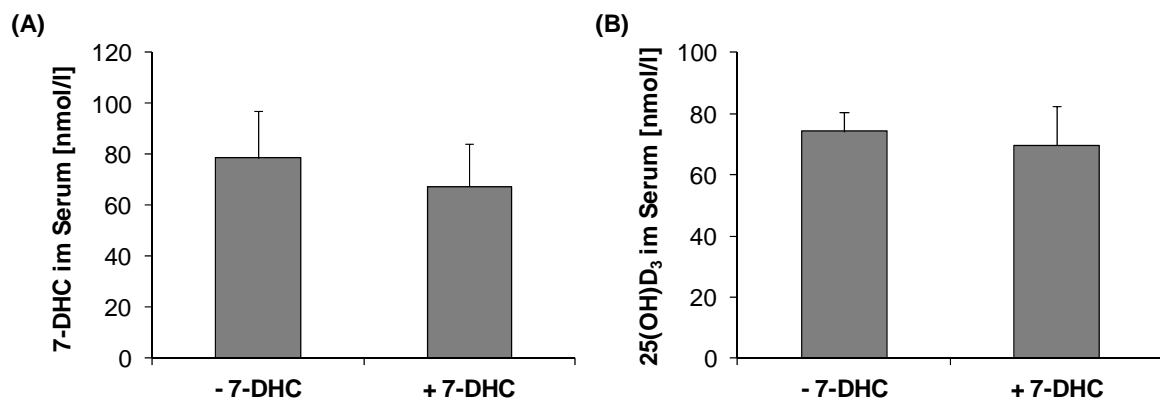


Abbildung 3-1 **Einfluss einer alimentären 7-DHC-Zufuhr auf die Gehalte an (A) 7-DHC und (B) 25(OH)D₃ im Serum.** Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 12$.

Um den Einfluss einer alimentären 7-DHC-Aufnahme auf die Gehalte an 7-DHC im Gewebe zu untersuchen, erfolgte eine Quantifizierung in Leber und perirenalem Fettgewebe. In beiden Geweben wurde zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe kein Unterschied detektiert (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3 7-DHC-Gehalt in Leber und perirenalem Fettgewebe in Abhängigkeit von der alimentären 7-DHC-Zufuhr.

	Behandlungsgruppe		Unabhängiger t-Test
	- 7-DHC	+ 7-DHC	
Leber [ng/g]	225 ± 81,3	192 ± 67,5	ns
Perirenales Fettgewebe [µg/g]	159 ± 133	141 ± 123	ns

Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung, n = 12. Nicht signifikant (ns).

Neben 7-DHC wurde auch der Gehalt an Vitamin D₃ in der Leber sowie im Fettgewebe der Mäuse bestimmt. Durch alimentäre Zufuhr von 7-DHC konnte ein starker Anstieg von Vitamin D₃ in der Leber verzeichnet werden ($P < 0,001$, Abbildung 3-2A). Im Fettgewebe hingegen war Vitamin D₃ nur in der Interventionsgruppe quantifizierbar (Abbildung 3-2B). Es ist davon auszugehen, dass auch im Fettgewebe eine Erhöhung des Gehaltes an Vitamin D₃ durch die Zufuhr von 7-DHC erzielt wurde. Die Nachweisgrenze lag für Vitamin D₃ bei 1,7 ng/g Gewebe.

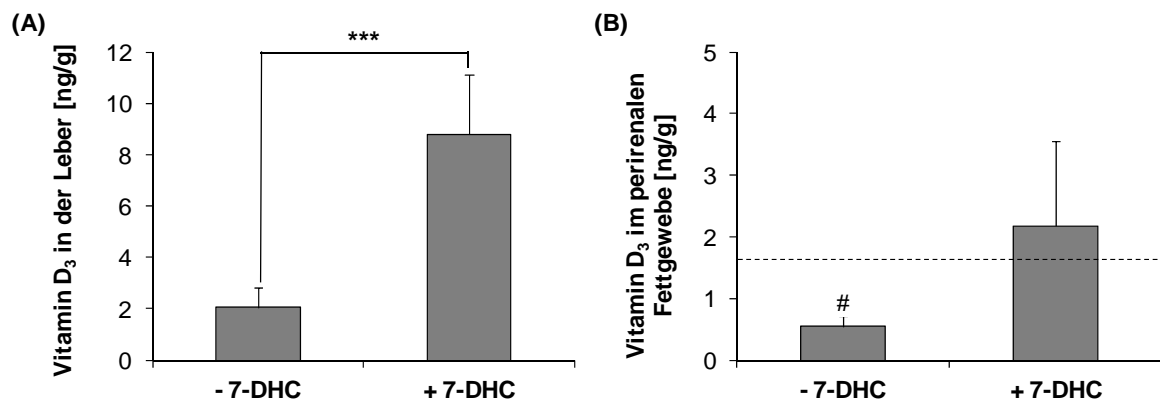


Abbildung 3-2 **Vitamin D₃-Gehalt in (A) Leber und (B) perirenalem Fettgewebe in Abhängigkeit von der alimentären 7-DHC-Zufuhr.** Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung, n = 12. Die unterbrochene Linie stellt die Nachweisgrenze für Vitamin D₃ dar (1,7 ng/g). # Balken ist ein Zufallswert unterhalb der Nachweisgrenze. *** Signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (t-Test für unabhängige Stichproben, $P < 0,001$).

25(OH)D₃ konnte weder in der Leber noch im perirenalem Fettgewebe detektiert werden. Die Nachweisgrenze lag bei 1,0 ng/g Gewebe.

Die relative mRNA-Expression wurde in Abhängigkeit von der oralen 7-DHC-Zufuhr in der Leber untersucht. Dabei wurde die Expression von Genen, die an der Hydroxylierung und der zellulären Aufnahme von Vitamin D₃ beteiligt sind untersucht. Zwischen beiden Gruppen bestanden keine Unterschiede in den relativen mRNA-Konzentrationen (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4 *Relative mRNA-Konzentration in der Leber in Abhängigkeit von der alimentären 7-DHC-Zufuhr.*

Gen	Behandlungsgruppe		Unabhängiger t-Test
	- 7-DHC	+ 7-DHC	
CYP2R1	1,00 ± 0,27	0,91 ± 0,17	ns
CYP27A1	1,00 ± 0,23	0,91 ± 0,17	ns
LDLR	1,00 ± 0,50	0,94 ± 0,29	ns
LRP1	1,00 ± 0,46	0,87 ± 0,36	ns

Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung, n = 12. Nicht signifikant (ns). Die Gene kodieren folgende Proteine: Vitamin D 25-Hydroxylase (CYP2R1), Sterol 27-Hydroxylase (CYP27A1), *low density lipoprotein receptor* (LDLR), *low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1).

4 Diskussion

4.1 Effizienz einer Ultraviolettlicht-Exposition zur Steigerung des Vitamin D-Gehaltes im Hühnerei

In Deutschland beträgt die durchschnittliche Vitamin D-Aufnahme weniger als 3 µg pro Tag [Max Rubner-Institut 2008]. Bei einer empfohlenen täglichen Zufuhr von 20 µg Vitamin D [DGE 2013] decken große Teile der Bevölkerung ihren Bedarf nicht. Dennoch unterliegt die Anreicherung von Lebensmitteln in der Bundesrepublik strengen gesetzlichen Regulationen. Um dem Versorgungsdefizit dennoch entgegenzuwirken, bietet es sich an, den Vitamin D-Gehalt durch natürliche Prozesse zu steigern. In diesem Sinne beschreibt die Bezeichnung Bio-Addition eine gezielte Anreicherung von Vitamin D im Zuge der Primärproduktion pflanzlicher oder tierischer Lebensmittel [Calvo & Whiting 2013]. Ein nachträglicher Zusatz von Vitamin D erfolgt im Rahmen der Bio-Addition nicht.

Ein geeignetes Ziellebensmittel sollte gewisse Voraussetzungen erfüllen, um eine bessere Vitamin D-Versorgung zu gewährleisten. In erster Linie muss dabei sichergestellt werden, dass ein Bio-Addition-Verfahren effektiv umsetzbar ist. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für das Hühnerei untersucht. Gleichzeitig sollte es sich um ein Lebensmittel handeln, das regelmäßig von einer möglichst breiten Bevölkerungsgruppe verzehrt wird. Aus dieser Sicht erfüllt das Ei ideale Voraussetzungen. In Deutschland wurde für das Jahr 2012 ein Pro-Kopf-Verbrauch von 217 Hühnereiern ermittelt [Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2013]. Die Varianz der täglichen Verzehrmenge ist verhältnismäßig gering [Max Rubner-Institut 2008]. Daher ist nicht zu erwarten, dass spezifische Bevölkerungsgruppen extrem hohe Mengen Eier konsumieren. Auch im internationalen Vergleich stellen Hühnereier einen festen Bestandteil im Speiseplan dar. Für Australien und die USA wurde ein jährlicher Verbrauch von 213 bzw. 255 Eiern pro Person ermittelt [Liu et al. 2014, United States Department of Agriculture 2014]. Auch unter Berücksichtigung ernährungsphysiologischer Gesichtspunkte bietet das Hühnerei Vorteile. Es ist eine gute Quelle für besonders hochwertiges Protein sowie zahlreiche Mineralstoffe [Song & Kerver 2000].

Hühnereier zur Bio-Addition von Vitamin D zu nutzen ist kein grundlegend neuer Gedanke. Es existieren bereits zahlreiche Untersuchungen, die gezeigt haben, dass ein Vitamin D-reiches Legehennenfutter den Gehalt an Vitamin D im Ei erhöht [Mattila et al. 1995, Mattila et al. 1999, Mattila et al. 2003, Yao et al. 2013, Brownig & Cowieson 2014]. Nach europäischem Recht ist der Zusatz von Vitamin D in der Legehennenhaltung

allerdings auf 80 µg/kg Futtermittel limitiert (Verordnung (EG) Nr. 1443/2006). Diese Höchstmenge wird in der Praxis meist jedoch bereits ausgeschöpft. Daher lässt sich der Vitamin D-Gehalt im Ei nicht weiter über das Futter steigern. Die hier vorliegende Methode basiert hingegen auf einer UVB-induzierten Anreicherung von Vitamin D durch Implementierung von UV-Licht in die Legehennenhaltung.

Ausgangssubstrat für die kutane Vitamin D-Synthese in der Haut ist 7-DHC. Somit ist die verfügbare Menge an 7-DHC ein limitierender Faktor für die Effizienz der endogenen Vitamin D-Synthese [MacLaughlin & Holick 1985, Kuan et al. 2013]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Quantifizierung des 7-DHC-Gehaltes in diversen Hautarealen der Legehenne durchgeführt. Diese ergab, dass der Gehalt an 7-DHC im Bereich der unbefiederten Ständer 190-fach höher ist als im Kamm oder Kehllappen (**Studie 1**). Die UVB-Lampen wurden daher so positioniert, dass vornehmlich eine Exposition der unbefiederten Ständer gewährleistet wurde.

Durch tägliche UVB-Exposition von 180 min konnte somit ein deutlicher Anstieg der Vitamin D-Gehalte im Eigelb erzielt werden (**Studie 1**). Dieser Anstieg trat sogar dann auf, wenn die Tiere ausreichend Vitamin D (75 µg/kg) mit dem Futter erhielten (**Studie 1**). So betrug der Vitamin D₃-Gehalt im Eigelb bei alimentärer Vitamin D-Zufuhr 5,23 µg/100 g TM und bei zusätzlicher UVB-Exposition immerhin 32,4 µg/100 g TM. Hinweise eines früheren Experimentes ergaben, dass eine kopfseitige UVB-Exposition nicht zur Anreicherung von Vitamin D im Ei beiträgt [Lietzow et al. 2012]. Ferner konnte durch diese Art der UVB-Exposition der Vitamin D-Status der Tiere nicht verbessert werden [Lietzow et al. 2012]. Die **Studie 1** zeigte jedoch sehr deutlich, dass selbst bei alimentärer Vitamin D-Zufuhr eine effektive Bio-Addition der Hühnereier realisierbar ist, sofern eine gezielte UVB-Exposition der 7-DHC-reichen Ständerhaut gewährleistet ist.

