

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Laura DEBEVC

**OPIS POSEBNIH ZNAČILNOSTI SLOVENSKIH TRADICIONALNIH
SIROV IN DOLOČANJE ACE-INHIBITORNIH PEPTIDOV V SIRU
TOLMINC IN BOVŠKEM SIRU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**DESCRIPTION OF THE SPECIFIC CHARACTERISTICS OF
SLOVENIAN TRADITIONAL CHEESES AND DETECTION OF ACE-
INHIBITORY PEPTIDES IN THE TOLMINC AND BOVŠKI CHEESES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Z diplomskim delom končujem univerzitetni študij zootehnike. Laboratorijsko delo v okviru diplome je bilo opravljeno na Katedri za mlekarstvo in Katedri za prehrano, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Ireno Rogelj, za somentorja pa dr. Gorazda Tompo.

Recenzent: prof. dr. Bogdan Perko

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Gorazd TOMPA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Bogdan PERKO
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Laura Debevc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 637.3(043.2)=163.6
KG	mlečni izdelki/tradicionalni siri/tolminc/bovški sir/peptidi/ACE-inhibitorna aktivnost/Slovenija
KK	AGRIŠ Q01/9430
AV	DEBEVC, Laura
SA	ROGELJ, Irena (mentor)/TOMPA, Gorazd (somentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2011
IN	OPIS POSEBNIH ZNAČILNOSTI SLOVENSКИH TRADICIONALNIH SIROV IN DOLOČANJE ACE-INHIBITORNIH PEPTIDOV V SIRU TOLMINC IN BOVŠKEM SIRU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 70 str., 11 pregl., 21 sl., 53 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen diplomske naloge je bil opisati posebne značilnosti slovenskih tradicionalnih sirov, kot so način izdelave posameznega sira, sestava mikroflora, maščobnokislinska sestava in prisotnost terpenov v njih. Opis smo pripravili na osnovi različnih literarnih virov. K posebnim značilnostim sirov pa prištevamo tudi njihove funkcionalne lastnosti, zato smo se v nalogi podrobneje osredotočili na prisotnost bioaktivnih peptidov in z eksperimentalnim delom ugotavljali ACE-inhibitorno aktivnost vodotopnih ekstraktov tradicionalnih slovenskih sirov, ki v literaturi še ni bila opisana. Analizirali smo vzorce sirov tolminc in bovški sir. Za določanje vsebnosti dušika v vzorcih smo uporabili metodo po Kjeldahlu, za ločevanje peptidov pa ultrafiltracijo ter tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), s pomočjo katere smo ugotavljali tudi ACE-inhibitorno aktivnost vodotopnih ekstraktov sirov. Peptidni profil vodotopnih ekstraktov sirov smo ugotavljali na podlagi dobljenih HPLC kromatogramov. Med slovenskimi tradicionalnimi siri je odstotek ACE-inhibitorne aktivnosti vodotopnih ekstraktov sirov pri vzorcih tolminca znašal od 39,8 do 87,5 %, pri bovškem pa od 61,9 do 92,0 %. Visok odstotek ACE-inhibitorne aktivnosti je bil pri večini vzorcev povezan z visokim indeksom proteolize. Za 50% inhibicijo ACE je bilo v povprečju potrebno približno 20 mg sira/ml reakcijske mešanice. Najvišji odstotek ACE-inhibitorne aktivnosti smo opazili pri vzorcu sira, narejenega v eksperimentalni sirarni z avtohtono mikrofloro tolminca. Vodotopni ekstrakti sirov, ki so bili podvrženi ultrafiltraciji skozi 3 kDa membrano, so pokazali okoli 60 odstotkov ACE-inhibitorne aktivnosti ne-ultrafiltriranih vzorcev. Sklepamo lahko, da so bili za ACE-inhibitorno aktivnost testiranih vzorcev odgovorni predvsem peptidi z molekulsko maso manjšo od 3kDa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 637.3(043.2)=163.6

CX milk products/traditional cheeses/Tolminc/Bovški cheese/peptides/ACE inhibitor activity/Slovenia

CC AGRIS Q01/9430

AU DEBEVC, Laura

AA ROGELJ, Irena (supervisor)/TOMPA, Gorazd (co-supervisor)

PP SI-1230 Domžale, Groblje 3

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

PY 2011

TI DESCRIPTION OF THE SPECIFIC CHARACTERISTICS OF SLOVENIAN TRADITIONAL CHEESES AND DETECTION OF ACE INHIBITORY PEPTIDES IN THE TOLMINC AND BOVŠKI CHEESES

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 70 p., 11 tab., 21 fig., 53 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The objective of the diploma thesis is to describe the specific properties of traditional Slovene cheeses, such as the production method, microflora, fatty acid composition, and the presence of terpenes. The description is based on various sources. Since specific properties of cheeses also include their functional properties, we focused primarily on the presence of bioactive peptides and on determining the ACE-inhibitory activity of water-soluble extracts of traditional Slovene cheeses through experimental work, which has not yet been described in professional literature. We analysed the samples of the Tolminc and Bovški cheeses. For determining the nitrogen content of the samples, we used the Kjeldahl method, while for peptide separation we used ultrafiltration and high-performance liquid chromatography (HPLC) which was also used for determining the ACE-inhibitory activity of water-soluble cheese extracts. The peptide profile of the water-soluble cheese extracts was determined on the basis of HPLC chromatograms. Among traditional Slovene cheeses, the level of ACE-inhibitory activity of water-soluble extracts of the Tolminc cheese amounted to 39.8 to 87.5%, while the level of Bovški cheese extracts reached 61.9 to 92%. In a majority of the samples, the high level of ACE-inhibitory activity was connected to a high proteolysis index. A 50% ACE inhibition level required approximately 20 mg of cheese per ml of the reaction mixture. The highest level of ACE-inhibitory activity was established in a cheese extract made in an experimental cheese factory with the indigenous microflora of the Tolminc cheese. The water-soluble cheese extracts which underwent ultrafiltration through a 3kDa membrane showed approximately 60% of the ACE-inhibitory activity of the non-ultrafiltrated samples. Consequently, we conclude that the ACE-inhibitory activity of the tested samples can mainly be attributed to peptides with a molecular weight lower than 3kDa.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 SLOVENSKI TRADICIONALNI SIRI	2
2.1.1 Sir tolminc	4
2.1.2 Bovški sir	5
2.1.3 Mohant	6
2.1.4 Kraški ovčji sir	8
2.1.5 Nanoški sir	9
2.2 TEHNOLOGIJA IZDELAVE SLOVENSKIH TRADICIONALNIH SIROV	10
2.3 OZNAČBA GEOGRAFSKEGA POREKLA	13
2.3.1 Označba geografskega porekla	13
2.3.2 Markerji geografskega porekla tradicionalnih sirov	14
2.3.2.1 Hlapne organske spojine	14
2.3.2.2 Maščobnokislinska sestava	15
2.4 BIOAKTIVNI PEPTIDI V SIRIH	16
2.5 ACE INHIBITORNI PEPTIDI	18
2.6 REGULACIJA KRVNEGA TLAKA	18
2.7 ANGIOTENZIN (I) KONVERTIRAJOČ ENCIM (ACE)	19
2.7.1 Aktivnost angiotenzinske konvertaze	20
2.7.2 Določanje ACE-inhibitorne aktivnosti ekstraktov tradicionalnih sirov	20
2.7.3 ACE-inhibitorna aktivnost v času zorenja sira	21
2.7.4 Laktotripeptida VPP in IPP	21

3	MATERIAL IN METODE	23
3.1	LITERARNI VIRI	23
3.2	EKSPERIMENTALNI DEL	23
3.2.1	Reagenti	23
3.2.2	Pribor in oprema	24
3.2.3	Priprava raztopin	25
3.2.4	Oznake vzorcev sirov	26
3.2.5	Določanje vsebnosti dušika v vzorcih – Kjeldahlova metoda	26
3.2.6	Priprava vodotopnih ekstraktov sira	27
3.2.7	Ultrafiltracija ekstraktov	28
3.2.8	Ugotavljanje ACE-inhibitorne aktivnosti	28
3.2.8.1	Enota encimske aktivnosti	28
3.2.8.2	Ekstrakcija ACE iz liofiliziranega tkiva kunčjih pljuč	28
3.2.8.3	Ugotavljanje ACE-inhibitorne aktivnosti vodotopnih ekstraktov sira s HPLC	28
3.2.8.4	Ugotavljanje peptidnega profila vodotopnih ekstraktov sirov	30
4	REZULTATI	31
4.1	POSEBNE ZNAČILNOSTI SLOVENSКИH TRADICIONALNIH SIROV	31
4.1.1	Hlapne organske spojine	34
4.1.2	Maščobnokislinska sestava	34
4.1.3	Mikrobiološke značilnosti slovenskih tradicionalnih sirov	35
4.2	ACE – INHIBITORNI PEPTIDI V SIRU TOLMINC IN BOVŠKEM SIRU	37
4.2.1	Celokupni dušik v vzorcih sirov	37
4.2.2	Vodotopni dušik v vzorcih sira	39
4.2.3	Indeks proteolize	40
4.2.4	Analiza ACE-inhibitorne aktivnosti	41
4.2.4.1	HPLC kromatogram reakcijske mešanice brez dodatka inhibitorja	41
4.2.4.2	ACE-inhibitorna aktivnost vodotopnih ekstraktov sirov	42
4.2.5	Določanje vrednosti IC₅₀ pri ekstraktih sira	44
4.3	POVZETEK REZULTATOV ANALIZE ACE-INHIBITORNE AKTIVNOSTI VODOTOPNIH EKSTRAKTOV SIROV	51
4.4	PEPTIDNI PROFIL EKSTRAKTOV SIROV	53
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	56

5.1	VSEBNOST DUŠIKA V VZORCIH TRADICIONALNIH SLOVENSKIH SIROV TOLMINC IN BOVŠKI SIR	57
5.2	ACE-INHIBITORNA AKTIVNOST VODOTOPNIH EKSTRAKTOV TRADICIONALNIH SLOVENSKIH SIROV TOLMINC IN BOVŠKI SIR	57
5.3	SKLEPI	61
6	POVZETEK	62
7	VIRI	64

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Priprava 0,1M fosfatnega pufra, $\text{pH}=8,3\pm 0,1$ z 0,4 M NaCl	25
Preglednica 2: Priprava 5mM HHL	25
Preglednica 3: Priprava eluenta A	25
Preglednica 4: Priprava eluenta B	26
Preglednica 5: Pogoji kromatografske analize	29
Preglednica 6: Gradient eluentov A in B	30
Preglednica 7: Kemijska sestava tradicionalnih slovenskih sirov (Perko in Koren, 2003; Koren in sod., 2003; Renčelj in sod., 2001; Renčelj, 2008; Perko in sod., 2002)	33
Preglednica 8: Celokupni dušik v vzorcih sirov	38
Preglednica 9: Vodotopni dušik v vzorcih sira	39
Preglednica 10: Indeks proteolize	40
Preglednica 11: ACE-inhibitorna aktivnost vodotopnih ekstraktov sirov	51

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Funkcije bioaktivnih peptidov (Silva in Malcata, 2005)	17
Slika 2: Vpliv peptidnih inhibitorjev ACE na krvni tlak (Pihlanto-Leppala, 2001)	19
Slika 3: HPLC kromatogram reakcijske mešanice brez dodatka inhibitorja (kontrolni vzorec) in kromatogram standardne raztopine hipurne kisline (2 mM)	41
Slika 4: Nastanek HA ob dodatku različno razredčenega ekstrakta T1 v reakcijsko mešanico	42
Slika 5: Nastanek HA ob dodatku različno razredčenega ekstrakta T6 v reakcijsko mešanico	43
Slika 6: Nastanek HA ob dodatku različno razredčenega ekstrakta B12 v reakcijsko mešanico	43
Slika 7: Nastanek HA ob dodatku različno razredčenega ekstrakta B14 v reakcijsko mešanico	44
Slika 8: Ocena IC ₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira T1	45
Slika 9: Ocena IC ₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira T3	45
Slika 10: Ocena IC ₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira T6	46
Slika 11: Ocena IC ₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira T7	46
Slika 12: Ocena IC ₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B12	47
Slika 13: Ocena IC ₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B13	47
Slika 14: Ocena IC ₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B14	48
Slika 15: Ocena IC ₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B15	48
Slika 16: Ocena IC ₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B17	49
Slika 17: Ocena IC ₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira E1	49
Slika 18: Ocena IC ₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira G3	50
Slika 19: Kromatografski profil peptidov vodotopnih ekstraktov vzorcev T1 in T7 (tolminc)	53
Slika 20: Kromatografski profil peptidov vodotopnih ekstraktov vzorcev B12 in B13 (bovški sir)	54
Slika 21: Kromatografski profil peptidov vodotopnih ekstraktov vzorcev G3 in E1 (eksperimentalni sir G3 ter vzorec sira edamec Tuš)	55

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Kratika - okrajšava	Pomen
ACE	angiotenzin I konvertirajoč encim; angiotenzinska konvertaza
ACN	acetonitril
AI	ACE-inhibitorna aktivnost
AK	aminokislina
CATC	citrat-azid-tween-karbonat
CLA	konjugirana linolna kislina
CPP	kazeino-fosfopeptidi
Da	Dalton
FAPGG	furanoakriloil-L-fenilalanilglicilglicin
GMP	glikomakro peptid
HA	hipurna kislina
HCl	klorovodikova kislina
HHL (Hip-His-Leu)	hipuroil-histidil-levcin
His-Leu	histidil-levcin
IC ₅₀	koncentracija inhibitorja pri 50% inhibiciji ACE
IPP	izolevcil-prolil-prolin
MKB	mlečnokislinske bakterije
MWCO	membrana z izključitveno molekulsko maso (angl. molecular weight cut-off)
PCR	verižna reakcija s-polimerazo (polymerase chain reaction)
RAS	renin-angiotenzin regulacijski sistem
RCF (g)	relativna centrifugalna sila (angl. relative centrifugal force)
RP HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti na reverzni fazi
SN	topni dušik (angl. soluble nitrogen)
TFA	trifluorocetna kislina
TN	celokupni (skupni) dušik (angl. total nitrogen)
WSN	vodotopni dušik (water soluble nitrogen)
VPP	valil-prolil-prolin

1 UVOD

V Sloveniji poznamo pet tradicionalnih sirov, ki nosijo označbo geografskega porekla, to so: tolminc, bovški sir, nanoški sir, mohant in kraški ovčji sir. Oznaka geografskega porekla je pomembna za zaščito tradicionalnih izdelkov. Skupna evropska kmetijska politika je že nekaj let usmerjena k ohranjanju biološke raznolikosti, zaščiti geografskih oznak in zaščiti označb porekla, saj danes potrošnike zanimajo predvsem izvorni in tradicionalni živilski izdelki. Da bi naše tradicionalne sire bolje spoznali smo v nalogi na kratko zbrali njihove že poznane značilnosti, saj mora obstajati za zaščito izdelka z oznako geografskega porekla neka objektivna, tesna povezava med lastnostmi izdelka in njegovim geografskim poreklom. Pregledali smo obstoječo literaturo o maščobnokislinski sestavi, prisotnosti tipičnih aromatičnih snovi in sestavi mikroflore sirov. Podrobneje pa smo preučili prisotnost ACE-inhibitornih peptidov v siru tolminc ter bovškem siru in tako opisali tudi njihove funkcionalne lastnosti. Literatura namreč navaja, da se pri encimski hidrolizi (proteolizi) mlečnih proteinov tvorijo peptidi z različnimi biološkimi aktivnostmi, kot so opioidni peptidi, imunomodulatorni peptidi in ACE-inhibitorni peptidi. Kar v nekaj raziskavah so preiskovali ACE-inhibitorne peptide in ugotovili, da nastane med zorenjem sirov veliko teh peptidov iz kazeina. Tako so izolirali različne ACE-inhibitorne peptide iz različnih tradicionalnih sirov (Korhonen in Pihlanto, 2006).