Untersuchungen der **Studie 2** ergaben, dass mit steigender Dauer der UVB-Exposition der Vitamin D-Gehalt im Eigelb zunimmt. Bei einer täglichen Exposition von 300 min konnten 95 % der maximal zu erreichenden Vitamin D-Menge erzielt werden. Somit ist zu erwarten, dass Expositionszeiten von mehr als 300 min/d nur noch einen minimalen Mehrwert zur Vitamin D-Anreicherung im Ei bringen. Durch orale Applikation konnte eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung bis zu einer Vitamin D-Zulage von 618 µg/kg Futter nachgewiesen werden [Persia et al. 2013, Yao et al. 2013]. Die Vitamin D₃-Gehalte im Eigelb betragen dabei 60 µg/100 g Frischmasse. Dies entspricht dem Vierfachen dessen, was im Rahmen einer UVB-Exposition maximal erzielt werden konnte (**Studie 2**). Somit sind alimentäre und UVB-induzierte Vitamin D-Anreicherungen durch unterschiedliche Dosis-Wirkungs-Beziehungen gekennzeichnet, was vermutlich auf photochemische

Reaktionen bei der endogenen Synthese zurückzuführen ist. Ab einer Wellenlänge von > 300 nm entstehen in der Haut vermehrt Photoisomere und Toxisterole [Holick et al. 1981, Webb et al. 1989]. In Folge dessen vermindert sich auch die Ausbeute an Vitamin D₃ [Tian et al. 1993]. Da die verwendeten UVB-Lampen (**Studie 1** und **Studie 2**) Licht im Wellenlängenbereich von 280 - 340 nm emittieren, wird somit die Bildung von Vitamin D₃ limitiert. Mit steigenden UVB-Expositionszeiten werden überdies auch bereits entstandene Vitamin D₃-Metaboliten in Photoisomere überführt. Auch bei langen UVB-Expositionszeiten wird somit gewährleistet, dass der Vitamin D-Gehalt im Ei nicht unermesslich ansteigt. Dies ist ein bedeutender Aspekt dieses Verfahrens, da so ein optimaler Schutz der Verbraucher vor Vitamin D-Intoxikationen geboten ist.

Es ist bemerkenswert, dass sich der Vitamin D-Gehalt im Ei durch die UVB-Exposition exzellent steigern lässt, während der Vitamin D-Status der Hennen, bei guter alimentärer Versorgung, nicht verändert wird (**Studie 2**). Das kutan gebildete Vitamin D₃ scheint überwiegend in das Eigelb transferiert zu werden und unterliegt nur marginal der hepatischen Hydroxylierung. Auch beim Huhn werden die 25-Hydroxylasen nicht spezifisch reguliert [Bar 2008]. Daher ist anzunehmen, dass die endogenen Vitamin D₃-Metaboliten direkt in das Ei sezerniert werden, ohne zuvor die Leber zu passieren. Dennoch war die UVB-Exposition der Hennen mit einem leichten Anstieg der 25(OH)D₃-Gehalte im Eigelb assoziiert. Während man früher davon ausging, dass 25-Hydroxylasen ausschließlich in der Leber vorkommen, ist heute bekannt, dass auch in der Haut 25(OH)D₃ aus Vitamin D₃ gebildet werden kann [Lehmann et al. 1999, Schuessler et al. 2001]. In den unbefiederten Ständern der UVB-exponierten Hennen konnte daher ein erhöhter Gehalt an 25(OH)D₃ nachgewiesen werden (**Studie 2**). Womöglich stammt das 25(OH)D₃ im Ei daher auch direkt aus der Haut der Legehennen. Der Transfer von Vitamin D in den Eifollikel findet bereits vor der Ovulation statt [Fraser & Emtage 1976]. Während Cholesterol und weitere Lipide lipoproteinvermittelt in den reifenden Follikel aufgenommen werden, erfolgt der Einbau von Vitamin D proteingebunden [Fraser & Emtage 1976, Elkin et al. 1999, Bujo et al. 1997]. Vitamin D₃ und 25(OH)D₃ werden beim Huhn durch zwei verschiedene Transportproteine in der Blutbahn befördert [Edelstein et al. 1973]. Dabei wird ausschließlich das Vitamin D₃-bindende Protein im Blutkreislauf an Dotterproteine gebunden und gelangt so in den Eifollikel [Fraser & Emtage 1976]. Das 25(OH)D₃-bindende Protein wird nicht in den Follikel transferiert. Dennoch konnte in Folge der UVB-Exposition ein leichter Anstieg der 25(OH)D₃-Gehalte im Ei beobachtet werden (**Studie 2**). Hohe Konzentrationen an 25(OH)D₃ können eine Verdrängung von Vitamin D₃ von dem spezifischen Transportprotein induzieren, sodass auch geringe Mengen an 25(OH)D₃ in das Ei aufgenommen werden [Fraser & Emtage 1976].

Studie 2 verdeutlichte auch, dass der maximale Vitamin D-Gehalt im Ei nach dreiwöchiger UVB-Exposition erreicht war. Bei fortlaufender Exposition mit UVB-Licht konnte keine weitere Erhöhung des Vitamin D-Gehaltes erzielt werden (**Studie 2**). Diese Befunde decken sich mit den hierzu bekannten Fütterungsexperimenten, welche einen maximalen Vitamin D-Gehalt im Ei spätestens nach drei Wochen oraler Zufuhr verzeichneten [Mattila et al. 1999, Mattila et al. 2003, Yao et al. 2013, Browning & Cowieson 2014]. Der Großteil an Vitamin D und anderen Nährstoffen wird bereits eine Woche vor der Ovulation in das reifende Ei transferiert [Fraser & Emtage 1976]. Der Vitamin D-Gehalt eines gelegten Eies steigt daher frühestens eine Woche nach Beginn einer Behandlung an. Nach zwei bis drei Behandlungswochen ist ein konstanter Vitamin D-Gehalt im Ei erreicht, der das verfügbare Angebot an Vitamin D-Metaboliten widerspiegelt.

Die Intensität der UVB-emittierenden Lampen (**Studie 1** und **Studie 2**) entspricht der UVB-Strahlungsintensität eines klaren Sommertages in Deutschland. Legehennen in Freilandhaltung können dementsprechend eine ähnliche UVB-Exposition erfahren. Im Rahmen der **Studie 3** sollte daher geprüft werden, ob die Freilandhaltung von Legehennen einen Beitrag zur Bio-Addition leisten kann. Die Tiere wurden für neun Stunden pro Tag im Freien gehalten und waren so dem natürlichen Tageslichtspektrum ausgesetzt. Dabei konnte eine Erhöhung des Vitamin D-Gehaltes in den Eiern belegt werden. Dieser war in den Eiern der Freilandhennen dreifach höher als in den Kontrollen in Bodenhaltung (**Studie 3**). Somit könnte die Freilandhaltung von Legehennen einen wichtigen Beitrag zur Bio-Addition leisten. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass eine effiziente Vitamin D-Anreicherung lediglich in den Sommermonaten erzielt werden kann. Von Oktober bis März ist die endogene Vitamin D-Synthese in Deutschland, bedingt durch den geringen Sonneneinfallswinkel, nicht möglich [Webb et al. 1988, Engels et al. 2005]. Zudem hat die Gestaltung der Freiflächen einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg des Verfahrens. So muss gesichert sein, dass die Hennen ausreichend dem Sonnenlicht exponiert sind. Eine Untersuchung von kommerziell erworbenen Hühnereiern zeigte, dass Eier aus Freiland- und Bodenhaltung sich nicht in ihrem Vitamin D-Gehalt unterscheiden (**Studie 3**). Scheinbar waren diese Legehennen nicht ausreichend dem Sonnenlicht exponiert, was vermutlich auf die Haltungsbedingungen zurückzuführen ist. In der kommerziellen Freilandhaltung verlässt ein Großteil der Hühner nur äußerst selten den Stall [Dawkins et al. 2003]. Beobachtungen zufolge wird das Freigelände deutlich besser akzeptiert, wenn ausreichend Unterstellmöglichkeiten für die Tiere geboten werden [Bubier et al. 1998, Dawkins et al. 2003]. Ferner muss gesichert sein, dass den Hennen auch außerhalb des Stalls genügend Futter und Wasser zur Verfügung steht

[Bubier et al. 1998]. Diese Aspekte wurden im Rahmen der **Studie 3** berücksichtigt und ermöglichten so eine effektive Anreicherung mit Vitamin D im Ei.

Eine Besonderheit der UVB-induzierten Anreicherung von Vitamin D besteht darin, dass auch eine Erhöhung der 25(OH)D₃-Gehalte im Ei erzielt werden kann (**Studie 1**, **Studie 2** und **Studie 3**). In Relation zu Vitamin D₃ fällt dieser Anstieg zwar verhältnismäßig gering aus, bekommt im Hinblick auf die fünffach erhöhte biologische Aktivität von 25(OH)D₃ jedoch eine große Bedeutung [Cashman 2012]. Herkömmliche Anreicherungsstrategien beschränken sich hingegen gänzlich auf den Zusatz von Vitamin D₃ bzw. Vitamin D₂ [Calvo & Whiting 2013]. Eine weitere Strategie sieht vor, den Vitamin D-Gehalt von Brot und Backwaren durch Verwendung UVB-bestrahlter Hefen zu erhöhen [European Food Safety Authority 2014]. Hierbei wird Ergosterol effektiv zu Vitamin D₂ umgesetzt, jedoch entstehen dabei keine hydroxylierten Vitamin D-Metaboliten. Die Bildung von 25(OH)D₃ ist nur im Organismus, unter Beteiligung der intrazellulären 25-Hydroxylasen, möglich. Im Vergleich zu gängigen Anreicherungsverfahren bietet die UVB-Exposition von Legehennen daher entscheidende Vorteile.

Vitamin D wird, aufgrund seiner fettlöslichen Eigenschaften, fast ausschließlich im Eigelb angereichert (**Studie 1**). Daher können die quantifizierten Mengen zur Berechnung des Vitamin D-Gehaltes im gesamten Ei zugrunde gelegt werden. Nimmt man für alle Versuchseier ein Eigelbgewicht von 7,70 g TM an, so lassen sich die enthaltenen Mengen an Vitamin D näherungsweise vergleichen. Berechnet werden diese aus der Summe von Vitamin D₃ und 25(OH)D₃, wobei die höhere biologische Aktivität von 25(OH)D₃ durch Multiplikation mit dem Faktor fünf berücksichtigt wird [Cashman 2012]. Durch 300-minütige UVB-Exposition der Legehennen konnten Eier mit einem Gehalt von 3,88 µg Vitamin D erzeugt werden (**Studie 2**). Die nicht-exponierten Tiere legten hingegen Eier mit einer Gesamtmenge von 1,20 µg Vitamin D-Metaboliten (**Studie 2**). Wurden die Tiere für neun Stunden pro Tag im Freiland gehalten, betrug der Vitamin D-Gehalt 3,08 µg (**Studie 3**). Der Verzehr eines Eies würde den von der DGE empfohlenen Vitamin D-Bedarf bei 300-minütiger UVB-Exposition der Hennen zu 20 % bzw. 15 % bei konventioneller Freilandhaltung decken. Die kommerziell erworbenen Eier aus Bodenhaltung enthielten 1,44 µg Vitamin D (**Studie 3**) und erfüllen nur 7 % der empfohlenen Tageszufuhr.