Namen naloge je bil opisati posebne značilnosti slovenskih tradicionalnih sirov na osnovi dostopne literature, ki opisuje avtohtono mikrofloro, maščobnokislinsko sestavo ter aromatične snovi. Poleg naštetih značilnosti prištevamo k posebnim značilnostim sirov tudi njihove funkcionalne lastnosti, zato smo ovrednotili ACE-inhibitorno aktivnost sira tolminc in bovškega sira, ki v literaturi še ni bila opisana. Hipotezo o nastanku bioaktivnih peptidov smo preverjali z eksperimentalnim delom in sicer z merjenjem ACE-inhibitorne aktivnosti vodotopnih ekstraktov tradicionalnih slovenskih sirov tolminc in bovški sir.

Iz znanstvene literature je poznano, da v sirih med zorenjem nastajajo bioaktivni peptidi, njihova koncentracija pa je odvisna od proteolitične sposobnosti mikroflore, prisotne v siru. Ker sta tradicionalna slovenska sira tolminc in bovški sir narejena iz surovega mleka smo pričakovali, da bosta vsebovala bioaktivne peptide, zato smo želeli ugotoviti ali bodo imeli vodotopni ekstrakti sirov ACE-inhibitorno aktivnost.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SLOVENSKI TRADICIONALNI SIRI

Naša dežela ima precej razgiban teren, vse od ravníc do visokega alpskega sveta. Tako planinski kot gorski svet sta zelo pomembna za ohranjanje naravnega ravnotežja, ki vpliva na podnebje in vode širšega območja. Takšna razgibanost je vplivala na razvoj pestre in bogate mlekarske tradicije, ki jo danes še vedno ohranjajo kmetje s sirarji na planinah in tehnologi v mlekarnah. Ohranjanje porekla in tradicionalne tehnologije izdelave so pripeljale do uveljavljenja imen sirov kot so bovški sir, sir tolminc in nanoški sir. Siri so imeli že v 16. stoletju pomembno mesto v prehrani, poznali so različne vrste, razpoznavne po območjih, kjer so jih izdelovali. Vrste sirov so se razlikovale tudi po vrsti surovine ali so bili izrazito ovčji siri, kozji, kravji ali mešanice dveh ali treh vrst mleka. Zelo zgodaj je tako zaslovel bovški sir, ki so ga prvotno izdelovali iz mešanice ovčjega in kozjega mleka. Na Tolminskem so sprva izdelovali pusti sir iz posnetega mleka, v drugi polovici 19. stoletja pa so se lotili izdelovanja sira po švicarskih zgledih ter obvladali tehnologijo izdelave italijanskega sira tipa montasio (Renčelj in sod., 1995).

Današnji slovenski tradicionalni siri so nasledek razvoja planinskega sirarstva, ki se je dogajalo v drugi polovici 19. stoletja. Takrat so posamezniki in država poskušali nadgraditi izdelovanje sirov po domačih receptih z novimi tehnologijami in izdelki iz tujine, zlasti Švice. Tako se je v Sloveniji ohranilo pet tradicionalnih sirov: nanoški sir, bovški sir, kraški ovčji sir, mohant in sir tolminc. Na širšem slovenskem trgu sta prisotna le nanoški sir ter sir tolminc, ostale pa prodajajo bolj lokalno (Renčelj in sod., 1995).

Na severnem primorskem je glavni namen planinskega sveta raba zelinja za pašo preko poletja, utrjevanje kmetij in ohranitev kulturne krajine s pašništvom. V tolminskih planinah so kmetje pasli živino na skupinskih pašnikih. Paša v čistem visokogorskem okolju pa je tista, ki daje zrelemu siru sladko-pikanten okus. Znanje in praksa ter kakovostno mleko so bili pogoji za značilen in kakovosten tolminski sir, ki se ga je dalo že leta 1773 dobiti v Vidmu (Udinah) pod imenom *Formaggio di Tolmino* poleg sira *Montasio vero* iz Režije in drugih. Na bovškem je bila prvotno bolj doma ovčarska tradicija. Tako so prvotno izdelovali čisti ovčji sir, kasneje pa so pričeli dodajati ovčjemu mleku še kravje ali kozje mleko. Na planini Koritnica še izdelujejo bovški sir iz ovčjega mleka po starem izročilu.

Nekateri sirarji še vedno izdelujejo sirišče iz telečjih želodčkov ali pa želodčkov jagnjet in kozličkov. Nasoljene želodčke s sesirjenim mlekom sušijo, nato drobno zrežejo, zmeljejo in shranijo v kozarce. Pred uporabo takšno sirišče namočijo v topli vodi (Renčelj in sod., 1995).

Na Gorenjskem se je do današnjih dni poleg skute in kislega mleka od starih vrst sira ohranil tudi mohant, katerega so ohranjali v pašni srenji Bohinjske Češnjice. Mohant je posebež med slovenskimi siri, saj je med prvimi pridobil naziv sir z geografskim poreklom. S kombinacijo več dejavnikov, kot so karakteristika krme, pasma živali, kemična in mikrobiološka sestava mleka, ki so specifične za določeno geografsko področje, pridobi sir svoje značilne lastnosti. Mohant je izjema tudi v tem, da je trenutno edini med slovenskimi tradicionalnimi siri z geografskim poreklom v tipu mehkega sira, zato se od ostalih močno razlikuje tudi v tehnološkem postopku izdelave.

Za notranjsko pokrajino je bilo znano, da vsak sirar ljubosumno hrani svojo skrivnost izdelovanja sira, ki temelji na poznavanju podrobnosti posameznih faz obdelave. Občutek za zaznavo prave toplote, gostote, trdote, vonja in okusa se je razvijal z dolgoletno prakso. Občutek pod prsti je dal vse potrebne zaznave, ki so vodile do dobrega sira. Še živeči ovčarji pravijo, da se te prakse ne da povedati, niti zapisati. Kmetije na Nanosu so živele od gozda, oglarjenja in od mleka. Iz ovčjega mleka so izdelovali znani nanoški sir, ki ga je zelo cenila tržaška gospoda (Renčelj in sod., 1995).

Južna primorska pokrajina oziroma Kras in Istra nedvomno sodita med območja s slabšimi možnostmi za razvoj in obstanek živinoreje. Skromne talne in neugodne podnebne razmere so poglavitni omejitveni dejavnik. Ovčereja in izdelava kraškega ovčjega sira sta bili tradicionalno vezani na posamezna območja in kmetije. Istrani niso klali jagnjet in telet, zato so za pripravo sirišča uporabljali svinjske želodčke, katere so nasolili in najprej posušili v dimniku. Tako so pripravljali sirilo vse do Črnega Kala in Prešnice. Za sprotno sirjenje so narezali košček želodčka in ga namakali v sirotki z dodatkom soli. Sirilo so shranjevali podobno kot kvas za peko kruha. Ko je sirilu pošla moč, so pripravili novega (Renčelj in sod., 1995).

2.1.1 Sir tolminc

Začetki izdelave sira v Zgornjem posočju se povezujejo z začetki pašništva v visokogorskih planinah, saj je bil sir takrat edini način konzerviranja mleka. Prvi zapisi o sirarstvu na Tolminskem izhajajo iz 12. in 13. stoletja. Zapisi so shranjeni v urbarjih, v katerih je navedeno, da so morali kmetje davke Oglejskemu patriarhu plačevati s sirom. Sir pod imenom tolminc oziroma tolminski sir je bil prvič omenjen leta 1756 na ceniku, ki so ga uporabljali v mestu Videm (Renčelj in sod., 1995).

Kmetijsko društvo v Gorici je leta 1874 ustanovilo sirarsko družbo s 23 člani ter zadrugo v Poljubinju. V letu 1883 je Tolmince, ravno tako kot Bohinjce, umetnosti sirarstva poučeval švicarski sirar Tomaž Hitz. Pod njegovim vodstvom so leta 1884 v Poljubinju pri Tolminu ustanovili mlekarsko šolo z namenom umnega učenja sirarskih veščin (Cencič in sod, 2006).

Tolminci se zaradi večstoletne tradicije niso pustili zapeljati v smeri švicarskega sira ementalca tako kot Bohinjci, niti sosednjemu siru montasio iz okolice Montaža, ki ga proizvajajo v Furlaniji. Tako so ostali zvesti tradiciji in ohranili izvirno tehnologijo izdelave sira s prepoznavnimi senzoričnimi lastnostmi z uporabo avtohtonih kultur. Danes se s kakovostnim sirom ponašajo posamezni sirarji tako na planinah, kot v dolini (Cencič in sod, 2006).

Sir tolminc izdelujejo iz surovega kravjega mleka po tradicionalni tehnologiji. Njegove značilnosti so vezane na okolje, bogata mikroflora pa je nujno potrebna pri izdelovanju sira. S sirarskimi cepivi si pomagajo le toliko, da dajo začetno prednost pravilni mlečnokislinski fermentaciji.

Tolminc tržijo kot sir iz surovega mleka, izdelan izključno na območju Zgornjega Posočja, brez uporabe gensko spremenjenih organizmov. Proizvajalec lahko sir še dodatno označi, če je zorjen več kot 4, 6 ali 12 mesecev ter če so krave molznice krmljene brez silaže ali če je pridelan v planinski sirarni. Območje zaščite zajema Zgornje Posočje, na zahodu omejeno z državno mejo z Italijo, drugod pa mejnimi naselji, ki si po vrsti sledijo od Kamnega do naselja Log pod Mangartom.

Izdelana je bila tudi specifikacija za sir tolminc, ki jo je v skladu s pravilnikom, ki ureja postopke za priznavanje označb posebnih kmetijskih pridelkov oziroma živil, potrdilo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (Perko in Koren, 2003).

Pravilnik o označbi geografskega porekla sira Tolminc (2003), določa način pridelave, predelave in priprave za trg ter območje pridelave in predelave za sir z označbo geografskega porekla tolminc.

2.1.2 Bovški sir

Po najdenih sledih domnevamo, da so se pašne planine razvijale skupaj oziroma vzporedno z železarstvom, morda celo zaradi oskrbe za vsakodnevno prehrano železarjev visoko v gorah, kar je značilno za Julijske Alpe. Sožitje med pastirji in rudarji je narekovala medsebojna odvisnost. Kmetje so s hrano oskrbovali tudi oglarje. Sekanje gozdov in kuhanje oglja je bilo neusmiljeno in uničujoče, posledično zaradi krčenja gozdov pa so nastajali pašniki in senožeti ter ovčje in kozje planine. Planina Trebiščna se omenja že leta 1328, kar lahko štejemo za začetek izdelave bovškega sira. Sir kmetom ni pomenil le živila, temveč tudi plačilno sredstvo za poravnavo davščin in drugih dajatev zemljiškim gospodom. O tem pričajo dajatve, določene na kmetijo, zapisane v Tolminskem urbarju iz 14. stoletja ((Fischione, 1998; Koren in sod., 2003).

Pod imenom bovški sir (Formaggio di Plezzo vero) se pojavi v do sedaj dostopnih virih na ceniku ki so ga uporabljali v mestu Videm (enako kot tolminc) leta 1756. Iz cenika je razvidno, da je imel v primerjavi z drugimi siri tudi dvakrat višjo ceno. Izobraževanje sirarjev je do leta 1922 potekalo z dogovorjenimi obhodi Cirila Cavlija iz Tolmina. Prvi organiziran tečaj, ki so ga obiskovali tudi bovški sirarji, je bil leta 1922 v Zatoľminu. Zaradi specifičnosti izdelave bovškega sira so organizirali tečaje že leta 1924 v Logu pod Mangartom in kasneje tudi v vaseh doline Trente (Cencič in sod., 2006).

Odsev krize v kmetijstvu in spreminjanje življenjske navade ter potreb današnjega človeka se odražajo v današnjem številu planin in ovc. Izdelava sira na planinah je skoraj opuščena. Trenutno izdelujejo bovški sir na Mangartski planini, v Loški Koritnici in Krnici. Z opuščanjem planinskega načina gospodarjenja se pojavljajo večji rejci in sirarji, predvsem v okolici Bovca, kjer so pogoji za rejo veliko boljši kot v dolinah Trente, Bavšice in Koritnice (Cencič in sod., 2006).

Bovški sir so v preteklosti izdelovali iz surovega mleka ovc z dodatkom kozjega ali kravjega mleka. Sedaj gre za čisti ovčji sir, vendar mu nekateri izdelovalci še vedno primešajo nekaj kravjega ali kozjega mleka (lahko dodajo do 20%). Dodatek kozjega oziroma kravjega mleka mora biti na etiketi označen. Sir proizvajajo samo na kmetijah in planinah Zgornjega Posočja, prodajajo ga samo na domovih. Vsa prireja mleka mora potekati na območju zaščite, enako pridelava krme in paša. Pri prireji mleka ni dovoljeno uporabljati gensko spremenjene krme in rastnega hormona (Cencič in sod., 2006).

Pravilnik o označbi geografskega porekla Bovški sir (2004), določa način pridelave, predelave in priprave za trg ter območje pridelave in predelave za sir z označbo geografskega porekla bovški sir.

2.1.3 Mohant

Bohinj je zelo staro poselitveno območje. Poljedelstvo je bilo zmeraj bolj skromno, prebivalci so živeli predvsem od živinoreje. Travniki v dolinah so dajali dovolj sena za zimo. Bohinj je bil naseljen že v bronasti dobi, o čemer pričajo arheološke najdbe (Planšarstvo, 2007).

Bohinj je bil stoletja naše najmočnejše planšarsko središče, saj so ga razvili do popolnosti. Planšarstvo, katerega začetki segajo v 13. stoletje in z njim povezano sirarstvo, je skozi zgodovino predstavljalo temelj kmetijstva v Bohinju. Premalo obdelovalnih površin, dolga zima in kratko poletje so bili vzroki, da so se prebivalci v glavnem ukvarjali z živinorejo (krave, koze, konji, ovce). Mleko in mlečni izdelki so bili dolgo časa osnova vsakdanje prehrane (Planšarstvo, 2007).

Podatki govorijo, da je v preteklosti delovalo približno štirideset planin, ki so danes večinoma opuščene. Razdeljene so bile na senožetne planine, srednje planine in visoke planine. Pastirji so spomladi začeli pasti na senožetnih planinah, ki so ležale najnižje. Potem so živino gnali na srednje in visoke planine, jeseni pa so se v stopnjah spet vračali v dolino. Zaradi velike odvisnosti kmečkega gospodarstva od planšarske živinoreje se je v Bohinju vse do druge polovice 20. stoletja ohranila najstarejša oblika individualnega pastirstva. Individualno pastirstvo je oblika planšarske organizacije, v kateri ima gospodar na planini svojo stajo in majerja – planšarja. Vsak majer je sam predeloval mleko v mlečne izdelke, na začetku maslo, kasneje tudi skuto in sir. Z izdelki so Bohinjci tudi trgovali in

jih niso uporabljali zgolj zase. Prodajali so večinoma v Trst in nazaj prinašali sol in vino. Med mlečnimi izdelki ima posebno mesto sir mohant, ki je še danes posebnost v Bohinju (Renčelj in sod., 1995).

Pred prvo svetovno vojno so mohant za domačo rabo izdelovali majerji v svojih stajah v času jeseni, ko so se vračali z visokih planin na Zajamnike in Jelje ter pozno jeseni, ko so pasli na planini Pokrovec. Po pripovedovanju domačinov so ga delali že od nekdaj v Bohinjski Češnjici, na planinah Konjska dolina, Jelje in v vasi Podjelje, kjer ga izdelujejo še danes (Renčelj in sod., 1995).

Poleti, ko sir hitreje zori, ga izdelujejo iz polnomastnega mleka, pozimi pa iz posnetega mleka. Poleti zori najmanj šest tednov, pozimi pa do tri mesece (Cencič in sod., 2006).

Leta 1997 se je začelo z aktivnostmi za ohranitev mohanta, kar je spodbudilo marsikaterega proizvajalca mleka, da je poskusil z njegovo izdelavo. Pri pripravi elaborata za sir mohant je sodelovalo dvanajst proizvajalcev, ki so istočasno ob pomoči strokovnjakov iz Biotehniške fakultete in kmetijske svetovalne službe izboljšali in poenotili tehnološki postopek izdelave. Sir mohant daje možnost dodatnega vira dohodka manjšim hribovskim in gorskim kmetijam in je lahko tudi del kulinarčne ponudbe v Bohinju (Cencič in sod., 2006).

Mohant je polmehki sir ostrega vonja in pikantnega okusa, narejen iz posnetega kravjega mleka. Mohant je sir belo-rumene barve z značilnim agresivnim okusom in vonjem, zato velja: »Kdor ga je poskusil in vonjal, ga prav gotovo ni pozabil«. V Bohinju so ga izdelovali še pred poznavanjem tehnologije prešanja sirov, sirišče je bilo tradicionalno izdelano iz telečjih želodcev. Povečini ga uživajo le domačini in poznavalci sirov. Območje, kjer pridelujejo mleko in izdelujejo sir mohant, se nahaja znotraj meje, ki poteka od Koble čez Bohinjsko sedlo do planine Pečana, do Rovtarice v smeri Soteske, do Kranjske doline čez Plešo v smeri Mrzlega studenca na Debelo peč, do Rjavine čez Triglav v dolino Triglavskih Jezer, čez Zgornjo Komno do Lepe Komne, čez tolminski Kuk na Vogel, čez planino Raskovec preko Črne prsti do Koble (Renčelj in sod., 2001). Surovina za izdelavo je mleko avtohtone pasme bohinjska cika, vendar je dovoljena tudi predelava mleka krav drugih pasem. Sestava mohanta: glede na klasičen – spontan način posnemanja mleka je lahko polmasten ali pa četrtmasten sir.

Izdelana je bila specifikacija za sir mohant, ki jo je potrdilo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano v skladu s pravilnikom, ki ureja postopke za priznavanje označb posebnih kmetijskih pridelkov oz. živil (Zaščita geografskih..., 2006).

Pravilnik o označbi geografskega porekla sira Mohant (2004), določa način pridelave, predelave in priprave za trg ter območje pridelave in predelave za sir z označbo geografskega porekla mohant.

2.1.4 Kraški ovčji sir

Delež travnatega sveta na kraških tleh je velik zaradi razgibanega reliefa in ni primeren za obdelovanje, ker je premalo rodne prsti. Največ je košenic in pašnikov. Pašniki so pusti in kamniti, značilna je pretrganost travne ruše, saj del površine zavzemajo žive skale. Za pestrost rastlinskih združb poskrbi izrazita mikroklima. Zaradi nizkega rastja se tla na Krasu bolj segrevajo, večja je tudi osvetlitev rastišča. Zaradi majhne količine padavin sta zelo pomembni tudi zračna vlaga in rosa. Nočna rosa je vzrok, da lahko travna ruša razvije polno cvetje tudi v sušnih mesecih (Renčelj, 2008).

Območje prireje kraškega ovčjega sira obsega aridno območje Krasa, kjer so ovčarji tradicionalno pasli ovce in trgovali z jagnjetino in sirom. Meja območja poteka od Opatjega sela po državni meji z Italijo do Ospa, nato gre v smeri Kubeda, Gračišča in Sočerge do državne meje s Hrvaško. Nadaljuje se do Rupe, obide Novokračine in Zabiče, zajame koto Velika Ojstrica, se nadaljuje desno od vasi Jurišče do Prestranka in Razdrtega, se vzpne na Nanos in zajame koto Debeli vrh ter se spusti v Podnanos ter nadaljuje v smeri Štanjela. Od tu gre do Škrbine, Temnice, Kostanjevice na Krasu in spet do Opatjega sela ter do državne meje z Italijo. Za to območje je značilno prepletanje mediteranskega in celinskega podnebja. Meja območja zaokrožuje skupno tradicijo in usodo ovčarjev v reji in paši ovac ter prodaji sira in skute (Renčelj, 2008).

Izdelava kraškega ovčjega sira ima dolgoletno tradicijo. Na lastnosti izdelka vplivajo lokalni dejavniki kot so pasma, specifičnost kraške pokrajine, kraško podnebje in sestava tal, travinje ter kemijska in mikrobiološka sestava mleka pridelanega na Krasu, mikroflora ter nenazadnje tudi pogoji skladiščenja. Zorenje kraškega sira je celosten proces mikrobioloških, kemijskih in fizikalnih sprememb sirnine. Razvoj značilnega okusa, arome

in teksture je rezultat procesov, ki se pričnejo že v surovem mleku in se nadaljujejo med potekom izdelave in stiskanjem sira ter se končajo med zorenjem sira v zorilnici (Gerželj, 2006). Kraški sir ima značilen okus, aromo in teksturo ter je izdelan izključno iz mleka slovenske avtohtone pasme ovc istrske pramenke.

Pravilnik o Kraškem ovčjem siru z zaščiteno označbo porekla (2008), določa geografsko območje ter način pridelave, predelave in priprave za trg za kraški ovčji sir z zaščiteno označbo porekla.

2.1.5 Nanoški sir

Nanoški sir je sir z geografskim poreklom. Je trdi sir za rezanje, izdelan iz mleka krav, ki so bile hranjene samo z naravnimi krmili. Mleko za nanoški sir pridelujejo na Krasu, Vipavski dolini, Trnovski planoti z okolico in postojnski kotlini – na stičišču sredozemskega in celinskega sveta (Nanoški sir..., 2005).

Sir zori v zgornjem delu Vipavske doline pod vplivom tamkajšnje znamenite burje (mrzlega severnega vetra, ki piha preko doline z vrha nanoške planote in je za Vipavce znanilec dobrega vremena). Burja koristi razvoju plesni *Penicillium*. Ta ščiti sir pred drugimi plesnimi, ki bi lahko povzročile napake na njegovi površini. Prava plesen na površini sira je namreč zagotovilo za značilen okus sira in pogoj za vrhunsko kakovost izdelka. Zorenje sira mora potekati v zgornjem delu vinorodnega okoliša Vipavske doline in sicer na področju doline potoka Močilnika od Lozic do Vipave in doline reke Vipave od Vipave do Ajdovščine. Zorilnica za nanoški sir mora biti locirana na nadmorski višini najmanj 500 m. Sir so na planoti Nanos, po kateri nosi tudi ime, izdelovali že v 16. stoletju. O tem pričajo spisi urbarja vipavske graščine. Ti pripovedujejo, da so bili na planoti pašniki, na katerih so se pasle ovce iz bližnje in daljne okolice. Po drugi svetovni vojni sta ovčereja in sirarstvo na planinah na tem območju močno upadla. Starejši Tržačani se nanoškega sira še spomnijo in povedo, da ga po letu 1954 niso mogli več dobiti (Marc in Žvokelj, 2002).

Nanoški sir so nekoč izdelovali iz ovčjega mleka. Po drugi svetovni vojni se je obseg ovčereje zmanjšal, zato je upadla tudi proizvodnja sira. S proizvodnjo nanoškega sira iz kravjega mleka je leta 1986 ponovno začela Mlekarna Vipava (Cencič in sod., 2006).

Pravilnik o označbi geografskega porekla Nanoški sir (2003), določa način pridelave, predelave in priprave za trg, območje pridelave in označba geografskega porekla. Način kontrole je določen s predpisom, ki ureja postopke za priznavanje označb posebnih kmetijskih pridelkov oziroma živil.

2.2 TEHNOLOGIJA IZDELAVE SLOVENSКИH TRADICIONALNIH SIROV

Skupno vsem slovenskim tradicionalnim sirom, ki so pridobili oznako geografskega porekla je, da morajo vse stopnje v proizvodnji potekati znotraj območja, ki je zaščiten z geografskim poreklom. Glavne značilnosti tehnoloških postopkov petih najbolj poznanih slovenskih tradicionalnih sirov so opisane v nadaljevanju.

Tolminski sir: Večerno mleko sirarji čez noč zorijo (ga ohladijo na 10 do 12 °C). V kotel večernemu mleku prilijejo mleko jutranje molže. Mleko segrejejo na 32 do 35 °C ter dodajo sirišče. Potek usirjanja traja 30 minut. Koagulum nato zrežejo in ga obdelajo s sirarsko harfo do velikosti grahovega zrna, nato ga pustijo da počiva. Sirno maso nato dogrejejo na 43 °C, v planinah do 45 ali 50 °C (da je zrno bolj suho in kleno, ga pri tej temperaturi sušijo 35 minut). Zrno dvignejo iz sirotke s sirarskih prtom in položijo na sirarsko mizo, kjer maso pustijo, da se nekaj časa odceja. Maso razrežejo na kose, jih položijo v oblikovala, obložena s sirarskimi prtiči. Oblikovala so leseni obroči, ki jih stiskajo z vrvjo. Sir je v oblikovalih približno 12 ur, nato pa v slanici dva do dva dni in pol. Sir zorijo na policah pri približno 17 °C in 85 % relativni vlagi. Zorenje poteka najmanj 60 dni, lahko pa tudi 8 mesecev ali več. Po tem času je sir trši in primeren za rezanje, po dveh letih zorenja pa je že primeren za strganje. Po potrebi sir perejo z hladno ali mlačno vodo. V dolini sir hitreje dozori kot v planinah. Iz 100 kg mleka dobijo približno 9,5 kg sira (Perko in Koren, 2003).

Bovški sir: Po starem izročilu izdelujejo bovški sir tako, da mleko večerne molže ohladijo v mrzli studenčnici. Mleko jutranje in večerne molže zlijejo v kotel skozi cedilo in segrejejo na 36 °C. Za molžo uporabljajo leseno posodo imenovano *kmbač*. Nekateri sirarji še vedno izdelujejo sirišče iz telečjih želodčkov ali želodčkov kozličev in jagnjet. Nasoljene želodčke s sesirjenim mlekom sušijo, zrežejo na drobno, zmeljejo in shranijo v kozarce. Pred uporabo sirilo namočijo v toplo vodo. Ko dodajo sirišče v mleko, traja sirjenje približno 30 do 35 minut. Iz 100 litrov mleka dobijo različno količino sira v

odvisnosti od letnega časa oziroma meseca v letu. V juniju dobijo iz 100 litrov mleka 15 do 16 kg sira, v juliju 17 kg, v avgustu 19 kg, septembra pa tudi do 22 kg sira.

Sirno maso mešajo s *trnačem* ali lesenim nožem. Med mešanjem se izloča sirotka. Sirno maso nato zdrobijo do velikosti koruznih zrn, ponovno dogrevajo na 42, 46 ali 48 °C ob stalnem mešanju za čas 15 do 20 minut. Ko dogrejejo na izbrano temperaturo, umaknejo kotel z gorišča. Sirno maso, ki se usede na dno kotla, poberejo v sirarski prt in dajo v lesene modele. Stiskajo jih podobno kot pri siru tolmincu. Sir ostane v modelu 24 do 36 ur. Med tem časom ga tudi obračajo. Sir solijo na policah in sicer štiri dni po dvakrat na dan, vmes hlebce obračajo (danes sire solijo v slanica). Mlad sir na policah obračajo, čistijo in perejo z mlačno vodo ali sirotko. Sir mora zoreti vsaj 5 tednov (Renčelj in sod., 1995).