4.2 Sicherheitsaspekte einer Ultraviolettlicht-Exposition zur Steigerung des Vitamin D-Gehaltes

Alimentäre Vitamin D-Überdosierung kann eine Hypervitaminose verursachen. Obwohl die Prävalenz für eine unzureichende Versorgung unverkennbar höher ist [Hathcock et al. 2007, Koul et al. 2011], sind die akuten Folgen einer Hypervitaminose deutlich schwerwiegender. Symptomatisch äußert sich die Hypervitaminose durch Anorexie, Erbrechen, Gewichtsverlust, Polyurie, allgemeine Schwäche und Müdigkeit [Koul et al. 2011, Pandita et al. 2012]. Bedingt durch erhöhte Absorption von Calcium im Darm sowie verstärkte Freisetzung aus den Knochen kommt es ferner zur Entstehung von Osteoporose, Einlagerung von Calcium in den Weichgeweben und Funktionsstörungen der Niere [Suda et al. 2003, Jones 2008, Pandita et al. 2011]. Das *Tolerable Upper Intake Level* wurde für Erwachsene mit 100 µg Vitamin D pro Tag von der European Food Safety Authority [2012] definiert. Die Aufnahme von Vitamin D gilt bis zu diesen Mengen als unbedenklich. Aufgrund des geringen Sicherheitsabstandes zwischen empfohlener Tageszufuhr von 20 µg [DGE 2013] und *Tolerable Upper Intake Level* wurde die Fortifizierung von Lebensmitteln bisher stark limitiert. Untersuchungen belegen jedoch, dass die Anreicherung gängiger Lebensmittel mit einer Verbesserung des Vitamin D-Status assoziiert ist [O'Donnell et al. 2008, Brown et al. 2013]. In einigen Staaten, darunter Irland, ist der Zusatz von Vitamin D zu einer Vielzahl verschiedener Lebensmittel gestattet [Hannon et al. 2007]. Im Rahmen einer kürzlich publizierten Untersuchung wurde jedoch bei 4,1 % einer irischen Studienpopulation (N = 10.181) eine Hypervitaminose diagnostiziert [Kilbane et al. 2014].

Die UVB-induzierte Erhöhung des Vitamin D-Gehaltes im Ei stellt eine sehr gute Übereinkunft zwischen der Forderung nach höheren, lebensmittelbasierenden Aufnahmen und der Gewährleistung ausreichender Verbrauchersicherheit dar. Der Verzehr eines Eies erfüllt maximal 20 % des täglichen Bedarfs (**Studie 2**). Damit wird ein wichtiger Beitrag zur Vitamin D-Versorgung geleistet ohne die komplette empfohlene Tageszufuhr zu decken. Anreicherungsverfahren, welche eine Bedarfsdeckung über ein einziges Lebensmittel vorsehen, würden mit einem erhöhten Risiko für Vitamin D-Intoxikationen einhergehen [Brown et al. 2013]. Bei der UVB-induzierten Anreicherung von Pilzen sind bereits kürzeste Expositionszeiten mit einem Vitamin D-Gehalt von 12,6 µg/g TM assoziiert [Kalaras et al. 2012]. Der Verzehr einer Pilzmahlzeit könnte dabei sogar zur Überschreitung des *Tolerable Upper Intake Level* führen. Die UVB-Exposition von Legehennen geht hingegen nicht mit einer unkontrollierten Anreicherung von Vitamin D einher (**Studie 2**). Bei herkömmlichen Anreicherungsverfahren kann es durch Fehler im

Produktionsprozess zur exzessiven Anreicherung von Vitamin D im Lebensmittel kommen. So wurde in den USA, in Folge des Konsums fehlerhaft angereicherter Milch, das vermehrte Auftreten von Hypervitaminosen beobachtet [Jacobus et al. 1992, Blank et al. 1995]. Daher sind intensive Kontrollen während der Produktion solcher Lebensmittel unabdingbar. Ein weiteres Problem herkömmlicher Anreicherungsverfahren besteht darin, dass sich die zugesetzten Metaboliten nicht homogen in den Lebensmitteln verteilen. So kommt es während der Herstellung von angereichertem Käse zur vermehrten Akkumulation von Vitamin D im Zwischenprodukt Quark [Tippetts et al. 2012]. Um eine gezielte und homogene Verteilung in den Nahrungsmitteln zu gewährleisten, müssen für solche Anreicherungsstrategien deshalb aufwendige lebensmitteltechnologische Verfahren entwickelt werden [Haham et al. 2012, Tippetts et al. 2012].

Die UVB-induzierte Vitamin D-Anreicherung gewährt eine ausreichende Sicherheit für den Verbraucher. Doch auch für die Tiere wird das Risiko einer Hypervitaminose gegenüber der Verwendung hochdosierter Futterzusätze stark minimiert. Daher stellt die UVB-Exposition auch für die Erzeugung weiterer tierischer Produkte ein sicheres und vielversprechendes Verfahren dar. Untersuchungen der **Studie 1** ergaben, dass durch Exposition mit UVB-Licht eine Steigerung des Vitamin D-Gehaltes im Muskelfleisch induziert werden kann. Bedeutsam ist dies, da der Fleischverzehr in der Bundesrepublik relativ hoch ist [Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2013]. Da Fleisch und Fleischprodukte natürlicherweise geringe Mengen an Vitamin D enthalten [Schmid & Walther 2013], würde ein Großteil der Bevölkerung von solch einer Vitamin D-Anreicherung profitieren. Infolge der UVB-Exposition war der Gehalt an aktiven Vitamin D-Metaboliten im Muskelfleisch mit $1,57 \mu\text{g}/100 \text{g}$ zweifach höher als bei den nicht-exponierten Legehennen (**Studie 1**). In der Fleischerzeugung werden jedoch üblicherweise Broiler eingesetzt. Diese zeichnen sich durch einen deutlich höheren Anteil an Vitamin D-speicherndem Fettgewebe aus. Zudem findet bei Broilern keine Exkretion von Vitamin D-Metaboliten über das Ei statt. Insofern ist zu erwarten, dass durch UVB-Exposition von Broilern eine noch bessere Anreicherung im Fleisch möglich wäre. Zur endogenen Vitamin D-Synthese sind neben dem Geflügel zahlreiche weitere Tierarten fähig [Hidiroglou & Karpinski 1989, Ferguson et al. 2003, Dittmer & Thompson 2011]. Die Exposition weiterer Nutztiere mit UVB-Licht könnte dementsprechend einen wichtigen Beitrag für die Anreicherung tierischer Lebensmittel leisten. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass eine ausreichende Menge an kutanem 7-DHC zur Verfügung steht und überdies eine effektive Absorption der UV-Strahlen möglich ist. Hymoller et al. [2010] konnten belegen, dass auch in den mit Fell bedeckten Hautarealen der Kuh eine ausreichende Vitamin D-Synthese gewährleistet wird.

4.3 Limitationen der Ultraviolettlicht-Expositionsstudien

Die UVB-Exposition von Legehennen erwies sich als effektive Methode zur Bio-Addition von Vitamin D in Hühnereiern. Eine entscheidende Limitation der **Studie 1** und **Studie 2** stellt die Übertragbarkeit in die praktische Legehennenhaltung dar. Die Haltung von Legehennen zu Erwerbszwecken wird durch die Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung (TierSchNutzV) geregelt. Nach Wegfall des §13b TierSchNutzV zum 01.04.2012 ist die Käfighaltung in der BRD nicht mehr gestattet. Mittels Einzelhaltung konnte in den Versuchen eine optimale Exposition der Tiere gesichert werden. Die Implementierung von UVB-Lampen in Bodenhaltungen könnte eine verminderte Exposition einzelner Tiere zur Folge haben. Dies dürfte insbesondere daraus resultieren, dass die Hühnerställe eine hohe Besatzdichte aufweisen und die UVB-Strahlung nicht alle Tiere gleichmäßig erreicht. Die Effizienz der Vitamin D-Anreicherung lässt sich daher nicht vollkommen auf die Praxis projizieren. Dennoch ist eine sinnvolle Steigerung des Vitamin D-Gehaltes durch eine lampenbasierte UVB-Exposition zu erwarten. Im Gegensatz dazu ist für die **Studie 3** eine gute Übertragbarkeit in die Praxis gewährleistet. Eier aus Freilandhaltung können, insbesondere in den Sommermonaten, einen entscheidenden Beitrag zur Vitamin D-Versorgung der Bevölkerung leisten. Eine zusätzliche UVB-Exposition der Freilandhennen in den weniger sonnigen Monaten würde auch bei dieser Haltungsform eine konstante Anreicherung mit Vitamin D im Ei ermöglichen. Unter optimalen Bedingungen können Eier mit einem Vitamin D-Gehalt von 3,88 µg erzeugt werden, die bereits 20 % des täglichen Bedarfs decken. Legt man den Vitamin D-Gehalt eines kommerziellen Eies aus Freilandhaltung zugrunde, dann entspricht das einem Zugewinn von 2,58 µg pro Ei. Durch den regelmäßigen Verzehr solcher Eier würde sich die Vitamin D-Zufuhr für die Bevölkerung in Deutschland verdoppeln. Erhöht sich die Vitamin D-Aufnahme um 1 µg/d, so steigt der 25(OH)D₃-Plasmaspiegel immerhin um 2,32 nmol/l [O'Donnell et al. 2008, Brown et al. 2013]. Bei der deutschen Bevölkerung beträgt die Plasmakonzentration an 25(OH)D₃ im Mittel 45,0 nmol/l [Hintzpeter et al. 2008]. Wird die tatsächliche Menge an verzehrten Eiern in der BRD berücksichtigt, dann ergibt sich eine beachtliche Steigerung um 3,59 nmol/l bzw. 8 %.

4.4 Einfluss einer Ultraviolettlicht-Exposition auf die Qualität der Eischale, den Cholesterolgehalt der Eier sowie die Gesundheit der Legehennen

Die Mineralisierung der Eischale wird im Wesentlichen durch die Versorgung der Legehennen mit Vitamin D und Calcium gesichert [Roberts 2004]. Die Schalenqualität ist ein entscheidender Faktor in der konventionellen Eiproduktion, da eine intakte Schale das Ei vor Kontaminationen schützt. Ferner ist eine stabile Eischale für die Vermarktung von großer Bedeutung. Bekannt ist, dass eine gute Vitamin D-Versorgung die Calciumaufnahme aus dem Legehennenfutter steigert und die Mineralisierung der Schale begünstigt [Bar et al. 1999]. Bei hoher Vitamin D-Zulage im Legehennenfutter (75,0 µg/kg bzw. 62,5 µg/kg) bewirkte eine zusätzliche UVB-Exposition keine Verbesserung der Eischalendicke oder -stabilität (**Studie 1** und **Studie 2**). Die Beleuchtung der Hennen mit UVB-Licht hatte ferner keinen Einfluss auf die Bruchfestigkeit des Tibiotarsus (**Studie 1**). Dabei handelt es sich um einen medullären Knochen, dessen Mineralisierung ebenfalls von der verfügbaren Menge an Calcium abhängig ist [Cufadar et al. 2011]. Auch der Calciumgehalt des Tibiotarsus wurde durch die UVB-Exposition nicht verändert (unveröffentlichte Daten). Eine alimentäre Vitamin D-Zufuhr von mindestens 62,5 µg/kg scheint daher ausreichend, um eine effektive Calciumabsorption aus dem Futter zu gewährleisten, sodass eine zusätzliche UVB-Exposition keine Verbesserung der Schalenqualität oder Erhöhung der medullären Calciumreserven bewirkt. Kontrovers wird der Einfluss des Haltungssystems auf die Schalenqualität diskutiert. Während Mugnai et al. [2009] dem Haltungssystem keine Bedeutung zusprechen, beschreiben Minelli et al. [2007] eine verminderte Eischalenstabilität bei Tieren in Freilandhaltung. Einige Autoren beobachteten eine Verbesserung der Schalendicke oder -stabilität durch Haltung der Legehennen im Freiland [Mostert et al. 1995, Van Den Brand et al. 2004]. Eine Bewertung dieser unterschiedlichen Ergebnisse ist problematisch, da Angaben zur Futterzusammensetzung sowie Futteraufnahme in vielen Studien unzureichend sind. In **Studie 3** war die Haltung der Tiere im Freiland mit einer Erhöhung der Eischalendicke assoziiert. Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aus **Studie 1** und **Studie 2** scheint die Verbesserung der Schalenqualität jedoch nicht auf einer verstärkten UVB-Exposition der Tiere zu beruhen.