Mohant: V času poletja mohant zori krajši čas, zato ga izdelujejo iz polnomastnega mleka, pozimi pa iz posnetega mleka, saj zori nekoliko dlje. Mleko posnemajo ročno in ga v kotlu segrevajo od 32 do 35 °C. Mleku dodajo sirišče, katerega še vedno izdelujejo sami iz telečjih želodčkov. Segreto mleko odmaknejo z ognja, nato se siri od 20 do 40 minut. Sledi rezanje z lesenim nožem na grobo in nato s trnačem, da koagulum zdrobijo do velikosti pšeničnih zrn. Da dosežejo popolnejše sirjenje, maso vmes lahko dogrevajo in pustijo do 30 minut, da se sirna masa zgosti in posede na dno kotla. Sirotko delno odlijejo, sirno maso pa z rokami oblikujejo v kepo in dajo v model, imenovan *štecl*, v katerem je nameščen sirarski prtič. Prtič nato zavijajo čez sirno maso, ki jo tlačijo z rokami, da pospešijo odtekanje sirotke. Sir Mohant obračajo v šteclu, soljenje je suho, saj je površina sira vlažna zaradi sirotke in je takšen način soljenja primeren. Obračanje in stiskanje sira traja dan ali dva, nato sledi sušenje na palicah pod stropom imenovanih gliste. Sušene hlebčke mohanta nato zložijo po tri ali štiri plasti v lesen šaf (*žehtnjek*). En hlebček razrežejo in z njimi zapolnijo vmesne prostore. Ko je posoda polna z mohantom, jo prekrijejo s platnenim prtom in lesenim pokrovom ter obtežijo s kamni, da iztiseno še preostalo sirotko iz sira. Postopek odlivanja večkrat ponovijo, sicer bi bil sir bolj grenek. Ko se sirotka preneha izločati, posodo zabijejo s pokrovom in pustijo zoreti od 4 do 6 tednov v spomladanskem času, pozimi do treh mesecev. Zorenje poteka pri temperaturi od 20 do 25 °C. Med zorenjem postane testo mohanta homogeno, bolj ali manj plastično in deluje sveže (Renčelj in sod., 2001).

Kraški ovčji sir: Sir tradicionalno izdelujejo iz surovega mleka, v večjih sirarnah pa je priporočljivo, da mleko termizirajo. Termizacija poteka tako, da mleko segrejejo na 64 °C za 30 minut in nato ohladijo na temperaturo usirjenja, ki je 33 °C. Sledi postopek sirjenja. Mleko temperirajo na 31-33 °C, nato mleku v sirarskem kotlu pred dodatkom sirišča (5-10 minut) dodajo 0,4 do 0,6 % fermentirane sekundarne sirotke, zatem dodajo toliko sirišča, da mleko koagulira v 30 do 40 minutah. Ko dobi koagulum zadostno čvrstost (preizkus z roko – školjkast lom), pričnejo z rezanjem in drobljenjem koaguluma do velikosti pšeničnega zrna. Postopek rezanja traja približno 5 do 10 minut. Dobljeno sirno zrno nato v sirotki, ob stalnem mešanju, dogrevajo na temperaturo 38 do 42 °C (sušenje zrna) 10 do 15 minut, nato sledi 10 minut počivanja. Po tem času v kotlu oblikujejo sirni hlebec, ki ga v sirotki razrežejo na kose. Kose sirnine nato prenesejo v modele na sirarski mizi. Sledi 12 do 18 ur stiskanja z vmesnim povečevanjem pritiska in obračanjem modelov. Po stiskanju sire prenesejo v slanico ali jih solijo na suho. V slanici ostane sir do 24 ur. Nato sledi odcejanje in sušenje površine sira ter namestitvev v zorilni prostor s primerno temperaturo (15-18 °C, relativna vlaga 75 do 85 %). Sir zorijo najmanj 2 meseca, v izjemnih primerih tudi leto dni. V času zorenja sire obračajo in po potrebi čistijo. Iz 100 kg ovčjega mleka izdelajo 15 do 17 kg zrelega kraškega ovčjega sira (Gerželj, 2006).

Nanoški sir: surovo mleko ogrejejo na 63 do 68 °C za 15 sekund, nato ga ohladijo na 2 do 10 °C z namenom, da ohranijo večino v mleku naravno prisotnih mlečnokislinskih mikroorganizmov. Iz skladiščnega tanka nato mleko preko ploščnega izmenjevalca segrejejo na temperaturo usirjanja (od 32 do 34 °C), dodajo malo starterske kulture (zaradi vodenja fermentacijskih procesov) in lizocim (preprečujejo pozno napihovanje sira). Startersko kulturo sestavljata *Streptococcus thermophilus* in *Lactobacillus helveticus*. Nato dodajo toliko sirišča, da pri temperaturi 32 °C do 34 °C mleko koagulira v 15 do 40 minutah. Ko dosežejo zadostno čvrstost koaguluma ga razrežejo do velikosti koruznih zrn. Postopek traja 10 minut. Dobljeno sirno zrno nato v sirotki, ob stalnem mešanju, dogrevajo na temperaturo 45 do 50 °C. Ta faza traja 40 do 45 minut.

Zrna in sirotko nato spustijo v predstiskalnico. Strnjena zrna poravnajo s sirarskimi grabljami, na sirno maso položijo mreže in pričnejo s stiskanjem. Tako se oblikuje sirna pogača. Nato sledi rezanje sirne pogače in polaganje pogače v oblikovala (so iz nerjavečega jekla s premerom 35 cm in višine 15 cm). Oblikovala nato pokrijejo in jih dajo

v stiskalnico. Sledi stiskanje in oblikovanje svežega sira ter soljenje. Sir ostane v slanici tri dni. Koncentracija slanice je 18 do 20 %, temperatura od 12 do 18 °C ter pH vrednost 5,0 do 5,4. Sire vsakodnevno obračajo, da dosežejo enakomerno slanost. Po soljenju v slanici je potrebno sire odcediti in osušiti (sušenje na plastičnih mrežah). Sir nato zori pri posebnih klimatskih pogojih: 83 % do 88 % relativne vlage in temperaturi 14 do 16 °C. Postopek mora potekati v zgornjem delu vinorodnega okoliša Vipavske doline v zorilnici, locirani na nadmorski višini najmanj 500 m (Marc in Žvokelj, 2002).

2.3 OZNAČBA GEOGRAFSKEGA POREKLA

2.3.1 Označba geografskega porekla

Po Zakonu o kmetijstvu lahko z geografsko označbo zavarujemo kmetijski pridelek oziroma živilo, ki izvira iz določenega geografskega območja in ima posebno kakovost, ugled, oziroma druge lastnosti, ki izvirajo iz določenega geografskega območja. Z geografskim poreklom pa zavarujemo tisti kmetijski pridelek oziroma živilo, ki v celoti izvira iz določenega geografskega območja in za izdelavo katerega so surovine pridelane na istem geografskem območju. Prav tako mora kmetijski pridelek, oziroma živilo, če ga želimo zavarovati z geografskim poreklom, izpolnjevati še dva pogoja:

- njegove lastnosti so izključno ali bistveno rezultat naravnih in človeških dejavnikov in
- pridelava, predelava in priprava za trg potekajo znotraj označenega geografskega območja

Za označbo geografskega porekla se ob izpolnjevanju zgoraj naštetih pogojev šteje tudi tradicionalna geografska ali negeografska označba (Zakon o ..., 2006). Označbo geografskega porekla lahko ima sir pridelan, predelan in pripravljen za trg po postopku in na območju, ki sta določena v specifikaciji za določen sir, potrjene na Uradu za priznavanje označb kmetijskih pridelkov oz. živil v skladu s predpisom, ki ureja postopke za priznavanje označb posebnih kmetijskih pridelkov oz. živil. Sir mora biti označen v skladu s predpisom, ki ureja splošno označevanje predpakiranih živil. Označbo geografskega porekla lahko uporablja pridelovalec oz. predelovalec sira, ki pridobi

certifikat za ta sir v skladu s predpisom, ki ureja postopke za priznavanje označb posebnih kmetijskih pridelkov oz. živil. Certifikat morajo pridobiti najkasneje v enem letu od dneva uveljavitve tega pravilnika. Zaščitni znak za sir z označbo geografskega porekla pridobi pridelovalec oziroma predelovalec sira v skladu s predpisom, ki ureja zaščitni znak za označevanje kmetijskih pridelkov oziroma živil.

2.3.2 Markerji geografskega porekla tradicionalnih sirov

Indikatorji izvora oz. porekla so parametri, ki omogočajo določiti geografsko poreklo. Indikatorji so razdeljeni na primarne in sekundarne indikatorje. Primarni so tako v direktni povezavi z geografskim izvorom, na primer pri sirih so to snovi, ki prihajajo iz zaužite krme (paše) in vode v mleko in v sir. Postopek izdelave sira na njih ne vpliva. Sekundarni indikatorji pa so odvisni od vrste mleka in od tehnološkega postopka izdelave sira ter le delno od geografskega izvora. V skupino sekundarnih indikatorjev uvrščamo produkte proteolize (skupni dušik, v vodi topni dušik, nekazeinski dušik, peptidni vzorec v vodi topne peptidne frakcije in proste amino kisline), hlapne snovi, maščobno kislini vzorec in proste maščobne kisline ter organske kisline. Hlapne snovi so ena izmed najbolj pestrih in zanimivih snovi, saj predstavljajo tako primarne kot sekundarne indikatorje (Pompe in sod., 2005).

Pri ugotavljanju geografskega porekla so znanstveniki razdelili tehnike na dve kategoriji. Kot prvo opisujejo tradicionalno tehniko (plinska kromatografija, kapilarna plinska kromatografija lipidnih frakcij in elektroforetska ločba proteinov). Tradicionalne tehnike so usmerjene k ugotavljanju prisotnosti ali odsotnosti določenih kemičnih komponent v izdelku. Kot drugo kategorijo navajajo nove, ne-invazivne in ne-destruktivne instrumentalne tehnike (infrardeča in fluorescenčna spektroskopija). Te tehnike so v primerjavi s prvimi hitrejše, z enostavno pripravo vzorca (Pompe in sod., 2005).

2.3.2.1 Hlapne organske spojine

Hlapne organske spojine v največji meri pripomorejo k okusu in vonju mlečnih izdelkov. Glavne hlapne spojine v sirih nastajajo pri razgradnji aminokislin in encimski hidrolizi trigliceridov (lipoliza), kjer nastanejo proste maščobne kisline, mono- in digliceridi ter

glicerol. Hlapne organske spojine v sirih sta Curioni in Bosset (2002) razvrstila v tri glavne skupine spojin:

- nevtralne (alkoholi, aldehidi, ketoni, estri, laktoni),
- alkalne (žveplove in dušikove spojine, terpeni),
- kisle (proste maščobne kisline, fenolne spojine).

Spojine kot so terpeni, nam lahko služijo kot markerji pri ugotavljanju geografskega porekla (Tomba, 2005). Terpeni so nenasičeni ogljikovodiki, ki so sestavljeni iz ene ali več izoprenskih enot. Uvrščamo jih med lipide. So sekundarni metaboliti, največkrat rastlinskega izvora in so glavna sestavina eteričnih olj, ki jih pogosto uporabljamo v živilski in kemični industriji kot aromatični dodatek (Kirste, 1998).

Terpeni pa niso samo rastlinskega izvora ampak so lahko tudi mikrobiološkega izvora. Viri navajajo o možnostih sinteze terpenov kot sekundarnih metabolitov pri nekaterih mikroorganizmih. Njihova kvalitativna in kvantitativna slika se v rastlinah spreminja glede na vrstno sestavo rastlin in klimatske pogoje. Terpeni bi bili možni indikatorji prepoznavnosti specifičnih sirov (Sunesson in sod., 1997).

Terpene najdemo predvsem v sirih, ki so izdelani iz mleka živali, katere se pasejo v višje ležečih alpskih območjih. V kakšni količini se nahajajo v sirih je odvisno predvsem od botanične raznovrstnosti rastlin posameznega območja, zaradi majhne koncentracije pa v splošnem nimajo velikega vpliva na skupno aromo sira. Med najbolj pogostimi terpeni v sirih so α -pinen, terpenol, linalool in limonen (Buchin in sod., 1999).

2.3.2.2 Maščobnokislinska sestava

Maščobne kisline so karboksilne kisline, pogosto z dolgimi alifatskimi verigami, ki so lahko nasičene ali nenasičene. Maščobnokislinska sestava sira je v največji meri odvisna od vstopne surovine – mleka. Od tod tudi takšna razlika med siri. Hlapne maščobne kisline v sirih nastanejo med procesom fermentacije in zorenja sira (Novak, 2006).

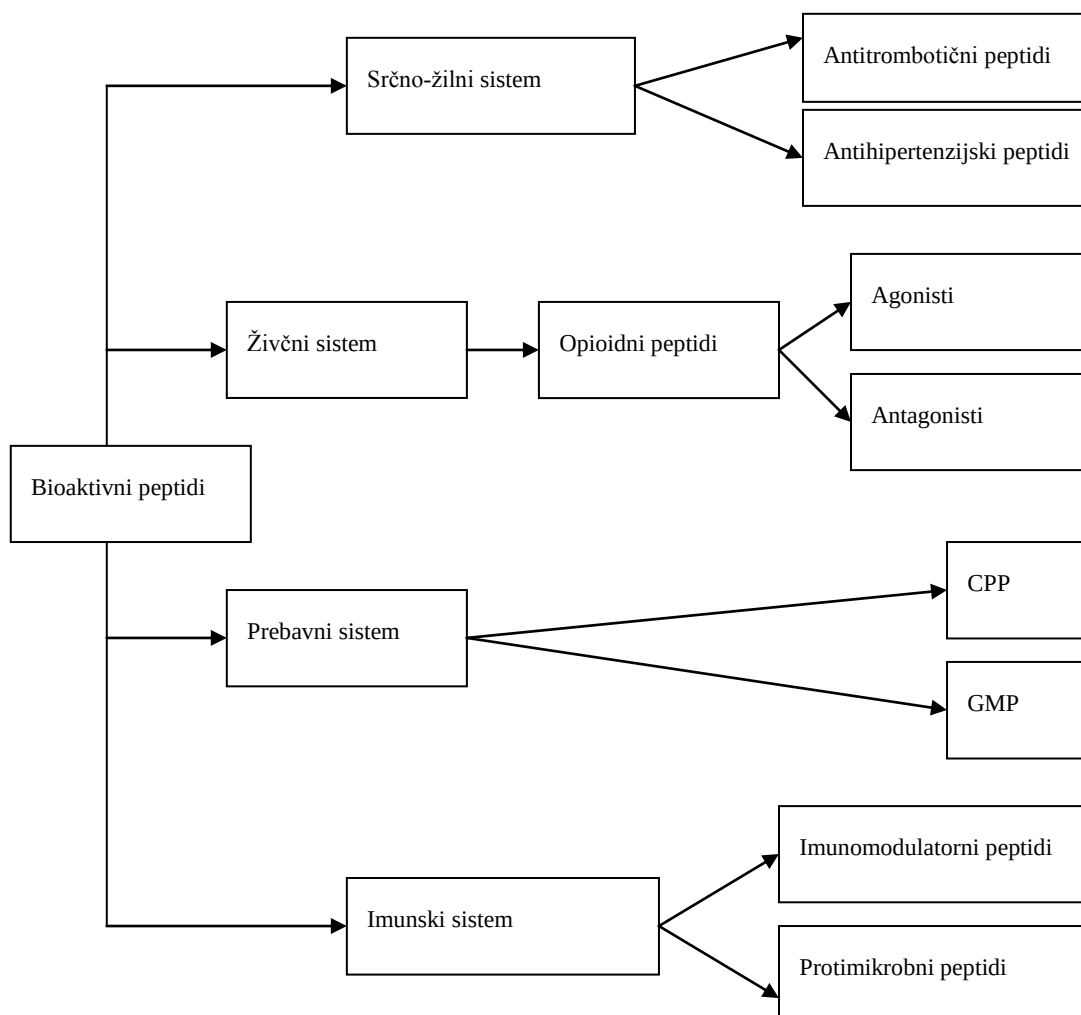
2.4 BIOAKTIVNI PEPTIDI V SIRIH

V času zorenja je sir izpostavljen različnim encimskimi postopkom, predvsem zaradi proteolitičnih bakterij, ki prispevajo k značilni aromi sira. Proteoliza je glavni dogodek zorenja sira in se začne s hidrolizo kazeina preko delovanja proteaz oz. avtohtonih proteinaz v mleku (Sieber in sod., 2009).