Da 7-DHC die gemeinsame Vorstufe von Vitamin D₃ und Cholesterol darstellt, wurde der Einfluss einer UVB-Exposition auf die Menge an Cholesterol im Ei untersucht. Es wäre denkbar, dass ein erhöhter Verbrauch von 7-DHC mit einer verminderten Bildung von Cholesterol einhergeht. In einem Experiment von Lietzow et al. [2012] wurde eine

Reduktion des Cholesterolgehaltes nach UVB-Exposition von Legehennen beobachtet. Herkömmliche Eier enthalten im Mittel 213 mg Cholesterol, weshalb ein verstärkter Eiverzehr mitunter sehr kritisch betrachtet wird [Assmann et al. 1999, Weggemans et al. 2001]. Jüngere Untersuchungen belegen zwar, dass ein Ei pro Tag nicht mit einem erhöhten Risiko für koronare Gefäßerkrankungen assoziiert ist [Hu et al. 1999, Rong et al. 2013], jedoch reagieren bis zu 25 % der Bevölkerung stärker auf hohe Mengen an Nahrungscholesterol [McNamara 2000]. Insbesondere diese Personengruppe würde von einem reduzierten Cholesterolgehalt im Hühnerei profitieren. Im Rahmen der **Studie 2** konnte allerdings keine Reduktion des Cholesterolgehaltes im Ei erzielt werden. Dies beruht vermutlich darauf, dass ein Großteil des Cholesterols im Ei aus der Leber stammt [Naber 1983]. Da die Exposition mit UVB-Licht wahrscheinlich keinen Einfluss auf den Sterolmetabolismus der Leber hatte, wurde auch der Transfer in das Ei nicht verändert.

4.5 Einfluss einer oralen 7-Dehydrocholesterol-Zufuhr auf den Vitamin D-Metabolismus

Der Gehalt an Vitamin D in Lebensmitteln ist für ein breites Spektrum an Produkten dokumentiert. Interessanterweise gibt es jedoch kaum Studien, welche die Menge an 7-DHC in tierischen Nahrungsmitteln erfassen. Eine umfangreiche Untersuchung verschiedener Speisefische ergab, dass sowohl fettarme als auch fettreiche Spezies große Mengen an 7-DHC enthalten [Ostermeyer & Schmidt 2006]. Im Verhältnis zu Vitamin D₃ war die Konzentration bei dieser Untersuchung in allen Proben deutlich höher. Im Rahmen der **Studie 2** und **Studie 3** wurde belegt, dass auch im Hühnerei 7-DHC zu weitaus größeren Anteilen als Vitamin D₃ enthalten ist. Seeburg [2014] zufolge enthalten überdies auch Milchprodukte, Fleisch, Butter und Backwaren erhebliche Mengen des Provitamins.

Dementsprechend ist zu erwarten, dass bei ausgewogener Ernährungsweise ein erheblicher Anteil an 7-DHC über tierische Produkte vom Menschen aufgenommen wird. Dennoch fehlen bisher Kenntnisse über mögliche Interaktionen zwischen 7-DHC und Vitamin D. Die Auswirkung einer oralen 7-DHC-Zufuhr auf den Vitamin D-Metabolismus wurde daher im Rahmen der **Studie 4** untersucht. Durch alimentäre Zufuhr von 7-DHC konnte, im Vergleich zur 7-DHC-freien Diät, ein vierfach höherer Gehalt an Vitamin D₃ in der Leber detektiert werden. Ähnliche Effekte wurden im perirenal Fettgewebe beobachtet. Lediglich in Folge oraler 7-DHC-Zufuhr konnte Vitamin D₃ im Fettgewebe der Tiere nachgewiesen werden (**Studie 4**). Die Intervention mit 7-DHC bewirkte hingegen

keine Veränderung des 7-DHC-Gehaltes in selbigen Geweben (**Studie 4**), was eine rasche Metabolisierung zum Cholesterol vermuten lässt. Diese Beobachtung machte auch Tsugawa et al. [1992] an Ratten nach Applikation einer oralen Dosis 7-DHC.

Die orale 7-DHC-Aufnahme scheint den Vitamin D-Metabolismus, auf bisher unbekannte Weise, erheblich zu beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der zugrunde liegende Mechanismus allerdings nicht aufgeklärt werden. Auch in der Literatur wurden vergleichbare Erkenntnisse bisher nicht beschrieben, sodass gesicherte Erklärungen zur 7-DHC-anhängigen Vitamin D₃-Anreicherung fehlen.

Eine Erhöhung der Vitamin D₃-Gehalte könnte auf eine verminderte Hydroxylierung in den Hepatozyten hindeuten. Das mikrosomale Enzym CYP2R1 ist maßgeblich für die Metabolisierung des Vitamin D₃ verantwortlich, wohingegen Uneinigkeit über eine funktionelle Beteiligung der mitochondrialen Hydroxylase CYP27A1 besteht [Zhu et al. 2013]. Die Zufuhr von alimentärem 7-DHC hatte jedoch keine Auswirkung auf die relative mRNA-Expression der gleichnamig codierenden Gene (**Studie 4**). Eine Regulierung der Hydroxylasen auf Transkriptionsebene kann somit ausgeschlossen werden. Zu bedenken gilt es dabei jedoch, dass CYP2R1 und CYP27A1 auch posttranskriptionell reguliert wird. Eine reduzierte Vitamin D₃-Hydroxylierung hätte niedrigere 25(OH)D₃-Spiegel zur Folge. Im Rahmen einer 7-DHC-Zufuhr konnte jedoch keine Veränderung der Plasmagehalte festgestellt werden (**Studie 4**). Die Daten lassen vermuten, dass die signifikante Erhöhung des Vitamin D₃-Gehaltes nicht durch eine Regulation der 25-Hydroxylasen zustande kommt.

Eine weitere Überlegung basierte auf der Annahme, Vitamin D₃ könne durch eine vermehrte Aufnahme in die Hepatozyten akkumulieren. Alimentär zugeführtes Vitamin D wird nach Absorption im Gastrointestinaltrakt in Chylomikronen verpackt, die im Blut sukzessive durch Lipasen zu Chylomikronen-remnants abgebaut werden. Diese können aufgrund ihrer Apolipoprotein-Zusammensetzung in die Hepatozyten aufgenommen werden [Havel 1998]. Vermittelt wird die Aufnahme in die Zelle durch LDLR sowie LRP1 [Cooper 1997]. Die Untersuchung der relativen mRNA-Expression ergab jedoch, dass 7-DHC keine Auswirkung auf die Transkription beider Gene hat (**Studie 4**). Eine vermehrte Aufnahme von Vitamin D₃ in die Zielzellen ist somit unwahrscheinlich.

7-DHC ist ein Intermediat der Cholesterolsynthese und wird im Organismus endogen gebildet. Bezogen auf die hohen Mengen an quantifiziertem 7-DHC im perirenenalen Fettgewebe, im Lebergewebe sowie im Plasma der Kontrolltiere war der Anteil an zugeführtem 7-DHC (12 µg/d) in der Interventionsgruppe vergleichsweise gering

(**Studie 4**). Daher erscheint es besonders kontrovers, dass oral verabreichtes 7-DHC derartige Auswirkungen auf den Vitamin D-Stoffwechsel hat. Möglicherweise beeinflusst 7-DHC bereits im Gastrointestinaltrakt die Bioverfügbarkeit des alimentären Vitamin D₃ und bewirkt eine gesteigerte Absorption in die Enterozyten. Dies könnte die unterschiedliche Wirkung zwischen endogenem und alimentärem 7-DHC erklären. Vitamin D wird im Dünndarm resorbiert. Beteiligt sind die Cholesteroltransporter NPC1L1, CD36 und SR-BI sowie passive Diffusionsprozesse [Reboul et al. 2011]. Die Expression der Transportproteine wird üblicherweise über Kernrezeptoren reguliert [Levy et al. 2007]. NPC1L1 und SB-BI unterliegen dabei der Regulation durch LXR [Hu et al. 2010a], welcher nach cytochrom-P450-abhängiger Transformation von 7-DHC aktiviert werden kann [Endo-Umeda et al. 2014]. Im Gastrointestinaltrakt wird die Expression von NPC1L1 nach Aktivierung von LXR vermindert [Duval et al. 2006, Alvaro et al. 2010]. Folglich würde dies mit einer Verminderung der Bioverfügbarkeit von Vitamin D einhergehen. Stattdessen könnte jedoch eine Expressionssteigerung des SR-BI im Enterozyten zur erhöhten Vitamin D₃-Aufnahme beitragen. In-vitro wurde bisweilen eine LXR-abhängige Expressionssteigerung von SR-BI in Schaumzellen [Hu et al. 2010b] und Hepatozyten [Malerod et al. 2002] nachgewiesen. Ob die Regulation durch LXR auch im Duodenum eine Rolle spielt, ist bisher nicht bekannt. Möglicherweise fungiert 7-DHC jedoch indirekt als Transkriptionsfaktor und vermag somit die Absorption von Vitamin D aus dem Gastrointestinaltrakt zu steigern.

Vitamin D wird, aufgrund seiner unpolaren Eigenschaften, bevorzugt in Fettzellen gespeichert [Wortsman et al. 2000, Blum et al. 2008]. Insbesondere in den sonnenarmen Monaten, die mit einer stark eingeschränkten kutanen Synthese assoziiert sind, profitiert der Organismus von einem nennenswerten Reservoir an Vitamin D [Rosenstreich et al. 1971]. Basierend auf den vorliegenden Daten wäre es denkbar, dass die Aufnahme 7-DHC-reicher Lebensmittel bei zugleich adäquater Vitamin D-Versorgung eine Erhöhung der Depots bewirkt. Somit könnte die Lebensmittelauswahl, im Hinblick auf den Gehalt an 7-DHC, einen entscheidenden Einfluss auf den Vitamin D-Status während der defizitären Wintermonate haben.

Besondere Bedeutung könnte die 7-DHC-induzierte Erhöhung des Gehaltes an Vitamin D₃ auch für die Bio-Addition erlangen. Entscheidend ist hierbei, ob dieser Effekt auf weitere Gewebe reproduzierbar ist. Eine Steigerung des Vitamin D-Gehaltes im Muskel, welcher neuen Hinweisen zufolge ebenso als Speicher fungieren könnte [Abboud et al. 2013], würde im Rahmen der Fleischerzeugung einen wichtigen Beitrag zur Anreicherung leisten. Theoretisch wäre auch eine Vitamin D-Anreicherung im Hühnerei

durch Zusatz von 7-DHC zum Legehennenfutter denkbar. Da es sich hierbei um grundlegend neue Erkenntnisse handelt, bedürfte ein solches Verfahren zur Bio-Addition umfangreicher Untersuchungen. Neben der Aufklärung zugrundeliegender Mechanismen wäre eine Abschätzung möglicher pathophysiologischer Konsequenzen notwendig.

4.6 Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier tierexperimentelle Studien durchgeführt. Anhand der Resultate konnten die Fragestellungen überwiegend vollständig und umfassend beantwortet werden:

- I) **Inwieweit lässt sich der Vitamin D-Gehalt im Hühnerei durch eine UVB-Exposition von Legehennen erhöhen?** Der Vitamin D-Gehalt im Hühnerei konnte durch UVB-Exposition von Legehennen gesteigert werden. Eine besonders effektive Anreicherung gelang bei zusätzlicher Zufuhr eines Vitamin D-haltigen Futters. Die maximale Konzentration wurde durch 300-minütige UVB-Exposition der Hennen erzielt. Unter Berücksichtigung der biologischen Aktivität beträgt der Vitamin D-Gehalt eines Eies optimalerweise 3,88 µg. Da es sich bei der UVB-induzierten Vitamin D-Synthese um einen sättigbaren Prozess handelt, ist dieses Verfahren im Hinblick auf den Schutz der Verbraucher positiv zu bewerten.
- II) **Hat eine Exposition mit UVB-Licht Einfluss auf den Vitamin D-Gehalt im Muskelfleisch?** Der Vitamin D-Gehalt im Muskel konnte durch UVB-Exposition der Hennen gesteigert werden. Es wäre denkbar, dieses Verfahren zur Erhöhung des Vitamin D-Gehaltes weiterer tierischer Lebensmitteln zu nutzen.
- III) **Welchen Einfluss hat das Haltungssystem der Legehennen auf den Vitamin D-Gehalt im Hühnerei?** Es konnte belegt werden, dass Eier aus Freilandhaltung im Sommer einen höheren Vitamin D-Gehalt aufweisen als Eier aus Bodenhaltung. Um eine ausreichende Sonnenlichtexposition der Hennen gewährleisten zu können, scheinen jedoch besondere Anforderungen an die Gestaltung des Freigeländes zu bestehen.
- IV) **Ist eine UVB-Exposition von Legehennen mit einer Verbesserung der Eischalenqualität assoziiert?** Die UVB-Exposition der Hennen ging nicht mit einer Steigerung der Eischalenqualität einher. Vermutlich konnte bereits durch oral zugeführtes Vitamin D eine effektive Verwertung des alimentären Calcium gesichert werden.
- V) **Ergeben sich durch die UVB-Exposition gesundheitliche Folgen für die Legehenne?** Anhand der untersuchten Parameter kann ein gesundheitlicher

Nutzen bzw. eine gesundheitliche Gefährdung der Tiere durch die UVB-Exposition ausgeschlossen werden.

- VI) Sinkt der Cholesterolgehalt im Hühnerei infolge einer UVB-Exposition der Hennen?** Die Bio-Addition von Vitamin D ist nicht mit einer Reduktion des Cholesterolgehaltes im Ei assoziiert.
- VII) Beeinflusst eine alimentäre Zufuhr von 7-DHC die Bioverfügbarkeit von Vitamin D?** Bei oraler Zufuhr scheint eine Interaktion zwischen 7-DHC und Vitamin D zu bestehen, die mit einer Erhöhung der Vitamin D₃-Gehalte in der Leber und im Fettgewebe assoziiert ist. Ob dieser Effekt tatsächlich auf einer Steigerung der Bioverfügbarkeit von Vitamin D durch 7-DHC beruht, bleibt jedoch ungeklärt.

5 Zusammenfassung

Die Versorgung mit Vitamin D ist weltweit unzureichend. Schätzungen zufolge weisen mehr als 50 % der deutschen Bevölkerung einen Vitamin D-Mangel auf. Neben ungenügender Sonnenlichtexposition ist dies insbesondere auf eine geringe alimentäre Vitamin D-Aufnahme zurückzuführen. Um den Vitamin D-Bedarf zu decken, empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) eine tägliche Zufuhr von 20 µg. Da der Vitamin D-Gehalt in vielen Lebensmitteln jedoch äußerst gering ist, werden im Mittel weniger als 3,0 µg pro Tag verzehrt. Dennoch wird bei der Anreicherung von Nahrungsmitteln sehr restriktiv verfahren, um die Verbraucher vor schwerwiegenden Vitamin D-Intoxikationen zu schützen. Eine sinnvolle Alternative zu herkömmlichen Anreicherungsstrategien stellen Bio-Addition-Verfahren dar. Diese ermöglichen eine gezielte Steigerung des Nährstoffgehaltes bereits während der Primärproduktion. Basierend auf diesem Konzept sollte ein Verfahren zur Anreicherung von Vitamin D im Hühnerei entwickelt werden.

Ultraviolettes (UV) Licht induziert, sowohl beim Menschen als auch bei Nutztieren, die endogene Vitamin D-Synthese aus dem Provitamin 7-Dehydrocholesterol (7-DHC). Die grundlegende Idee beruhte daher auf der Annahme, dass eine UV-Licht-Exposition von Legehennen zur Verbesserung des Vitamin D-Status führt und mit einer Steigerung des Vitamin D-Gehaltes im Ei assoziiert ist. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass 7-DHC sehr unterschiedlich auf der Körperoberfläche der Henne verteilt ist. Besonders hoch waren die 7-DHC-Gehalte in der unbefiederten Ständerhaut. Um eine effektive Vitamin D-Synthese zu gewährleisten, wurden deshalb UVB-Lampen im Bereich der Ständer positioniert. Da der Anteil an Vitamin D im Legehennenfutter einen bedeutenden Einfluss auf den Vitamin D-Gehalt der Eier hat, wurde zunächst untersucht, welchen zusätzlichen Nutzen eine Exposition mit UVB-Licht leisten kann. Die Tiere erhielten eine praxisrelevante Vitamin D-Menge von 75 µg/kg Futter und wurden überdies für 180 min/d mit UVB-Licht bestrahlt. Wurden die Tiere ausschließlich alimentär mit Vitamin D versorgt, so betrug der Vitamin D-Gehalt im Eigelb 7,90 µg/100 g Trockenmasse (TM). Im Vergleich dazu wurde durch zusätzliche UVB-Exposition ein Gehalt von 36,0 µg/100 g TM erzielt. Da die UVB-Exposition von Hennen offensichtlich ein effizientes Verfahren zur Anreicherung von Vitamin D darstellt, wurde eine nähere Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung vorgenommen. Anhand dessen sollte abgeschätzt werden, inwieweit eine Steigerung des Vitamin D-Gehaltes möglich ist. Dies ist auch deshalb von Bedeutung, da ein Hühnerei maßgeblich zur besseren Versorgung beitragen soll, ohne dabei den gesamten Tagesbedarf an Vitamin D zu decken. Unter Zufuhr eines kommerziellen Legehennenfutters wurden die Tiere mit steigenden UVB-

Expositionsdauern behandelt. Interessanterweise waren auch kurze UVB-Expositionen mit einem deutlichen Anstieg des Vitamin D-Gehaltes assoziiert. So gelang bereits durch 30 min/d eine Verdreifachung der Vitamin D-Menge. Bei 300-minütiger Exposition wurde eine nahezu vollständige Sättigung der Anreicherung beobachtet. Der Vitamin D-Gehalt betrug dabei 32,0 µg/100 g TM. Expositionszeiten von mehr als 300 min/d würden nur noch einen minimalen Mehrwert zur Vitamin D-Anreicherung im Ei bringen. Ein großer Anteil der konventionell erzeugten Hühnereier stammt von Legehennen aus Freilandhaltungen. Unter dem Einfluss natürlicher Sonnenstrahlen wäre zu erwarten, dass diese in den Sommermonaten einen höheren Gehalt an Vitamin D aufweisen. Eine Untersuchung kommerziell erworbener Hühnereier ergab jedoch keinen Unterschied zwischen den Eiern aus Freilandhaltung und Bodenhaltung. Ob die Haltungform der Tiere tatsächlich keinen Einfluss auf den Vitamin D-Gehalt hat, wurde in einem weiteren Versuch geprüft. Dabei zeigte sich, dass die Eier aus Freilandhaltung einen dreifach höheren Gehalt an Vitamin D aufweisen können. Dies scheint jedoch maßgeblich von einer ausreichenden Sonnenlichtexposition abhängig zu sein. Prinzipiell kann die Freilandhaltung von Legehennen dennoch einen wichtigen Beitrag zur Vitamin D-Anreicherung von Hühnereiern leisten. Insgesamt erwies sich die UV-Licht-Exposition von Legehennen als eine sehr effektive und sichere Methode, um Hühnereier mit Vitamin D anzureichern. Unter optimalen Bedingungen können Eier mit einem Vitamin D-Gehalt von 3,88 µg erzeugt werden, die bereits 20 % des täglichen Bedarfs decken. Legt man den Vitamin D-Gehalt eines kommerziellen Eies aus Freilandhaltung zugrunde, dann entspricht das einem Zugewinn von 2,58 µg pro Ei. Die durchschnittliche Vitamin D-Zufuhr der Bevölkerung würde sich durch den Verzehr eines angereicherten Eies sogar verdoppeln.

Für die Versorgung der Bevölkerung ist nicht allein der Vitamin D-Gehalt des Nahrungsmittels entscheidend. Auch die Bioverfügbarkeit des Nährstoffs muss hierbei berücksichtigt werden. 7-DHC ist ein Bestandteil von Hühnereiern sowie weiteren tierischen Lebensmitteln und wird folglich vom Menschen über die Nahrung aufgenommen. Bisweilen ist nicht bekannt, ob und inwieweit oral zugeführtes 7-DHC die Bioverfügbarkeit von Vitamin D beeinflusst. Diese Fragestellung wurde anhand einer Studie an Mäusen untersucht. Die Menge von 7-DHC und Vitamin D wurde an das mengenmäßige Verhältnis im Hühnerei angepasst. Gegenüber einer 7-DHC-freien Ernährung wurde unter Zufuhr von 7-DHC eine deutliche Erhöhung der Vitamin D₃-Gehalte in der Leber und im Fettgewebe beobachtet. Die Konzentration an zirkulierendem 25-Hydroxy-Vitamin D₃ wurde jedoch nicht beeinflusst. Dies ist kontrovers, da die hepatische Hydroxylierung keiner spezifischen Regulation unterworfen ist, sodass dieser Metabolit als idealer Marker für die Vitamin D-Versorgung erachtet wird. Dennoch scheint

oral zugeführtes 7-DHC auf bisher unbekannte Weise den Vitamin D-Metabolismus zu beeinflussen.

6 Summary

Vitamin D deficiency is a global health problem. It is suggested that more than 50 % of German adults suffer from vitamin D insufficiency due to low sun exposure and inadequate nutritional supply. The German Nutrition Society recommends a daily intake of 20 µg to meet the required amount. Since natural vitamin D content of most foods is very low, actual vitamin D intake is lower than 3 µg per day. Nevertheless, the fortification of foodstuff is highly regulated by the German legislation to prevent vitamin D intoxication. A novel approach to enhance nutritional value of regularly consumed foods is bio-addition. More precisely, bio-addition facilitates an increase of specific nutrients in foods originating from animals and plants during their primary production. A novel procedure was developed to increase the vitamin D content in chicken eggs based on the concept of bio-addition.

Vitamin D is endogenously formed from the provitamin 7-dehydrocholesterol (7-DHC) depending on ultraviolet (UV) light exposure in both human and livestock. Thus, it was assumed that an UV exposure of laying hens is capable to enhance vitamin D status of the chick and might be associated with an increased transfer of vitamin D to egg yolk. It should be taken into account that 7-DHC is not evenly distributed through the hen's body. Remarkably high 7-DHC levels were found in the unfeathered leg skin. Therefore, UV lamps were placed in front of the animals to ensure an irradiation of the legs. As it was shown that the vitamin D content of feed highly affects the amount of vitamin D transferred to egg yolk, the additional benefit of UV exposure was evaluated. Hens received a feed containing 75µg/kg vitamin D and were UV exposed for 180 min/d. Vitamin D content of egg yolk from non-exposed laying hens was 7.90 µg/100 g dry matter (DM) compared to 36,0 µg/100 g DM in egg yolk from exposed hens. As UV exposure of laying hens seems offer a promising method to add nutritional value to chicken eggs, the dose-response relationship was examined more intensively in order to determine the highest possible vitamin D amount. This provides an important information as one fortified chicken egg should considerably contribute to vitamin D supply without meeting the total requirements. To this end, hens were fed a standard layer diet and subjected to UV light with increasing exposure times. Interestingly, even short exposure times were associated with a remarkable increase of vitamin D in egg yolk. Treating hens with UV light for 30 min/d lead to a threefold increase of vitamin D metabolites in analyzed egg samples. The almost highest possible vitamin D amount was achieved when laying hens were exposed to UV light for 300 min/d resulting in an egg yolk content of 32.0 µg/100 g DM. Consequently, irradiation times beyond 300 min/d would not contribute significantly to improve the egg value. A considerable amount of commercial chicken eggs originate from free-range

farms. It might be expected that free-range eggs contain high amounts of vitamin D in summer as hens are exposed to natural sunlight, but an investigation of commercial eggs from local farms revealed that free-range and barn eggs were not different. An experiment was conducted to examine the impact of the farming system on egg vitamin D content. Contrary to the observations made in commercial eggs, free-range farming was associated with threefold higher vitamin D contents compared to those eggs from barn farming. Therefore, free-range farming of hens could significantly contribute to egg fortification in summer. It should be considered that this effect eminently depends on weather conditions and, at least, behavior of the hen. In conclusion, exposing laying hens to UV light provides an efficient and safe method to fortify eggs with vitamin D. One egg contains up to 3.88 µg vitamin D and might contribute to fulfill 20 % of the daily requirements. Such an egg has an additional vitamin D value of 2.58 µg compared to one commercial free-range egg. Actually, consuming one fortified egg would lead to a 100 % higher daily vitamin D intake for the German population.