Mlečni proteini predstavljajo najpomembnejši vir bioaktivnih peptidov v živilih. Bioaktivni peptidi so vse pogostejše sestavine funkcionalnih prehranskih izdelkov in so potencialni regulatorji različnih procesov v telesu (Clare in Swaisgood, 2000). Bioaktivni peptidi lahko nastanejo iz prekursorskih molekul mlečnih proteinov na naslednje načine (Korhonen in Pihlanto, 2006):

- med prebavo mlečnih proteinov (pepsin, tripsin),
- med fermentacijo mleka s proteolitičnimi starterskimi kulturami,
- med zorenjem sirov,
- s proteolizo mlečnih proteinov z encimi, pridobljenimi iz mikroorganizmov ali rastlin.

Kazeini imajo kot glavna proteinska komponenta v mleku pomembno vlogo pri nastanku bioaktivnih peptidov z multifunkcijskimi lastnostmi. Te lastnosti v grobem delimo na: ACE-inhibitorne, imunomodulatorne, protimikrobne, antitrombogene in na antioksidativne lastnosti (Silva in Malcata, 2005).



CPP... kazeinofosfo peptidi; GMP... glikomakro peptid

Slika 1: Funkcije bioaktivnih peptidov (Silva in Malcata, 2005)

Slika 1 prikazuje učinke bioaktivnih peptidov, ki izvirajo iz kazeinov. Glede na učinke bioaktivnih peptidov poznamo (Clare in Swaisgood, 2000):

- antitrombotične peptide (kazoplatelini), katerih funkcija je, da preprečujejo strjevanje krvi,
- antihipertenzijske peptide: večinoma ACE-inhibitorne peptide, ki znižajo krvni tlak na način, da inhibirajo angiotenzin I konvertirajoč encim (ACE),

- opioidne peptide, ki vplivajo na živčni sistem. Njihova funkcija je, da se vežejo na opioidne receptorje na celicah in imajo tako številne učinke kot so: ugoden vpliv na spanje, stimulirajo sproščanje inzulina in somatostatina, stimulirajo vnos hrane z uravnavanjem delovanja pankreasa,
- CPP, katerih funkcija je, da lahko vežejo ione kalcija in ione drugih mineralov (Mg, Fe, Zn, Ba, Cr, Ni, Co, Se) ter s tem preprečujejo nastajanje kariesa, preprečujejo nastanek rahitičnih obolenj, zdravijo anemijo in zavirajo rast rakavih celic,
- GMP, ki so pomembni v prehrani ljudi z okvaro jeter, saj omogočajo absorpcijo ionov Ca, Fe in Zn,
- imunomodulatorne peptide, katerih funkcija je, da se vežejo na receptorje celic imunskega sistema ter tako vplivajo na imunski odziv,
- protimikrobne peptide, katerih funkcija je, da inhibirajo rast patogenih bakterij.

2.5 ACE INHIBITORNI PEPTIDI

Peptidi, ki inhibirajo ACE, so iz skupine antihipertenzijskih peptidov. ACE se najverjetneje raje veže s substrati oz. kompetitivnimi inhibitorji, ki imajo hidrofobne aminokislinske ostanke (aromske ali z razvejano stransko verigo). Večina kazeinskih ACE-inhibitornih peptidov (kazokininov) vsebuje triptofan, tirozin, fenilalanin ali prolin kot C-terminalni ostanek (Tompa, 2010).

2.6 REGULACIJA KRVNEGA TLAKA

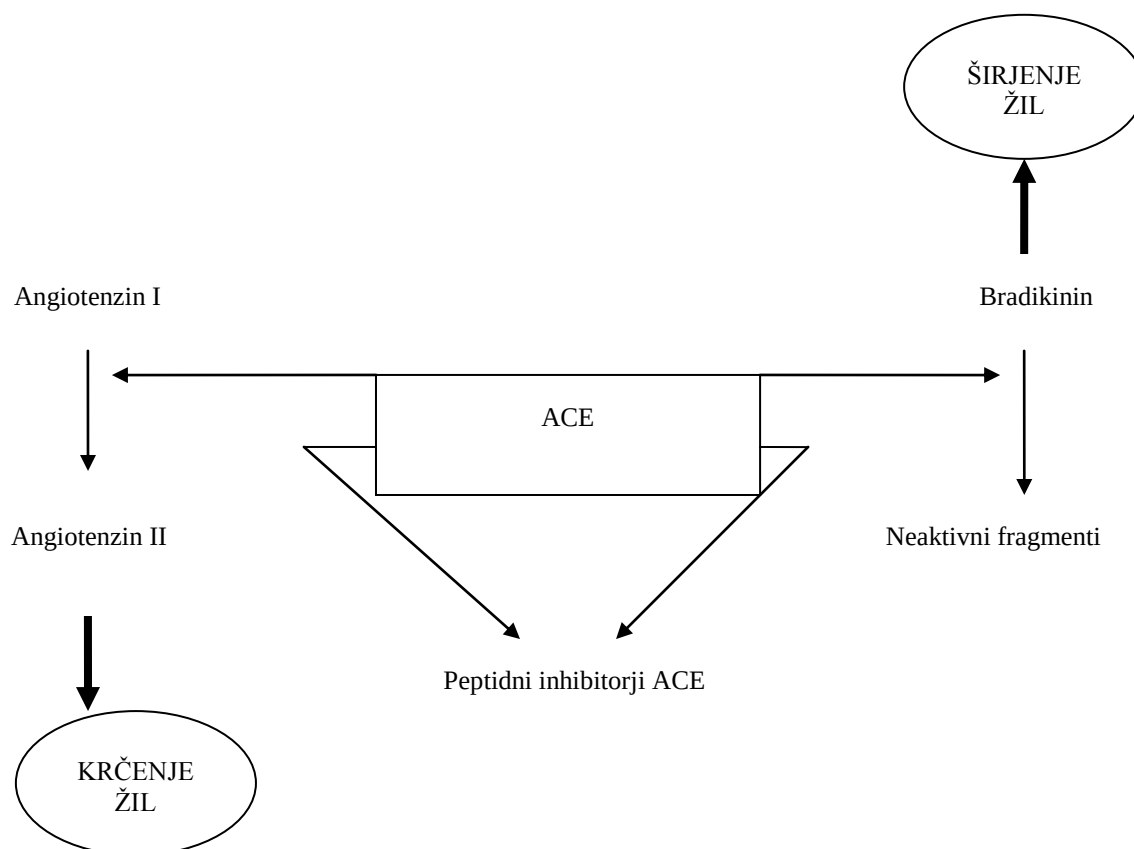
Krvni tlak uravnavajo različne med seboj povezane biokemijske poti. Glavna regulacija krvnega tlaka v organizmu poteka pod vplivom renin-angiotenzinskega sistema (RAS). RAS je eden izmed glavnih regulatorjev krvnega tlaka, elektrolitskega ravnotežja ter ledvičnih, živčnih in endokrinih funkcij, ki so povezane s kontrolo krvožilnega sistema v telesu (Korhonen in Pihlanto, 2006).

ACE je povezan z renin-angiotenzinskim sistemom (RAS), ki regulira periferni krvni tlak. Inhibicija tega encima lahko učinkuje na znižanje krvnega tlaka. Veliko število ACE-

inhibitornih peptidov je bilo izoliranih po encimski hidrolizi različnih proteinov. Poleg inhibicije ACE, lahko peptidi delujejo antihipertenzijsko tudi preko drugih mehanizmov, kot so na primer zaviranje sproščanja endotelina-1 iz endotelijskih celic in stimuliranje delovanja bradikina (Korhonen in Pihlanto, 2006).

2.7 ANGIOTENZIN (I) KONVERTIRAJOČ ENCIM (ACE)

ACE je dipeptidilkarboksipeptidaza, saj cepi dipeptide s C-konca različnih proteinskih substratov. ACE je katalizator spremembe angiotenzina I v angiotenzin II, ki zvišuje krvni tlak ter nivo aldosterona v krvi ter hkrati inaktivira bradikinin, ki deluje v telesu vazodilatorno, kar pomeni da povzroča širjenje žil (Clare in Swaisgood, 2000).



Slika 2: Vpliv peptidnih inhibitorjev ACE na širjenje in krčenje žil (Pihlanto-Leppala, 2001)

2.7.1 Aktivnost angiotenzinske konvertaze

Opisanih je veliko metod s katerimi lahko kvantificiramo aktivnost ACE. Prav tako je v literaturi opisana uporaba različnih sintetičnih substratov (HHL, FAPGG), kot vir krajših peptidov, na katere deluje ACE in so nadomestek naravnih substratov. Osnova za določitev aktivnosti ACE je sprememba absorbance, ki nastane zaradi razgradnje substrata. Več kot je produkta, večja je aktivnost encima. Najpogostejše so v uporabi spektrofotometrične, radiološke, fluorometrične, kromatografske in elektroforetske metode. S temi metodami lahko pridobimo tudi informacije o inhibitorjem potencialu različnih ACE inhibitornih snovi (Lopez-Fandino in sod., 2006). Aktivnost angiotenzinske konvertaze lahko podajamo z enotami encimske aktivnosti (U). Ena U je enaka nastanku 1 μ mol hipurne kisline iz HHL v eni minuti pri temperaturi 37 °C.

2.7.2 Določanje ACE-inhibitorne aktivnosti ekstraktov tradicionalnih sirov

Med zorenjem sira se sprostijo številni peptidi z različno dolgimi verigami in različnim zaporedjem aminokislin. Večino teh peptidov štejemo med vmesne produkte, ki se lahko dalje hidrolizirajo še med prehodom skozi prebavila. Manjši ACE-inhibitorni peptidi (npr. IPP in VPP) se absorbirajo v krvni obtok in znižujejo krvni tlak *in vivo*. Pri določanju ACE-inhibitorne aktivnosti uporabljamo različne metode. Najbolj uporabljena je metoda po Cushman-u in Cheung-u iz leta 1971, ki sta uporabila hippuryl-histidyl-leucyl (HHL) kot substrat pri encimski reakciji. Inkubacija substrata z ACE privede do nastanka hipurne kisline, ki jo ekstrahiramo z etilacetatom, po odparevanju pa njeno koncentracijo izmerimo pri 228 nm s pomočjo spektrofotometra. Pri dodatku ACE-inhibitorjev (v našem primeru peptidov) v reakcijsko mešanico, dobimo sorazmerno manj produkta. Hipurno kislino lahko kvantitativno določimo tudi s pomočjo kromatografske ločbe reakcijske mešanice s HPLC. Alternativna metoda uporablja za substrat furanoakrilol-L-fenilalanil-glicil-glicin (FAPGG). ACE hidrolizira ta substrat do FAP in dipeptida GG, zmanjšanje absorbance zaradi razpada substrata pa merimo pri 340 nm (Sieber in sod., 2009).

Obstajajo velike razlike v ACE-inhibitorjem potencialu različnih sirov. Še vedno pa je zaradi metodoloških razlik ter pomanjkanja skupnih referenčnih snovi primerjava med ACE-inhibitornimi aktivnostmi posameznih vrst sira dokaj otežena (Sieber in sod., 2009).

2.7.3 ACE-inhibitorna aktivnost v času zorenja sira

V raziskavi, ki je vključevala vzorce gavde (mlade, srednje starane in zrele gavde), je bila najmočnejša ACE-inhibitorna aktivnost opažena v srednje staranih vzorcih gavde. Saito in sod. (2000) so poročali o nekoliko višji ACE inhibiciji pri gavdi, stari 24 mesecev (78,2%) kot pri 8-mesecev stari gavdi (75,5%). V siru festivo je ACE inhibicija dosegla vrednost 10% po 6 tednih zorenja, in se je povečala na 50% v 13. tednu, a zmanjšala na približno 30% po 20 tednih zorenja. V sirih cheddar, proizvedenih z različnimi probiotičnimi sevi, se je ACE-inhibitorna aktivnost povečala predvsem v prvih šestih tednih. Bistven vpliv na zorenje je imela temperatura (večja aktivnost pri 8 °C kot pri 4 °C). Povečanje temperature zorenja od 4 na 8 in 12°C je pospešilo proteolizo, kar je imelo pozitiven učinek na produkcijo ACE-inhibitornih peptidov (Sieber in sod., 2009).

Odkrite so bile tudi precejšnje razlike med različnimi vrstami sirov, kot tudi med posameznimi hlebci iste vrste. Rezultati v študijah kažejo, da je težko vplivati in nadzorovati sproščanje ACE-inhibitornih peptidov med zorenjem sirov (Sieber in sod., 2009).

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), v povezavi z masno spektrometrijo (MS), je bila uporabljena v številnih študijah za identifikacijo in kvantifikacijo ACE inhibitornih peptidov v siru, vendar je zaradi velikega števila različnih peptidov prisotnih v siru, izolacija, identifikacija in kvantifikacija ACE-inhibitornih peptidov ostala zahtevna naloga. Samo nekaj identificiranih ACE-inhibitornih peptidov predstavlja aktivno ACE inhibicijo *in vivo*, saj se večina teh peptidov razgradi že med prehodom skozi prebavila (Sieber in sod., 2009).