The vitamin D content in foodstuff does not exclusively affect the supply in man and woman. Depending on nutritional compositions of the food source, nutrients show high variations in bioavailability. Chicken eggs as well as other foods of animal origin contain high amounts of 7-DHC. To date, it is unknown if orally administered 7-DHC affects the bioavailability of vitamin D. This issue was investigated within a mouse study. The amount of 7-DHC and vitamin D in the diet was adjusted to the ratio found in chicken eggs. When 7-DHC was orally supplied, the concentration of vitamin D₃ in liver and adipose tissue was significantly higher compared to controls. No difference between both groups was observed for the concentration of 25-hydroxy vitamin D₃ in serum. This observation is highly controversial as the hepatic hydroxylation is not regulated and, therefore, the hydroxylated vitamin D is considered to be the most reliable marker for assessing the vitamin D status. However, orally administered 7-DHC seems to affect the vitamin D metabolism in an unexpected manner.

Literaturverzeichnis

- ABBOUD M, Puglisi DA, Davies BN, Rybchyn M, Whitehead NP, Brock KE, Cole L, Gordon-Thomson C, Fraser DR, Mason RS: Evidence for a specific uptake and retention mechanism for 25-hydroxyvitamin D (25OHD) in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 2013; 159 (9): 3022 - 3030.
- ALVARO A, Rosales R, Masana L, Vallve J: Polyunsaturated fatty acids down-regulate in vitro expression of the key intestinal cholesterol absorption protein NPC1L1: no effect of monounsaturated nor saturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 2010; 21 (6): 518 - 525.
- ASSMANN G, Carmena R, Cullen P, Fruchart JC, Jossa F, Lewis B, Mancini M, Paoletti R: Coronary heart disease: reducing the risk: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease. *Circulation* 1999; 100 (18): 1930 - 1938.
- BALION C, Griffith LE, Strifler L, Henderson M, Patterson C, Heckman G, Llewellyn DJ, Raina P: Vitamin D, cognition, and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 2012; 79 (13): 1397 - 1405.
- BAR A: Calcium homeostasis and vitamin D metabolism and expression in strongly calcifying laying birds. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2008; 151 (4): 477 - 490.
- BAR A & NORMAN AW: Studies on the mode of action of calciferol. XXXIV. Relationship of the distribution of 25-hydroxyvitamin D₃ metabolites to gonadal activity and egg shell formation in the quail. *Endocrinology* 1981; 109 (3): 950 - 955.
- BAR A, Vax E, Striem S: Relationships among age, eggshell thickness and vitamin D metabolism and its expression in the laying hen. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1999; 123 (2): 147 - 154.
- BISCHOFF-FERRARI HA, Dietrich T, Orav EJ, Hu FB, Zhang Y, Karlson EW, Dawson-Hughes B: Higher 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with better lower-extremity function in both active and inactive persons aged ≥ 60 y. *Am J Clin Nutr* 2004; 80 (3): 752 - 758.
- BISCHOFF-FERRARI HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B: Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006; 84 (1): 18 - 28.
- BLANK S, Scanlon KS, Sinks TH, Lett S, Falk H: An outbreak of hypervitaminosis D associated with the overfortification of milk from a home-delivery dairy. *Am J Public Health* 1995; 85 (5): 656 - 659.
- BLUM M, Dolnikowski G, Seyoum E, Harris SS, Booth SL, Peterson J, Saltzman E, Dawson-Hughes B: Vitamin D₃ in fat tissue. *Endocrine* 2008; 33 (1): 90 - 94.

- BROWN J, Sandmann A, Ignatius A, Amling M, Barvencik F: New perspectives on vitamin D food fortification based on a modeling of 25(OH)D concentrations. *Nutr J* 2013; 12 (1): 151 - 162.
- BROWNING LC & COWIESON AJ: Vitamin D fortification of eggs for human health. *J Sci Food Agric* 2014; 94 (7): 1389 - 1396.
- BUBIER NE & BRADSHAW RH: Movement of flocks of laying hens in and out of the hen house in four free range systems. *Br Poult Sci* 1998; 39 (S1): 5 - 6.
- BUJO H, Hermann M, Lindstedt KA, Nimpf J, Schneider WJ: Low density lipoprotein receptor gene family members mediate yolk deposition. *J Nutr* 1997; 127 (S5): 801 - 804.
- BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT: Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten der Bundesrepublik Deutschland. *Landwirtschaftsverlag* 2013; Münster-Hiltrup, 57. Jahrgang.
- CALVO MS & WHITING SJ: Survey of current vitamin D food fortification practices in the United States and Canada. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013; 136: 211 - 213.
- CALVO MS, Whiting SJ, Barton CN: Vitamin D fortification in the United States and Canada: current status and data needs. *Am J Clin Nutr* 2004; 80 (S6): 1710 - 1716.
- CALVO MS, Whiting SJ, Barton CN: Vitamin D intake: a global perspective of current status. *J Nutr* 2005; 135 (2): 310 - 316.
- CARLETON RA, Dwyer J, Finberg L, Flora J, Goodman DS, Grundy SM, Havas S, Hunter GT, Kritchevsky D, Lauer RM: Report of the Expert Panel on Population Strategies for Blood Cholesterol Reduction. A statement from the National Cholesterol Education Program, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health. *Circulation* 1991; 83 (6): 2154 - 2232.
- CARROLL A, Onwuneme C, McKenna MJ, Mayne PD, Molloy EJ, Murphy NP: Vitamin D status in Irish children and adolescents: value of fortification and supplementation. *Clin Pediatr (Phila)* 2014; 53 (14): 1345 - 1351.
- CASHMAN KD: The role of vitamers and dietary-based metabolites of vitamin D in prevention of vitamin D deficiency. *Food Nutr Res* 2012; 54.
- CHAPUY MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, Meunier PJ: Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997; 7 (5): 439 - 443.
- CHEN TC, Persons KS, Lu Z, Mathieu JS, Holick MF: An evaluation of the biologic activity and vitamin D receptor binding affinity of the photoisomers of vitamin D₃ and previtamin D₃. *J Nutr Biochem* 2000; 11 (5): 267 - 272.

- CIPRIANI C, Romagnoli E, Pepe J, Russo S, Carlucci L, Piemonte S, Nieddu L, McMahon DJ, Singh R, Minisola S: Long-term bioavailability after a single oral or intramuscular administration of 600,000 IU of ergocalciferol or cholecalciferol: implications for treatment and prophylaxis. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98 (7): 2709 - 2715.
- CLAUSEN I, Jakobsen J, Leth T, Ovesen L: Vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in raw and cooked pork cuts. *J Food Comp Anal* 2003; 16: 575 - 585.
- COOPER AD: Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 1997; 38 (11): 2173 - 2192.
- CUFADAR Y, Olgun O, Yildiz AO: The effect of dietary calcium concentration and particle size on performance, eggshell quality, bone mechanical properties and tibia mineral contents in moulted laying hens. *Br Poult Sci* 2011; 52 (6): 761 - 768.
- DAWKINS MS, Cook PA, Whittingham MJ, Mansell KA, Harper AE: What makes free-range broiler chickens range? In situ measurement of habitat preference. *Anim Behav* 2003; 66: 151 - 160.
- DEEB KK, Trump DL, Johnson CS: Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007; 7 (9): 684 - 700.
- DELUCA HF: Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80 (S6): 1689 - 1696.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG: Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Vitamin D. *Neuer Umschau Buchverlag* 2013; Neustadt a. d. Weinstraße, 1. Auflage.
- DIARRASSOUBA F, Garrait G, Remondetto G, Alvarez P, Beyssac E, Subirade M: Food protein-based microspheres for increased uptake of vitamin D₃. *Food Chem* 2015a; 173: 1066 - 1072.
- DIARRASSOUBA F, Garrait G, Remondetto G, Alvarez P, Beyssac E, Subirade M: Improved bioavailability of vitamin D₃ using a beta-lactoglobulin-based coagulum. *Food Chem* 2015b; 172: 361 - 367.
- DITTMER KE & THOMPSON KG: Vitamin D metabolism and rickets in domestic animals: a review. *Vet Pathol* 2011; 48 (2): 389 - 407.
- DUELAND S, Helgerud P, Pedersen JI, Berg T, Drevon CA: Plasma clearance, transfer, and distribution of vitamin D₃ from intestinal lymph. *Am J Physiol* 1983; 245 (4): 326 - 331.
- DUVAL C, Touche V, Tailleux A, Fruchart J, Fievet C, Clavey V, Staels B, Lestavel S: Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340 (4): 1259 - 1263.

- Edelstein S, Lawson DEM, Kodicek E: The transporting proteins of cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in serum of chicks and other species. *Biochem J* 1973; 135: 417 - 426.
- Elkin RG, Yan Z, Zhong Y, Donkin SS, Buhman KK, Story JA, Turek JJ, Porter, R E Jr, Anderson M, Homan R, Newton RS: Select 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors vary in their ability to reduce egg yolk cholesterol levels in laying hens through alteration of hepatic cholesterol biosynthesis and plasma VLDL composition. *J Nutr* 1999; 129 (5): 1010 - 1019.
- Endo-Umeda K, Yasuda K, Sugita K, Honda A, Ohta M, Ishikawa M, Hashimoto Y, Sakaki T, Makishima M: 7-Dehydrocholesterol metabolites produced by sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) modulate liver X receptor activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 140: 7 - 16.
- Engelsen O, Brustad M, Aksnes L, Lund E: Daily duration of vitamin D synthesis in human skin with relation to latitude, total ozone, altitude, ground cover, aerosols and cloud thickness. *Photochem Photobiol* 2005; 81 (6): 1287 - 1290.
- European Food Safety Authority: Scientific opinion on the tolerable upper intake level of vitamin D. *EFSA Journal* 2012; 10 (7): 2813.
- European Food Safety Authority: Scientific opinion on the safety of vitamin D-enriched UV-treated baker's yeast. *EFSA Journal* 2014; 12 (1): 3520.
- Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ: The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* 2014; 14 (5): 342 - 357.
- Ferguson GW, Gehrmann WH, Karsten KB, Hammack SH, McRae M, Chen TC, Lung NP, Holick MF: Do panther chameleons bask to regulate endogenous vitamin D₃ production? *Physiol Biochem Zool* 2003; 76 (1): 52 - 59.
- Fleming RH: Nutritional factors affecting poultry bone health. *Proc Nutr Soc* 2008; 67 (2): 177 - 183.
- Fraser DR & Emtage JS: Vitamin D in the avian egg. Its molecular identity and mechanism of incorporation into yolk. *Biochem J* 1976; 160 (3): 671 - 682.
- Fukumoto S: Phosphate metabolism and vitamin D. *Bonekey Rep* 2014; 3 (497): 1 - 5.
- Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, Berger F, Wion D: New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13 (3): 100 - 105.
- Gesellschaft für Ernährungsphysiologie: Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Legehennen und Masthühner (Broiler). *DLG Verlag* 1999; Frankfurt am Main

- Grandi NC, Breitling LP, Brenner H: Vitamin D and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Prev Med* 2010; 51 (3): 228 - 233.
- Grossmann RE & Tangpricha V: Evaluation of vehicle substances on vitamin D bioavailability: a systematic review. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54 (8): 1055 - 1061.
- Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J: Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest* 1993; 91 (6): 2552 - 2555.
- Haham M, Ish-Shalom S, Nodelman M, Duek I, Segal E, Kustanovich M, Livney YD: Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles. *Food Funct* 2012; 3 (7): 737 - 744.
- Hannon EM, Kiely M, Flynn A: The impact of voluntary fortification of foods on micronutrient intakes in Irish adults. *Br J Nutr* 2007; 97 (6): 1177 - 1186.
- Hathcock JN, Shao A, Vieth R, Heaney R: Risk assessment for vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2007; 85 (1): 6 - 18.
- Havel RJ: Receptor and non-receptor mediated uptake of chylomicron remnants by the liver. *Atherosclerosis* 1998; 141 (S1): 1 - 7.
- Hess AF & Weinstock M: Antirachitic properties imparted to inert fluids and to green vegetables by ultra-violet irradiation. *J Biol Chem* 1924; 62: 301 - 313.
- Hidiroglou M & Karpinski K: Providing vitamin D to confined sheep by oral supplementation vs ultraviolet irradiation. *J Anim Sci* 1989; 67 (3): 794 - 802.
- Hilger J, Friedel A, Herr R, Rausch T, Roos F, Wahl DA, Pierroz DD, Weber P, Hoffmann K: A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr* 2014; 111 (1): 23 - 45.
- Hintzpeter B, Mensink GBM, Thierfelder W, Muller MJ, Scheidt-Nave C: Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62 (9): 1079 - 1089.
- Holick MF: The influence of vitamin D on bone health across the life cycle. *J Nutr* 2005; 135 (11): 2726 - 2727.
- Holick MF: Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006; 116 (8): 2062 - 2072.
- Holick MF: Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357 (3): 266 - 281.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM: Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96 (7): 1911 - 1930.