2.7.4 Laktotripeptida VPP in IPP

Laktotripeptida valil-prolil-prolin (Val-Pro-Pro, VPP) in izolevcil-prolil-prolin (Ile-Pro-Pro, IPP) sta pritegnila veliko pozornosti raziskovalcev v zadnjih nekaj letih zaradi komercialne uporabe v mlečnih izdelkih. Razvitih je bilo tudi mnogo patentov, da bi zaščitili njim komercialno rabo (Nakamura in Takano, 1995; Tossavainen in sod., 2005). Laktotripeptida sta bila sprva izolirana iz mleka, fermentiranega z *L. helveticus* in *Saccharomyces cerevisiae*. Oba peptida se pojavita v zaporedju beta-kazeina (Meyer in

sod., 2009). Proteolitična aktivnost izbranih sevov vrste *L. helveticus* je ključni dejavnik za sprostitve VPP in IPP med zorenjem sira (Nakamura in Takano, 1995).

Koncentracija ACE-inhibitornih peptidov VPP in IPP v sirih je odvisna od različnih dejavnikov, kot so: starterska kultura, toplotna obdelava mleka in pogoji med zorenjem sira. Zorenje sira ima pomemben vpliv na ACE-inhibitorne peptide, saj proteoliza stalno narašča (Meyer in sod., 2009).

Odmerki, približno 5 mg VPP in IPP dnevno, znižujejo krvni tlak tako osebam z visokim krvnim tlakom kakor tudi pri osebah, ki še nimajo visokega krvnega tlaka, vendar pa obstaja možnost, da ga bodo v prihodnosti imeli (Jauhiainen, 2007). Omenjeni učinek lahko dosežemo z vsakodnevnim zauživanjem sira. Nadaljnje študije bodo morale pokazati ali lahko z zaužitjem sira z visoko koncentracijo aktivnih ACE-inhibitornih peptidov znižamo krvni tlak. V zadnjem času pa je bilo v različnih študijah ugotovljenih precej nasprotujočih si rezultatov (Sieber in sod., 2009).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 LITERARNI VIRI

Posebne značilnosti smo povzeli iz dostopnih virov:

- Specifikacije (specifikacija za sir tolminc (Perko in Koren, 2003), specifikacija za bovški sir (Koren in sod., 2003), specifikacija za mohant (Renčelj in sod., 2001), specifikacija za nanoški sir (Perko in sod., 2002) ter vloži za priznanje porekla za kraški ovčji sir (Gerželj, 2006))
- Diplomске naloge (Cankar, 2007, Novak, 2006, Rondič, 1996., Tompa G. 2005)
- Doktorske disertacije in magistrske naloge (Katana Burja, 2006, Mohar Lorbeg, 2008, Tompa, 2010.)
- Člankov (Pompe in sod., 2005, Čanžek Majhenič in sod., 2007)

3.2 EKSPERIMENTALNI DEL

3.2.1 Reagenti

- Acetonitril (ACN) (Sigma, Nemčija)
- Deionizirana voda (dH₂O; milliQ)
- Hipurna kislina (Sigma, Nemčija)
- HHL (N-hipuril-histidil-levcin hidrat, Sigma, Nemčija; 100 mg)
- Kalijev dihidrogen fosfat (KH₂PO₄) (Sigma, Nemčija)
- Kalijev hidrogen fosfat (K₂HPO₄) (Sigma, Nemčija)
- Klorovodikova kislina (HCl) (Merck, Nemčija)
- Liofilizirano kunčje pljučno tkivo (Sigma, Nemčija)

- Natrijev klorid (NaCl) (Sigma, Nemčija)
- Trifluorocetna kislina (TFA) (Sigma, Nemčija)

3.2.2 Pribor in oprema

- Brizge (BD Plastipak, 1 in 5ml)
- Centrifuga (Sigma 3K18, Nemčija)
- Centrifugalni koncentrador 10.000 MWCO (Vivaspin)
- HPLC vial (Chromacol, Velika Britanija)
- RP-kolona (Phenomenex – Jupiter proteo, velikost por 90 Å, 4 µm)
- Ledomat
- Magnetno mešalo (Rotamix 545 MMH Tehnica, Slovenija)
- Mešalo za epruvete (Vibromix 10 Tehnica, Slovenija)
- Plastične epruvete z navojnim zamaškom – falkonke (50 in 15 mL, TPP, Švica)
- pH meter (Mettler Toledo MP220, Velika Britanija)
- Pipete (Thermo, Finn timer, Nemčija)
- Tekočinski kromatograf (HPLC Waters 2690, UV-Vis detektor 2487)
- Ultrazvočna kopel Sonis 4GT (Iskra, Pro, Slovenija)
- Plastične epruvete s pokrovčkom – epice (1,5 in 2 mL, Eppendorf, Nemčija)
- Vodna kopel (Bain Marie polystat, Bioblock, ZDA)
- Homogenizator – ultraturaks (IKA, Nemčija)
- Mikrofiltri Millex ®-HV (0,45 µm; Millipore, Nemčija)

3.2.3 Priprava raztopin

V preglednicah 1 – 4 je prikazana priprava raztopin, ki smo jih uporabljali med eksperimentalnim delom.

Preglednica 1: Priprava 0,1M fosfatnega pufera, $\text{pH}=8,3\pm0,1$ z 0,4 M NaCl

0,1 M K_2HPO_4 z 0,4 M NaCl	Količina
K_2HPO_4	8,709g
dH_2O	500 ml
NaCl	2,338 g
0,1 M KH_2PO_4 z 0,4 M NaCl	Količina
KH_2PO_4	2,722g
dH_2O	100 ml
NaCl	0,467g

Z 0,1 M KH_2PO_4 smo uravnali vrednost pH 0,1M K_2HPO_4 na $8,3 \pm 0,1$.

Preglednica 2: Priprava 5mM HHL

Sestavina	Količina
HHL	25,1 mg
0,1M fosfatni pufer, $\text{pH}=8,3 \pm 0,1$ z 0,4 M NaCl	10 ml

Preglednica 3: Priprava eluenta A

Sestavina	Količina
Trifluorocetna kislina	2 ml
dH_2O	1998 ml

Preglednica 4: Priprava eluenta B

Sestavina	Količina
Acetonitril	800 ml
Trifluoroacetna kislina	1 ml
dH ₂ O	199 ml

3.2.4 Oznake vzorcev sirov

Oznaka vzorca sira	Razlaga
T 1, T3, T4, T6, T7	Sir tolminc (različni dobavitelji)
B 12, B13, B14, B15, B17	Bovški sir (različni dobavitelji)
E1	Edamec (TUŠ)
G3*	Eksperimentalni sir narejen z dodatkom avtohtone mikroflore tolminca

G3* je eksperimentalni sir tolminc. Pri izdelavi so bili uporabljeni izolirani konzorciji avtohtone mikroflore sira tolminca; izolirali so samo najpogostejše predstavnike določenih bakterij in jih dodali pasteuriziranemu mleku.

3.2.5 Določanje vsebnosti dušika v vzorcih – Kjeldahlova metoda

Kjeldahlova metoda je bila razvita pred več kot 100 leti za določanje dušika v organskih in anorganskih snoveh. Čeprav so bile tehnike in naprave v preteklih letih spremenjene, so osnovna načela Kjeldahlove metode ostala enaka. Določanja dušika po Kjeldahlovi metodi opravljajo za meso, krmo, žita, odpadne vode ter številne druge vzorce. Metoda omogoča določanje proteinov glede na prisotnost dušika v vzorcu (upoštevamo, da je ves dušik, ki je prisoten v živilu proteinski) (Kjeldahl method for..., 2011).

Kjeldahlovo metodo razdelimo na tri postopke-korake:

- razklop,
- destilacija in
- titracija.

Vzorci razgradimo z mokrim sežigom. Z destilacijo z vodno paro ob dodatku močne baze sprostim NH_3 , ki ga lovimo v prebitek borne kisline in nato titiramo amonijev borat s standardno raztopino klorovodikove kisline.

Za preračunavanje dušika (N, %) v proteine (%) uporabljamo ustrezne faktorje (F).

$$\text{Proteini (\%)} = N \times F$$

Faktor za mlečne izdelke: $F=6,38$

Predhodno oborjene in filtrirane vzorce najprej razgradimo z mokrim sežigom (s pomočjo H_2SO_4 , katalizatorja in visoke temperature). V sežigno epruveto odpipetiramo 5 mL vzorca, dodamo 2 tableti bakrovega katalizatorja in 20 mL koncentrirane H_2SO_4 . Epruvete postavimo v stojala in pokrijemo s steklenimi zvonovi. Vse skupaj postavimo v ogreto enoto za razklop ($T = 370^\circ\text{C}$). Z vodno črpalko se odvaja zdravju škodljive hlape. Vzorce v epruvetah po enournem sežigu ohladimo na sobno temperaturo. Vsako epruveto nato posamično postavimo v destilacijsko enoto. V vsako epruveto avtomatsko dodamo 50 mL destilirane vode in 70 mL 10 M NaOH, nato na destilacijsko enoto priključimo še destilacijsko predložko v katero avtomatsko dodamo 60 mL borne kisline H_3BO_4 in pričnemo s 4 minutnim uvajanje pare v epruveto. Destilat, ki vsebuje NH_3 lovimo v destilacijsko predložko z nasičeno borno kislino. Po končani destilaciji vsebino epruvete zavržemo, uporabimo raztopino nastalega amonijevega borata v predložki. Titriramo ga z 0,1 M HCl do vrednosti pH 4.65. Titracija poteka avtomatsko po vnosu zatehtanega vzorca v kontrolno enoto. Ob koncu titracije zabeležimo porabo kisline, iz katere izračunamo delež dušika oz. delež proteinov v vzorcu (IDF Standard 20B, 1993).

3.2.6 Priprava vodotopnih ekstraktov sira

Vzorci sirov smo naribali ter 15 g vsakega vzorca prenesli v 50 ml plastično epruveto-falkonko. Nato smo prilili 30 ml destilirane vode (dH_2O). Zmes smo homogenizirali s pomočjo ultraturaksa (13.000 obratov/min; 10 min). Po homogenizaciji smo zmes stresali 60 minut pri 42°C v vodni kopeli. Dobljeni ekstrakt smo centrifugirali in sicer najprej 30 minut pri $5000 \times g$, nato smo odstranili maščobo in odpipetirali supernatant ter ponovno centrifugirali še 20 minut pri $10.000 \times g$. Zmes smo nato še filtrirali skozi filter (velikost por $0,45 \mu\text{m}$) in del filtrata tudi ultrafiltrirali, da smo pridobili ekstrakt, ki je vseboval

krajše peptide. Skupni dušik v vzorcih sira in vodotopnih ekstraktih smo določili s pomočjo Kjeldahlove metode.

3.2.7 Ultrafiltracija ekstraktov

Del pripravljenih ekstraktov (glej točko 3.2.6) smo odpipetirali ter jih ultrafiltrirali z ultrafiltracijskim koncentradorjem skozi membrano s prepustnostjo 3kDa (30 min, 3000 x g, 20 °C). Permeat (pod 3 kDa) smo uporabili za testiranje inhibitorne aktivnosti peptidov.

3.2.8 Ugotavljanje ACE-inhibitorne aktivnosti

3.2.8.1 Enota encimske aktivnosti

Ena enota encimske aktivnosti je enaka nastanku 1.0 μ mol hipurne kisline iz HHL na minuto v 100 mM Tris-HCl pufru z 300 mM NaCl in 10 μ M ZnCl₂ pri pH 8,3 in temperaturi 37 °C.

3.2.8.2 Ekstrakcija ACE iz liofiliziranega tkiva kunčjih pljuč

Pri ekstrakciji ACE iz liofiliziranega tkiva kunčjih pljuč smo uporabili metodo po Vermeirssen in sod. (2002) z manjšimi modifikacijami po Tompa (2010). Stehtali smo 1 g ekstrakta iz posušenih kunčjih pljuč, dodali 5 mL 0,1 M fosfatnega pufra, pH= 8,3 z 0,4 M NaCl ter 3 ure ekstrahirali s pomočjo ultrazvočne kopeli. Ves čas smo preverjali temperaturo in jo ohranjali na 4 °C z dodajanjem hladilnih blazinic. Po končanem ekstrahiranju smo ekstrakt z ACE centrifugirali 40 minut pri 25.400 x g in pri temperaturi 4 °C. Supernatant smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.8.3 Ugotavljanje ACE-inhibitorne aktivnosti vodotopnih ekstraktov sira s HPLC

ACE-inhibitorno aktivnost vodotopnih ekstraktov sirov smo ugotavljali po metodi Cushman-a in Cheung-a (1971) z modifikacijami po Hyun-u in Shin-u (2000) za kromatografsko določanje hipurne kisline (HA). Pri določanju ACE-inhibitorne aktivnosti smo kot substrat uporabili krajši sintetični peptid HHL, kjer pri encimski reakciji z ACE nastane produkt HA in peptid His-Leu (HL). Nastalo HA smo nato kvantificirali s pomočjo RP-HPLC. Ob dodatku ACE-inhibitorjev je nastalo med encimsko reakcijo posledično

manj HA, ki smo jo detektirali pri 228 nm in ločili s pomočjo gradientne elucije na kromatografskem sistemu.

V epice (1,5 mL) smo odpipetirali 20 μ L vzorca in 180 μ L 5 mM HHL. Dobljeno mešanico smo premešali s pomočjo mešala za epruvete in inkubirali v vodni kopeli 5 minut pri temperaturi 37 °C. Kontrolni vzorec (dve ponovitvi) je predstavljala raztopina 20 μ L destilirane vode (dH₂O) ter 180 μ L substrata HHL. Po inkubaciji smo mešanici dodali 60 μ L sveže pripravljenega ekstrakta ACE iz liofiliziranih kunčjih pljuč in jo premešali na magnetnem mešalu. Epice z reakcijsko mešanico smo nato inkubirali 30 minut pri temperaturi 37 °C. Končni volumen reakcijske mešanice je znašal 260 μ L. Po končani inkubaciji smo reakcijski mešanici dodali še 20 μ L 5 M HCl, da smo zaustavili encimsko reakcijo. Vsebino v epicah smo nato centrifugirali 5 minut pri 4500 x *g* in temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo z brizgo odvzeli supernatant in ga skozi mikrofilter (0,45 μ m) prefiltrirali direktno v vialo. S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) smo ločili komponente reakcijske mešanice in določili ploščino kromatografskega vrha HA.

V preglednicah 5 in 6 so prikazani pogoji kromatografske analize in gradient eluentov A in B.

Preglednica 5: Pogoji kromatografske analize

Lastnost	Vrednost
Pretok	1 mL/min
Čas trajanja analize	25 min
UV/VIS detektor	228 nm
Količina injiciranega vzorca	20 μ L

Preglednica 6: Gradient eluentov A in B

Čas (minute)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	99	1
24	12	88
26	12	88
30	99	1

ACE-inhibitorno aktivnost (AI) smo izračunali s pomočjo enačbe (Shalaby in sod., 2006):

$$AI(\%) = \left(\frac{HA_{kontrola} - HA_{vzorec}}{HA_{kontrola}} \right) \times 100 \quad (1)$$

kjer pomeni:

$HA_{kontrola}$ - ploščina kromatografskega vrha hipurne kisline brez prisotnosti inhibitorja v reakcijski mešanici (kontrolni vzorec)

HA_{vzorec} - ploščina kromatografskega vrha hipurne kisline ob dodatku vodotopnega ekstrakta sira v reakcijsko mešanico

Vrednost IC_{50} je predstavljala koncentracija vzorca (inhibitorja), ki je zmanjšala ploščino kromatografskega vrha HA za 50 %. IC_{50} smo določili s pomočjo regresijske premice grafa, pri katerem smo na abscisno os nanašali različno koncentracijo (razredčitve) vzorca v reakcijski mešanici, na ordinatno os pa odstotek ACE-inhibitorne aktivnosti.

3.2.8.4 Ugotavljanje peptidnega profila vodotopnih ekstraktov sirov

Kromatografski profil peptidov v vodotopnih ekstraktih smo pridobili s pomočjo RP-HPLC ločbe. Gradientno elucijo smo dosegli z uporabo dveh črpalk pri pretoku 1 ml/min. Eluent A je bil 0,1 % TFA v dH_2O , eluent B pa 0,1 % TFA v ACN. Delež ACN je linearno naraščal od 0 do 5 % med 0 in 16 minutami, od 5 do 46 % med 16 in 62 minutami in od 46 do 100 % med 62 in 72 minutami. Injicirali smo 70 μ l vodotopnega ekstrakta sirov. Peptide smo detektirali z UV detektorjem pri 214 nm.

4 REZULTATI

4.1 POSEBNE ZNAČILNOSTI SLOVENSКИH TRADICIONALNIH SIROV

Opisi posebnih značilnosti slovenskih tradicionalnih sirov se nahajajo v specifikacijah:

- specifikacija za sir tolminc (Perko in Koren, 2003),
- specifikacija za bovški sir (Koren in sod., 2003),
- specifikacija za sir mohant (Renčelj in sod., 2001)
- specifikacija za nanoški sir (Perko in sod., 2002) ter
- vloga za priznanje označbe porekla za kraški ovčji sir (Gerželj, 2006).

Značilnosti sirov so napisane v nadaljevanju:

Sir tolminc: zgornja in spodnja ploskev sta rahlo dvignjeni, obodna stran nekoliko izbočena. Uvrščamo ga med trde tipe sira. Ima obliko okroglega hlebca z določenimi dimenzijami kot so:

- teža od 3,5 - 5 kg;
- višina 8 – 9 cm in
- premer hlebca 23 – 27 cm.

Skorja sira je gladka ter slamnato rumenkaste barve. Na prerezu je testo gibko, povezano, rumenkaste barve, z redkimi očesi, velikosti leče ali graha. Okus in vonj sta značilna, čista, sladkega do pikantnega okusa. Normalno konzumno zrelost doseže pri najmanj 60 dneh do enega leta. Prireja mleka, izdelava sira ter priprava za trg lahko potekajo samo na območju zaščite.

Bovški sir: ima čvrsto, gladko in ravno skorjo, obodno stran rahlo izbočeno, z rahlo zaobljeni robovi, sivo rjave barve do zamolklo bež barve. Sir uvrščamo med trde tipe. Ima obliko okroglega hlebca, naslednjih dimenzij:

- teža od 3 do 4,5 kg,
- višina 8 do 10 cm,
- premer 24-28 cm.

Testo je kompaktno, elastično, povezano, s školjkastim lomom, lomljivo vendar ne drobljivo, enakomerno sivo bež barve, z redkimi, enakomerno razporejenimi, svetlikajočimi očesi, velikosti leče ali majhnega grahovega zrna ali redkimi, drobnimi luknjicami, majhnimi razpokami, ki pa ne prevladujejo. Testo dlje zorenih sirov je kompaktnejše in lomljivejše. Okus in vonj sta značilna aromatična, intenzivna, rahlo pikantna, značilna za klasično zoren ovčji sir. Normalna konzumna zrelost je dosežena pri starosti najmanj 60 dni do 90 dni, lahko tudi do 2 leti. Surovina za izdelavo je ovčje mleko ali mešanica ovčjega in kozjega mleka, pri kateri delež kozjega mleka ne sme presegati 30 %.

Sir mohant: uvrščamo med pol mehki tip sira. Zavzema obliko embalaže. Lončki morajo biti dobro tesnjeni in skrbno napolnjeni v embalažnih enotah po 10 dkg, 20 dkg in 50 dkg. Površina sira je gladka, poravnana, suha, mazasta. Testo je izenačeno, gladko, delno elastično, težko mazavo do mazavo, zgneteno, lahko malo grudasto. Okus in vonj sta značilna, tipična za mohant, okus je čist, pikanten, oster vendar ne pekoč, lahko malo greni. Sir zoren več kot dva meseca lahko greni, okus in vonj sta agresivna, izredno močno izražena, prvi vtis je lahko celo odbijajoč, predvsem vonj. Barva ja belkasto rumena, bež, svetlo maslena. Normalna konzumna zrelost je pri dveh mesecih, lahko tudi do tri mesece. Dovoljena je prodaja, predvsem v poletnih mesecih, že po mesecu in pol.

Kraški ovčji sir: uvrščamo med trde tipe sira. Je prav tako oblike okroglega hlebca, z naslednjimi dimenzijami:

- teža 2,5 do 5 kg,
- višina 9 do 10 cm in
- premer 20 do 26 cm.

Skorja je na zunaj gladka, ravna, z rahlo izbočeno obodno stranjo in sivo rjave barve. Na prerezu je testo kompaktno, povezano, lomljivo vendar ne drobljivo, enakomerno sivo bež barve, načelno brez očes ali z drobnimi, redkimi očesi v velikosti majhne leče. Prisotna je lahko drobna luknjičavost ali drobne razpoke, ki pa ne prevladujejo. Testo starejših sirov je bolj kompaktno do školjkasto lomljivo. Okus in vonj sta aromatična, intenzivna, polna do rahlo pikantna, značilna za ovčji sir. Normalna konzumna zrelost je pri najmanj 60 dni do 90 dni, lahko tudi do enega leta.

Nanoški sir: je trdi tip sira, oblike okroglega hlebca naslednjih dimenzij:

- teža 8 do 10 kg,
- višina 8 do 10 cm in
- premer 34 cm.

Skorja je na zunaj gladka, suha in čvrsta brez razpok in poškodb, rumene barve, z odtenkom opečnato rdeče barve (ponekod so lahko vidne sledi plesni kot posledica zorenja). Oblika koluta je ravna. Na prerezu je sir intenzivno rumene barve. Testo je elastično, gibko, prožno, gladko čvrsto, v njem pa so posejana očesa, velikosti graha. Okus je rahlo pikanten, prijetno slan in intenziven, vonj je čist, neizrazit, nevsiljiv. Normalno konzumno zrelost doseže sir pri najmanj 60 dni, lahko ga zorimo do enega leta.

V preglednici 7 je prikazana kemijska sestava tradicionalnih slovenskih sirov.

Preglednica 7: Kemijska sestava tradicionalnih slovenskih sirov (Perko in Koren, 2003; Koren in sod., 2003; Renčelj in sod., 2001; Renčelj, 2008; Perko in sod., 2002)

Sir	% suhe snovi	% maščobe v suhi snovi	% vode	% soli
Sir tolminc	najmanj 60 %	45 %	35 – 40 %	1,5 – 2,5 %
Bovški sir	najmanj 60 %	45 %	ni podatka	1,5 – 2,5 %
Sir mohant	ni podatka	35 % do 55 %.	58 % do 70 %	1,5 – 2,5 %
Kraški ovčji sir	najmanj 60 %	najmanj 45 %	ni podatka	1,5 – 2,5 %
Nanoški sir	najmanj 60 %	najmanj 45 %	35 – 40 %	1,5 – 2,5 %

4.1.1 Hlapne organske spojine

Kar nekaj študij je bilo usmerjenih v iskanje markerjev prepoznavnosti za slovenske tradicionalne sire.

Tompa (2005) je ugotovil, da se v slovenskih tradicionalnih sirih nahajajo naslednji monoterpeni: α -pinen, kamfen, α -felandren, β -pinen, β -karen, limonen in γ -terpinen. Hipotezo, da obstaja povezava med geografskim poreklom in terpensko sestavo sira je preskusil na štirih slovenskih sirih, kjer je sire s posebno metodo ekstrakcije in uporabo GC-MS ločil na podlagi njihove terpenske sestave. Trije so bili iz kravjega mleka (nanoški sir, tolminc in mohant), četrti je bil narejen iz ovčjega mleka (bovški sir). Analizirane sire iz kravjega mleka izdelujejo v treh različnih klimatskih področjih, kar se je odražalo v različni terpenski sestavi tradicionalnih sirov. Avtor navaja, da se terpenski sestavi nanoškega sira in sira mohant zelo razlikujeta, kar pripisuje revnejši terpenski sestavi krme na območju Nanoške planote in bogatejše terpenske sestave krme na višje ležečem alpskem območju. Navedeno je tudi, da je mohant vseboval poleg vseh terpenov, vsebovanih v nanoškem siru, še kamfen, γ -terpinen ter 2-karen, ki je bil tudi značilen za mohant in ga pri drugih vrstah sirov niso zasledili. Ob primerjavi sirov tipa tolminc in bovškega sira večje razlike v terpenski sestavi niso zasledili. Razmerje posameznih terpenov v različnih hlebcih tolminca in bovškega sira je sicer nihalo, vendar so bili podobni terpeni identificirani tako v tolmincu, ki je proizveden iz kravjega mleka, kot bovškem siru, ki je proizveden iz ovčjega mleka, oba sira pa izdelujejo na istem geografskem področju.

4.1.2 Maščobnokislinska sestava

Novak (2006) je podrobneje raziskal maščobnokislinsko sestavo kraškega ovčjega sira, Analizirani vzorci so se statistično značilno razlikovali glede na sezono izdelave, časa zorenja in pašo živali. Vsebnost hlapnih maščobnih kislin je avtor ugotavljal z modificirano metodo etrske ekstrakcije hlapnih maščobnih kislin. Vseh 19 analiziranih vzorcev sirov je vsebovalo od hlapnih maščobnih kislin največ očetne kisline, sledila ji je krotionska kislina, propionsko kislino pa so določili le v enem vzorcu sira. Avtor navaja, da sta v kraškem ovčjem siru prevladujoči maščobni kislini palmitinska in oleinska, sledijo jima stearinska, miristinska in kaprinska maščobna kislina.

V vzorcih so določili tudi dve izomeri konjugirane linolne kisline in sicer najbolj zastopana izomera cis-9, trans-11 C18:2 ter izomera trans-10, cis-12 C18:2.

Skozi potek raziskave in opravljenih analiz je Novak (2006) prišel do naslednjih sklepov:

- Maščobnokislinska sestava kraškega ovčjega sira je tipična za trdi tip ovčjega sira, z relativno visokim deležem kratkoverižnih maščobnih kislin.
- V vzorcih sirov prevladuje palmitinska kislina, sledi ji oleinska, stearinska in miristinska kislina.
- Siri se statistično značilno razlikujejo v večini maščobnih kislin glede na stadij laktacije in nadmorsko višino paše.
- V vzorcih sirov je relativno velik delež CLA in ugodno razmerje n-6/n-3 maščobnih kislin.

Pri osnovni maščobno-kislinski sliki sirov ni opazil bistvenih razlik, očitne razlike pa so se pokazale v vsebnosti hlapnih maščobnih kislin, ki so odraz fermentacijskih procesov. Razlike v maščobno kislinski sestavi je ugotovil med siri, izdelanimi iz mleka dolinske in višinske paše, kar bi bila lahko ena od pomembnih karakteristik pri oceni sirov.

Ugodnejša maščobnokislinska sestava glede razmerja med nasičenimi in nenasičenimi maščobnimi kislinami je bila ugotovljena v vzorcih sirov dolinske paše vendar velja poudariti, da imajo vzorci sirov iz višinskih paš boljše razmerje n-6/n-3 maščobnih kislin, nekoliko višjo vsebnost CLA ter večji delež kratkoverižnih maščobnih kislin.

4.1.3 Mikrobiološke značilnosti slovenskih tradicionalnih sirov

Edinstvena aroma in tekstura tradicionalnih sirov, narejenih iz surovega mleka, je v veliki meri posledica fermentacije in zorenja sira, ki potekata kot rezultat delovanja mlečnokislinskih bakterij, ki poseljujejo okolje prireje in predelave mleka ter molzne živali, od koder pridejo tudi v mleko. Čanžek Majhenič in sod. (2007) so ugotovili, da predstavljajo največji delež mikrobne populacije tradicionalnih slovenskih sirov laktobacili in enterokoki. Ugotovili so, da med izolati laktobacilov prevladujejo sevi vrst *Lactobacillus paracasei* in *L. plantarum*.