- Holick MF & Chen TC: Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008; 87 (4): 1080 - 1086.
- Holick MF, MacLaughlin JA, Doppelt SH: Regulation of cutaneous previtamin D₃ photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. *Science* 1981; 211 (4482): 590 - 593.
- Hollis BW, Roos BA, Draper HH, Lambert PW: Vitamin D and its metabolites in human and bovine milk. *J Nutr* 1981; 111 (7): 1240 - 1248.
- Hosseini-nezhad A & Holick MF: Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* 2013; 88 (7): 720 - 755.
- Hu FB, Stampfer MJ, Rimm EB, Manson JE, Ascherio A, Colditz GA, Rosner BA, Spiegelman D, Speizer FE, Sacks FM, Hennekens CH, Willett WC: A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. *JAMA* 1999; 281 (15): 1387 - 1394.
- Hu Y, Wang Q, Ma X, Li X, Liu X, Xiao J, Liao D, Xiang J, Tang C: TGF-beta1 up-regulates expression of ABCA1, ABCG1 and SR-BI through liver X receptor alpha signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells. *J Atheroscler Thromb* 2010a; 17 (5): 493 - 502.
- Hu Y, Zheng L, Wang Q: Regulation of cholesterol homeostasis by liver X receptors. *Clin Chim Acta* 2010b; 411 (9): 617 - 625.
- Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW: The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 alpha,25(OH)₂-vitamin D₃ in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol* 2004; 18 (11): 2660 - 2671.
- Hurwitz S: Homeostatic control of plasma calcium concentration. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1996; 31 (1): 41 - 100.
- Hymoller L & Jensen SK: Vitamin D₃ synthesis in the entire skin surface of dairy cows despite hair coverage. *J Dairy Sci* 2010; 93 (5): 2025 - 2029.
- Iannotti LL, Lutter CK, Bunn DA, Stewart CP: Eggs: the uncracked potential for improving maternal and young child nutrition among the world's poor. *Nutr Rev* 2014; 72 (6): 355 - 368.
- Jacobus CH, Holick MF, Shao Q, Chen TC, Holm IA, Kolodny JM, Fuleihan GE, Seely EW: Hypervitaminosis D associated with drinking milk. *N Engl J Med* 1992; 326 (18): 1173 - 1177.
- Jakobsen J & Knuthsen P: Stability of vitamin D in foodstuffs during cooking. *Food Chem* 2014; 148: 170 - 175.
- Jakobsen J & Saxholt E: Vitamin D metabolites in bovine milk and butter. *J Food Comp Anal* 2009; 22 (5): 472 - 478.

- Jeroch H, Kozlowski K, Jankowski J: Versorgung des Geflügels mit Energie und Nährstoffen aus der Sicht nationaler und internationaler Empfehlungen. *Arch Geflügelk* 2011; 75 (4): 218 - 225.
- Jones G: Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 2008; 88 (2): 582 - 586.
- Jungert A, Roth HJ, Neuhauser-Berthold M: Serum 25-hydroxyvitamin D₃ and body composition in an elderly cohort from Germany: a cross-sectional study. *Nutr Metab* 2012; 9 (1): 42.
- Kalaras MD, Beelman RB, Elias RJ: Effects of postharvest pulsed UV light treatment of white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) on vitamin D₂ content and quality attributes. *J Agric Food Chem* 2012; 60 (1): 220 - 225.
- Kiely M & Black LJ: Dietary strategies to maintain adequacy of circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2012; 243: 14 - 23.
- Kilbane MT, O'Keane M, Morrin M, Flynn M, McKenna MJ: The double-edged sword of vitamin D in Ireland: the need for public health awareness about too much as well as too little. *Ir J Med Sci* 2014; 183 (3): 485 - 487.
- Kirchgeßner M: Tierernährung. *DLG Verlag* 2004; Frankfurt am Main, 11. Auflage.
- Ko JA, Lee BH, Lee JS, Park HJ: Effect of UV-B exposure on the concentration of vitamin D₂ in sliced shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) and white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *J Agric Food Chem* 2008; 56 (10): 3671 - 3674.
- Koul PA, Ahmad SH, Ahmad F, Jan RA, Shah SU, Khan UH: Vitamin d toxicity in adults: a case series from an area with endemic hypovitaminosis d. *Oman Med J* 2011; 26 (3): 201 - 204.
- Kuan V, Martineau AR, Griffiths CJ, Hypponen E, Walton R: DHCR7 mutations linked to higher vitamin D status allowed early human migration to northern latitudes. *BMC Evol Biol* 2013; 13 (144): 1 - 10.
- Lehmann B, Tiebel O, Meurer M: Expression of vitamin D₃ 25-hydroxylase (CYP27) mRNA after induction by vitamin D₃ or UVB radiation in keratinocytes of human skin equivalents--a preliminary study. *Arch Dermatol Res* 1999; 291 (9): 507 - 510.
- Levy E, Spahis S, Sinnott D, Peretti N, Maupas-Schwalm F, Delvin E, Lambert M, Lavoie M: Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18 (3): 310 - 318.
- Lietzow J, Kluge H, Brandsch C, Seeburg N, Hirche F, Glomb M, Stangl GI: Effect of short-term UVB exposure on vitamin D concentration of eggs and vitamin D status of laying hens. *J Agric Food Chem* 2012; 60 (3): 799 - 804.
- Lips P: Which circulating level of 25-hydroxyvitamin D is appropriate? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89: 611 - 614.

- Lips P, Duong T, Oleksik A, Black D, Cummings S, Cox D, Nickelsen T: A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes of raloxifene evaluation clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (3): 1212 - 1221.
- Liu J, Greenfield H, Fraser DR: An exploratory study of the content of vitamin D compounds in selected samples of Australian eggs. *Nutrition & Dietetics* 2014; 71: 46 - 50.
- Liu X, Zhao HL, Thiessen S, House JD, Jones PJH: Effect of plant sterol-enriched diets on plasma and egg yolk cholesterol concentrations and cholesterol metabolism in laying hens. *Poult Sci* 2010; 89 (2): 270 - 275.
- MacLaughlin J & Holick MF: Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *J Clin Invest* 1985; 76 (4): 1536 - 1538.
- Malerod L, Juvet LK, Hanssen-Bauer A, Eskild W, Berg T: Oxysterol-activated LXRalpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 299 (5): 916 - 923.
- Maruotti N & Cantatore FP: Vitamin D and the immune system. *J Rheumatol* 2010; 37 (3): 491 - 495.
- Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J, MacLaughlin JA, Holick MF: Sunscreens suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64 (6): 1165 - 1168.
- Mattila PH, Lehikoinen K, Kiiskinen T, Piironen V: Cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol content of chicken egg yolk as affected by the cholecalciferol content of feed. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (10): 4089 - 4092.
- Mattila PH, Piironen VI, Uusi-Rauva EJ, Koivistoinen PE: Contents of cholecalciferol, ergocalciferol, and their 25-hydroxylated metabolites in milk products and raw meat and liver as determined by HPLC. *J Agric Food Chem* 1995; 9: 2394 - 2399.
- Mattila PH, Rokka T, Konko K, Valaja J, Rossow L, Ryhanen E: Effect of cholecalciferol-enriched hen feed on egg quality. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (1): 283 - 287.
- Mattila PH, Ronkainen R, Lehikoinen K, Piironen V: Effect of household cooking on the vitamin D content in fish, eggs, and wild mushrooms. *J Food Comp Anal* 1999; 12 (3): 153 - 160.
- Mattila PH, Valkonen E, Valaja J: Effect of different vitamin D supplementations in poultry feed on vitamin D content of eggs and chicken meat. *J Agric Food Chem* 2011; 59 (15): 8298 - 8303.

- Max D, Brandsch C, Schumann S, Kuhne H, Frommhagen M, Schutkowski A, Hirche F, Staeger MS, Stangl GI: Maternal vitamin D deficiency causes smaller muscle fibers and altered transcript levels of genes involved in protein degradation, myogenesis, and cytoskeleton organization in the newborn rat. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58 (2): 343 - 352.
- Max Rubner-Institut: Nationale Verzehrsstudie II: Ergebnisbericht Teil 2. 2008, Karlsruhe
- McNamara DJ: The impact of egg limitations on coronary heart disease risk: do the numbers add up? *J Am Coll Nutr* 2000; 19 (S5): 540 - 548.
- Minelli G, Sirri F, Folegatti E, Meluzzi A, Franchini A: Egg quality traits of laying hens reared in organic and conventional systems. *Ital J Anim Sci* 2007; 6 (S1): 728 - 730.
- Moore C, Murphy MM, Keast DR, Holick MF: Vitamin D intake in the United States. *J Am Diet Assoc* 2004; 104 (6): 980 - 983.
- Mostert BE, Bowes EH, vanderWalt JC: Influence of different housing systems on the performance of hens of four laying strains. *S Afr J Anim Sci* 1995; 25 (3): 80 - 86.
- Mugnai C, Dal Bosco A, Castellini C: Effect of rearing system and season on the performance and egg characteristics of Ancona laying hens. *Ital J Anim Sci* 2009; 8 (2): 175 - 188.
- Murphy SC, Whited LJ, Rosenberry LC, Hammond BH, Bandler DK, Boor KJ: Fluid milk vitamin fortification compliance in New York State. *J Dairy Sci* 2001; 84 (12): 2813 - 2820.
- Naber EC: Nutrient and drug effects on cholesterol metabolism in the laying hen. *Fed Proc* 1983; 42 (8): 2486 - 2493.
- Nagpal S, Na S, Rathnachalam R: Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005; 26 (5): 662 - 687.
- National Research Council: Guide for the care and use of laboratory animals. *National Academies Press* 2011; Washington D.C., 8. edition
- National Research Council: Nutrient requirements of laboratory animals. *National Academies Press* 1995; Washington D.C., 4. edition
- O'Donnell S, Cranney A, Horsley T, Weiler HA, Atkinson SA, Hanley DA, Ooi DS, Ward L, Barrowman N, Fang M, Sampson M, Tsertsvadze A, Yazdi F: Efficacy of food fortification on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations: systematic review. *Am J Clin Nutr* 2008; 88 (6): 1528 - 1534.
- Ostermeyer U & Schmidt T. Vitamin D and provitamin D in fish: determination by HPLC with electrochemical detection. *Eur Food Res Technol* 2006; 222: 403 - 413.

- Ovesen L, Brot C, Jakobsen J: Food contents and biological activity of 25-hydroxyvitamin D: a vitamin D metabolite to be reckoned with? *Ann Nutr Metab* 2003; 47 (3): 107 - 113.
- Pandita KK, Pandita S, Hassan T: "Toxic" beef bone soup. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2011; 8 (2): 43 - 44.
- Pandita KK, Razdan S, Kudyar RP, Beigh A, Kuchay S, Banday T: "Excess good can be Dangerous". A case series of iatrogenic symptomatic hypercalcemia due to hypervitaminosis D. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2012; 9 (2): 118 - 120.
- Persia ME, Higgins M, Wang T, Trample D, Bobeck EA: Effects of long-term supplementation of laying hens with high concentrations of cholecalciferol on performance and egg quality. *Poult Sci* 2013; 92 (11): 2930 - 2937.
- Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29 (9): e45.
- Radtke J, Geissler S, Schutkowski A, Brandsch C, Kluge H, Duranti MM, Keller S, Jahreis G, Hirche F, Stangl GI: Lupin protein isolate versus casein modifies cholesterol excretion and mRNA expression of intestinal sterol transporters in a pig model. *Nutr Metab* 2014; 11 (1): 1 - 9.
- Ramasamy I: Recent advances in physiological calcium homeostasis. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44 (3): 237 - 273.
- Reboul E, Goncalves A, Comera C, Bott R, Nowicki M, Landrier J, Jourdheuil-Rahmani D, Dufour C, Collet X, Borel P: Vitamin D intestinal absorption is not a simple passive diffusion: evidences for involvement of cholesterol transporters. *Mol Nutr Food Res* 2011; 50: 691 - 702.
- Reeve LE, Jorgensen NA, DeLuca HF: Vitamin D compounds in cows' milk. *J Nutr* 1982; 112 (4): 667 - 672.
- Renken SA & Warthesen JJ: Vitamin D stability in milk. *J Food Sci* 1993; 58 (3): 552 - 556.
- Ringe JD & Kipshoven C: Vitamin D-insufficiency: An estimate of the situation in Germany. *dermatoendocrinology* 2012; 4 (1): 72 - 80.
- Roberts J: Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. *Journal of Poultry Science* 2004; 41: 161 - 177.
- Rong Y, Chen L, Zhu T, Song Y, Yu M, Shan Z, Sands A, Hu FB, Liu L: Egg consumption and risk of coronary heart disease and stroke: dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ* 2013; 346: e8539.
- Rosenstreich SJ, Rich C, Volwiler W: Deposition in and release of vitamin D₃ from body fat: evidence for a storage site in the rat. *J Clin Invest* 1971; 50 (3): 679 - 687.

- Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, Gallagher JC, Gallo RL, Jones G, Kovacs CS, Mayne ST, Rosen CJ, Shapses SA: The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96 (1): 53 - 58.
- Sato Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K: Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: a randomized controlled trial. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20 (3): 187 - 192.
- Schmid A & Walther B: Natural vitamin D content in animal products. *Adv Nutr* 2013; 4 (4): 453 - 462.
- Schmidt N, Brandsch C, Kuhne H, Thiele A, Hirche F, Stangl GI: Vitamin D receptor deficiency and low vitamin D diet stimulate aortic calcification and osteogenic key factor expression in mice. *PLoS One* 2012; 7 (4): e35316.
- Schmidt N, Brandsch C, Schutkowski A, Hirche F, Stangl GI: Dietary vitamin D inadequacy accelerates calcification and osteoblast-like cell formation in the vascular system of LDL receptor knockout and wild-type mice. *J Nutr* 2014; 144 (5): 638 - 646.
- Schuessler M, Astecker N, Herzig G, Vorisek G, Schuster I: Skin is an autonomous organ in synthesis, two-step activation and degradation of vitamin D₃: CYP27 in epidermis completes the set of essential vitamin D₃-hydroxylases. *Steroids* 2001; 66 (3): 399 - 408.
- Seamans KM & Cashman KD: Existing and potentially novel functional markers of vitamin D status: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2009; 89 (6): 1997 -2008.
- Seeburg N. Entwicklung, Validierung und Anwendung einer Methode zur Vitamin D-Analytik in Lebensmitteln. *Dissertation* 2014; Halle (Saale).
- Shakur YA, Lou W, L'Abbe MR: Examining the effects of increased vitamin D fortification on dietary inadequacy in Canada. *Can J Public Health* 2014; 105 (2): 127 - 132.
- Song WO & Kerver JM: Nutritional contribution of eggs to American diets. *J Am Coll Nutr* 2000; 19 (S5): 556 - 562.
- Suda T, Ueno Y, Fujii K, Shinki T: Vitamin D and bone. *J Cell Biochem* 2003; 88 (2): 259 - 266.
- Sugiyama T, Kikuchi H, Hiyama S, Nishizawa K, Kusuhara S: Expression and localisation of calbindin D28k in all intestinal segments of the laying hen. *British Poultry Science* 2007; 48 (2): 233 - 238.
- Tanaka Y, Castillo L, DeLuca HF: Control of renal vitamin D hydroxylases in birds by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73 (8): 2701 - 2705.

- Tanaka Y, Castillo L, Wineland MJ, DeLuca HF: Synergistic effect of progesterone, testosterone, and estradiol in the stimulation of chick renal 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase. *Endocrinology* 1978; 103 (6): 2035 - 2039.
- Teichmann A, Dutta PC, Staffas A, Jagerstad M: Sterol and vitamin D₂ concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. *LWT* 2007; 40 (5): 815 - 822.
- Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, Vamvakas EC, Dick IM, Prince RL, Finkelstein JS: Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med* 1998; 338 (12): 777 - 783.
- Tian XQ, Chen TC, Lu Z, Shao Q, Holick MF: Characterization of the translocation process of vitamin D₃ from the skin into the circulation. *Endocrinology* 1994; 135 (2): 655 - 661.
- Tian XQ, Chen TC, Matsuoka LY, Wortsman J, Holick MF: Kinetic and thermodynamic studies of the conversion of previtamin D₃ to vitamin D₃ in human skin. *J Biol Chem* 1993; 268 (20): 14888 - 14892.
- Tippetts M, Martini S, Brotherson C, McMahon DJ: Fortification of cheese with vitamin D₃ using dairy protein emulsions as delivery systems. *J Dairy Sci* 2012; 95 (9): 4768 - 4774.
- Tsugawa N, Okano T, Takeuchi A, Kayama M, Kobayashi T: Metabolism of orally administered ergosterol and 7-dehydrocholesterol in rats and lack of evidence for their vitamin D biological activity. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1992; 38 (1): 15 - 25.
- United States Department of Agriculture: World agricultural supply and demand estimates. *World Agricultural Outlook Board* 2014; Washington D.C..
- van Den Brand H, Parmentier HK, Kemp B: Effects of housing system (outdoor vs cages) and age of laying hens on egg characteristics. *Br Poult Sci* 2004; 45 (6): 745 - 752.
- Vatanparast H, Calvo MS, Green TJ, Whiting SJ: Despite mandatory fortification of staple foods, vitamin D intakes of Canadian children and adults are inadequate. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121 (1): 301 - 303.
- Visser M, Deeg DJH, Lips P: Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia): the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88 (12): 5766 - 5772.
- Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A: Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol* 2012; 3 (58): 1 - 13.

- Wang L, Song Y, Manson JE, Pilz S, Marz W, Michaelsson K, Lundqvist A, Jassal SK, Barrett-Connor E, Zhang C, Eaton CB, May HT, Anderson JL, Sesso HD: Circulating 25-hydroxy-vitamin D and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective studies. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2012; 5 (6): 819 - 829.
- Webb AR: Who, what, where and when-influences on cutaneous vitamin D synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92 (1): 17 - 25.
- Webb AR, DeCosta BR, Holick MF: Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D₃ by causing its photodegradation. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68 (5): 882 - 887.
- Webb AR, Kline L, Holick MF: Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67 (2): 373 - 378.
- Weggemans RM, Zock PL, Katan MB: Dietary cholesterol from eggs increases the ratio of total cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol in humans: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (5): 885 - 891.
- Weiss JF, Johnson RM, Naber EC: Effect of some dietary factors and drugs on cholesterol concentration in the egg and plasma of the hen. *J Nutr* 1967; 91 (1): 119 - 128.
- Whyte MP, Haddad JG, JR, Walters DD, Stamp TC: Vitamin D bioavailability: serum 25-hydroxyvitamin D levels in man after oral, subcutaneous, intramuscular, and intravenous vitamin D administration. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48 (6): 906 - 911.
- Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF: Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (3): 690 - 693.
- Yang JH, Hou JF, Farquharson C, Zhou ZL, Deng YF, Wang L, Yu Y: Localisation and expression of TRPV6 in all intestinal segments and kidney of laying hens. *Br Poult Sci* 2011; 52 (4): 507 - 516.
- Yao L, Wang T, Persia M, Horst RL, Higgins M: Effects of vitamin D₃-enriched diet on egg yolk vitamin D₃ content and yolk quality. *J Food Sci* 2013; 78 (2): 178 - 183.
- Zhu JG, Ochalek JT, Kaufmann M, Jones G, DeLuca HF: CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110 (39): 15650 - 15655.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Gabriele I. Stangl gilt mein aufrichtiger Dank für die Übertragung dieses spannenden und vielseitigen Themas, die engagierte und freundliche Betreuung während der gesamten Doktorandenzeit sowie die konstruktiven Gespräche und Hilfestellungen.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Alexandra Schutkowski für die stetige Hilfsbereitschaft in sämtlichen Belangen des Doktorandenalltags. Außerdem gebührt Herrn Dr. Frank Hirche ein herzliches Dankeschön für die kompetente Unterstützung bei der umfangreichen Vitamin D-Analytik.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern, Doktoranden und Studenten des Instituts für Agrar- und Ernährungswissenschaften für die stets freundliche Unterstützung im Labor und den Versuchstationen.

Der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt danke ich für die Gewährung meines Promotionsstipendiums.

Abschließend möchte ich auch meiner Familie danken, die mit viel Geduld und moralischer Unterstützung ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Julia Kühn
Geburtsdatum und -ort	19.09.1988 in Sömmerda
Geburtsname	Krämer
Familienstand	verheiratet

Studium und Schulbildung

10.2007 – 06.2012	Studium der Ernährungswissenschaften Friedrich-Schiller-Universität Jena Abschluss: Diplom
05.2011 – 05.2012	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie Thema: „ <i>Effects of lupin protein supplementation on fasting amino acid and cholesterol concentrations in humans</i> ”
09.1999 – 06.2007	Albert-Schweitzer-Gymnasium Sömmerda Abschluss: Abitur

Beruflicher Werdegang

Seit 10.2014	Lehrkraft für besondere Aufgaben Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
06.2012 – 09.2014	Promotionsstudentin und Stipendiatin der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften

Publikationen und Tagungsbeiträge

Fachzeitschriften **Kühn J**, Schutkowski A, Hirche F, Baur AC, Mielenz N, Stangl GI: Non-linear increase of vitamin D content in eggs from chicks treated with increasing exposure times of ultraviolet light. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2014**; Artikel im Druck

Kühn J, Schutkowski A, Kluge H, Hirche F, Stangl GI: Free-range farming: A natural alternative to produce vitamin D-enriched eggs. *Nutrition* **2014**; 30: 481

 Schutkowski A, **Krämer J**, Kluge H, Hirche F, Krombholz A, Theumer T, Stangl GI: UVB Exposure of Farm Animals: Study on a Food-Based Strategy to Bridge the Gap between Current Vitamin D Intakes and Dietary Targets. *PLoS ONE* **2013**; 8: e69418

Bähr M, Fechner A, **Krämer J**, Kiehntopf M, Jahreis G: Lupin protein positively affects plasma LDL cholesterol and LDL:HDL cholesterol ratio in hypercholesterolemic adults after four weeks of supplementation: a randomized, controlled crossover study. *Nutr J* **2013**; 12: 107

Tagungsbeiträge

Kühn J, Schutkowski A, Hirche F, Stangl GI: Ultraviolet irradiation of laying hens as a useful method to increase the vitamin D content of eggs: study on the efficient exposure time. 17th Vitamin D Workshop, 17.-20.06.2014, Chicago, USA

Kühn J, Schutkowski A, Hirche F, Stangl GI: Untersuchung zum Einfluss des Vitamin D-Status auf die Gehalte an 7-Dehydrocholesterol in der Haut. 51. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V., 12.-14.03.2014, Paderborn, Deutschland.

Krämer J, Schutkowski A, Kluge H, Hirche F, Stangl GI: "Bio-addition" – Strategien zur Erzeugung Vitamin D-angereicherter tierischer Lebensmittel. 12. Tagung Schweine- und Geflügelernährung, 12.-14.11.2013, Lutherstadt Wittenberg, Deutschland.

Krämer J, Schutkowski A, Kluge H, Hirche F, Stangl GI: UV-Exposition – eine innovative Methode zur Verbesserung des Vitamin D-Gehaltes im Ei. 50. Wissenschaftliche Tagung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V., 20.-22.03.2013, Bonn, Deutschland.

Ort, Datum

Unterschrift

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und diese nicht bereits für eine Promotion oder ähnliche Zwecke an einer anderen Universität eingereicht habe. Weiterhin versichere ich, dass ich die verwendeten wissenschaftlichen Arbeiten und Hilfsmittel genau und vollständig angegeben habe.

Ort, Datum

Unterschrift