Pri raziskavah mikroflore slovenskih tradicionalnih sirov so raziskovalci veliko pozornosti posvetili karakterizaciji enterokokov, njihovi rezistenci proti antibiotikom in prisotnosti virulenčnih dejavnikov, torej lastnostim, pomembnim iz varnostnega vidika. V raziskave so bili vključeni tradicionalni slovenski siri tolminc, mohant, nanoški sir, kraški ovčji sir in bovški sir. Poleg sirov so analizirali tudi vzorce mleka, sirnine in blata živali molznic, saj jih je poleg fenotipske in genotipske pestrosti, zanimal tudi izvor enterokokov v sirih. S klasično metodo gojenja na ploščah (uporabljali so gojišče CATC) so ugotavljali število prisotnih enterokokov v posameznih vzorcih. V mleku in sirnini je bilo 10^3 do 10^6 ke/g enterokokov, v siru se je njihovo število gibalo med 10^3 in 10^7 ke/g, v blatu pa med 10^4 in 10^5 ke/g. Ugotovili so, da so si izolati iz različnih področij in iz različnih sirov zelo podobni, ter da so izolati iz blata živali večinoma združeni v ločenih fenotipskih skupinah, kar kaže na to, da blato živali ni glavni izvor enterokokov v mleku. Pripadnost izolatov rodu *Enterococcus* so ugotavljali s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in s PCR z za rod specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, pripadnost posameznim vrstam pa s PCR z za vrsto specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Fenotipsko so vsi, razen enega izolata, pripadali rodu *Enterococcus*, kar so potrdili tudi s PCR. V mleku, sirnini in siru so bili najpogostejše prisotni sevi vrst *E. faecalis* in *E. faecium*, poleg teh vrst pa so v mleku in sirnini našli še vrste *E. casseliflavus* in *E. gallinarum* (Mohar Lorbeg, 2008; Čanžek Majhenič in sod., 2007; Katana Burja, 2006).

Mikrobiološka karakterizacija za nanoški sir (Rondič, 1996), obravnava sestavo mikrobne populacije na površini nanoškega sira in spreminjanje sestave skozi 60 dnevno dobo zorenja sira. Na površini nanoškega sira so prisotne različne skupine mikroorganizmov, koliformne in MKB, mikrokoki, plesni (60 do 80 % pripada rodu *Penicillium*) in kvasovke (sevi iz rodov *Saccharomyces kluyveri*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia guilhermondii*, *Leucosporidium scottii*, *Rhodosporium*... str.13/15). Prav naštete kvasovke so posebnost tega sira (Marc in Žvokelj, 2002).

Tipično mikrofloro kraškega ovčjega sira sestavljajo koliformne bakterije in mlečno kislinke bakterije (laktokoki, enterokoki, laktobacili). Med enterokoki je prevladovala vrsta *Enterococcus faecalis*, med laktobacili pa vrste *Lactobacillus paracasei* (59 %), *L. plantarum* (12%) in *L. brevis* (Rogelj, 2005).

Pri mikrobioloških analizah sedmih vzorcev sira mohant so ugotovili veliko variabilnost mikrobne populacije v siru. Ugotovljena je bila prisotnost laktokokov, laktobacilov, streptokokov, veliko izolatov pa je izkazovalo proteolitično aktivnost (Renčelj in sod., 2001).

V tehnološkem postopku izdelave in pri zorenju tolminskega sira je pomembnih več vrst mikroorganizmov: *Lactococcus lactis*, subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis*, subsp. *cremoris*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*; *Lactobacillus casei*, *L. helveticus*, *L. delbruckii* subsp. *lactis*, *L. delbruckii* subsp. *bulgaricus*; *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* ter kot v vseh alpskih sirih tudi prisotnost *Enterococcus faecium* in *E. faecalis* (Slanovec, 1982).

4.2 ACE – INHIBITORNI PEPTIDI V SIRU TOLMINC IN BOVŠKEM SIRU

4.2.1 Celokupni dušik v vzorcih sirov

V eksperimentalnem delu smo v vzorcih sira tolminc in bovškega sira najprej določili vsebnost celokupnega dušika (TN), vodotopnega dušika (WSN) ter vsebnost dušika v ekstraktih sirov.

V preglednici 8 so prikazani podatki o vsebnosti celokupnega dušika v vzorcih sirov.

Preglednica 8: Celokupni dušik v vzorcih sirov

Sir*	gN/100g (prva meritev)	gN/100g (druga meritev)	Povprečje (gN/100g)	Standardni odklon
T1	4,203	4,222	4,213	0,013
T3	4,164	4,160	4,162	0,003
T4	4,169	4,225	4,197	0,040
T6	4,060	4,231	4,146	0,121
T7	4,268	4,304	4,286	0,025
B12	4,150	4,214	4,182	0,045
B13	4,092	4,071	4,082	0,015
B14	4,103	4,120	4,112	0,012
B15	4,094	4,020	4,057	0,052
B17	4,155	4,128	4,142	0,019
E1	3,907	3,871	3,889	0,025
G3	3,254	3,421	3,338	0,118

* oznake vzorcev so opisane v poglavju 3.2.4

Vsebnost dušika v analiziranih vzorcih je znašala od $3,338 \pm 0,118$ gN/100g pri vzorcu sira G3 do $4,286 \pm 0,025$ gN/100g pri vzorcu sira T7. Najmanjše odstopanje je opazno pri vzorcu sira T3, ter največ pri vzorcu sira T6.

4.2.2 Vodotopni dušik v vzorcih sira

Količina vodotopnega dušika v analiziranih sirih je prikazana v preglednici 9.

Preglednica 9: Vodotopni dušik v vzorcih sira

filtrat	vzorec (mL)	titracija 1 (mL)	titracija 2 (mL)	povprečje (mL)	gN/100mL vzorca	slepa
T1	2,5	9,091	9,131	9,111	0,508	0,050
T3	10	25,715	25,692	25,704	0,359	0,060
T4	10	36,153	36,130	36,142	0,505	0,060
T6	10	31,958	31,917	31,938	0,447	0,060
T7	10	22,723	22,554	22,639	0,316	0,060
B12	10	34,782	35,392	35,087	0,491	0,060
B13	10	22,667	23,175	22,921	0,320	0,060
B14	10	28,595	28,521	28,558	0,399	0,060
B15	10	16,656	16,739	16,698	0,233	0,060
B17	10	26,482	26,543	26,513	0,371	0,060
E1	10	18,196	18,214	18,205	0,254	0,060
G3	2,5	14,598	14,659	14,629	0,815	0,082

Pri prvi titraciji z 0,1 M HCl so vrednosti zavzemale od 9,091 mL do 36,153 mL pri vzorcih tolminskega sira, pri bovškem siru pa od 16,656 ml do 34,782 ml. Pri drugi titraciji so bile pri tolminskem siru od 9,131 mL do 36,130 mL ter pri bovškem siru od 16,739 ml do 35,392 ml. Sklepamo lahko, da je bila pri vzorcu sira G3 proteoliza najbolj učinkovita, saj je vseboval največ vodotopnega dušika (0,815 gN/100g). Večina peptidov je namreč topna v vodi in večja kot je vrednost vodotopnega dušika, bolj učinkovita je proteoliza, posledično pa tudi večja verjetnost za nastanek bioaktivnih peptidov.

4.2.3 Indeks proteolize

V preglednici 10 se nahajajo podatki za indeks proteolize.

Preglednica 10: Indeks proteolize

Vzorec	TN (gN/100g)	Skupni proteini (g/kg sira)	WSN (gN/100g)	WSN (g proteinov/kg sira)	Indeks proteolize WSN/TN x 100 %
T1	4,213	268,758	1,015	64,779	24,10
T3	4,162	265,536	0,718	45,832	17,26
T4	4,197	267,769	1,011	64,488	24,08
T6	4,146	264,483	0,893	56,974	21,54
T7	4,286	273,447	0,633	40,354	14,76
B12	4,182	266,812	0,981	62,604	23,46
B13	4,082	260,400	0,640	40,859	15,69
B14	4,112	262,314	0,798	50,934	19,42
B15	4,057	258,837	0,466	29,736	11,49
B17	4,142	264,228	0,741	47,278	17,89
E1	3,889	248,118	0,508	32,430	13,07
G3	3,338	212,933	1,630	103,995	48,84

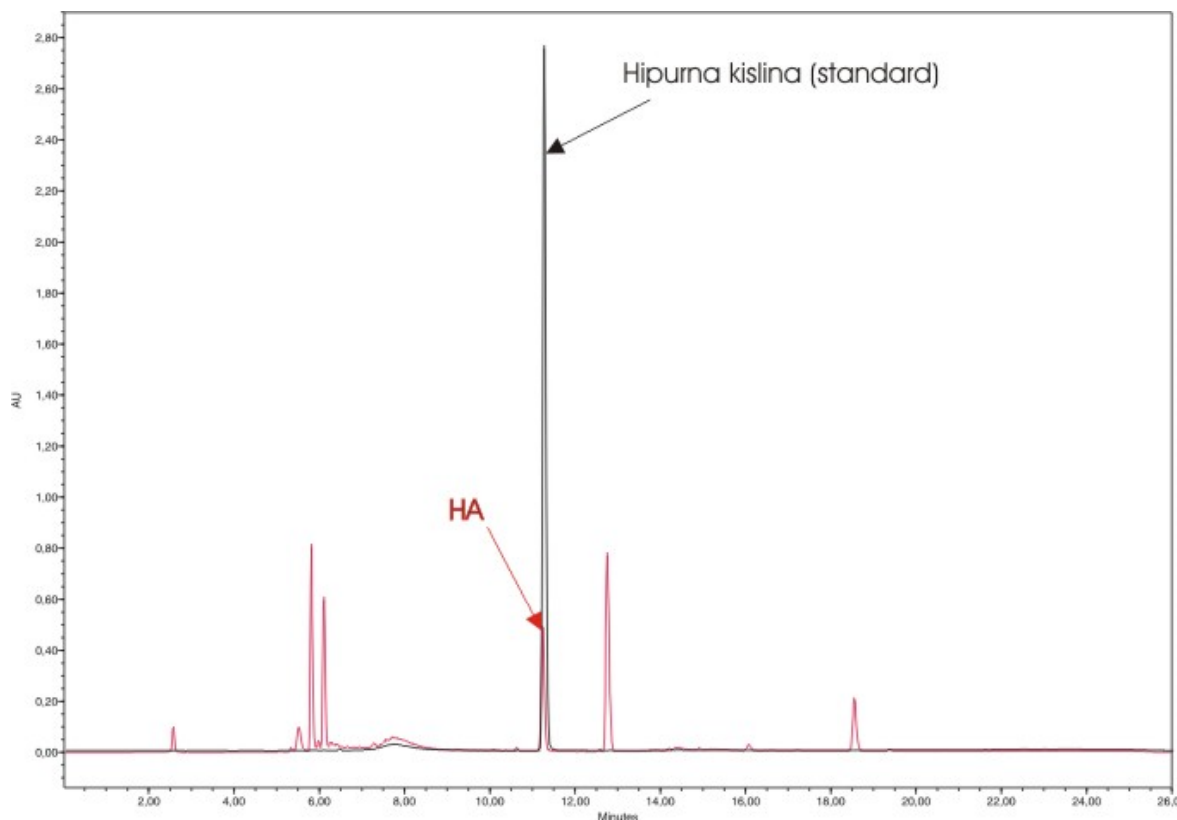
Analizirani vzorci so v 100 gramih vsebovali od 3,34 do 4,29 g celokupnega N (TN/100g sira). Vzorci tolminskega sira so tako vsebovali od 4,146 g TN/100g sira do 4,286 g TN/100g sira, vzorci bovškega sira pa od 4,057 g TN/100g sira do 4,182 g TN/100g sira. Pri primerjavi vsebnosti proteinov je bila najnižje izmerjena vrednost pri vzorcu sira z oznako G3 in sicer 212,933 g/kg, največ proteinov g/kg vzorca med vzorci sirov pa smo izmerili pri vzorcu sira z oznako T7. Vrednosti se med posameznimi vrstami sira niso bistveno razlikovale. Vsebnosti vodotopnega dušika (WSN gN/100g vzorca) je znašala 0,466 gN/100g sira pri vzorcu B15 in 1,630 gN/100g vzorca pri vzorcu z oznako G3.

Posledično smo za sir G3 tudi določili največji indeks proteolize med vzorci, ki je znašal 48,84 % in najmanjši pri B15, ki je znašal 11,49 %.

4.2.4 Analiza ACE-inhibitorne aktivnosti

4.2.4.1 HPLC kromatogram reakcijske mešanice brez dodatka inhibitorja

Na sliki 3 je prikazan HPLC kromatogram reakcijske mešanice brez dodatka inhibitorja.

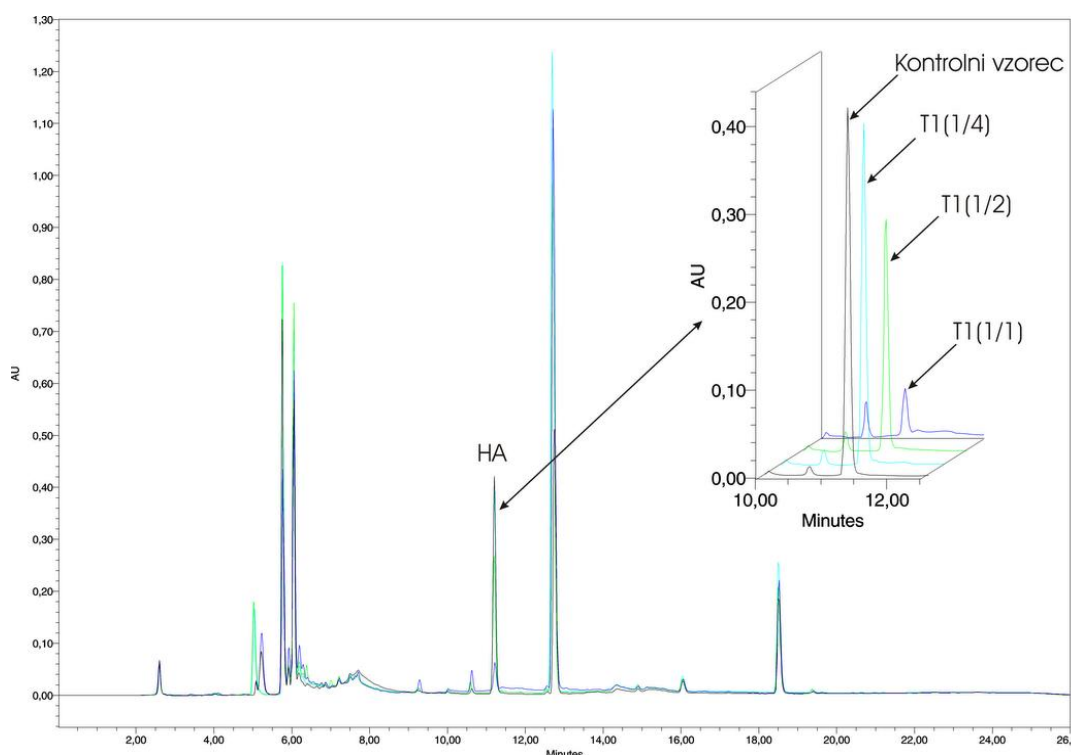


Slika 3: HPLC kromatogram reakcijske mešanice brez dodatka inhibitorja (kontrolni vzorec) in kromatogram standardne raztopine hipurne kisline (2 mM)

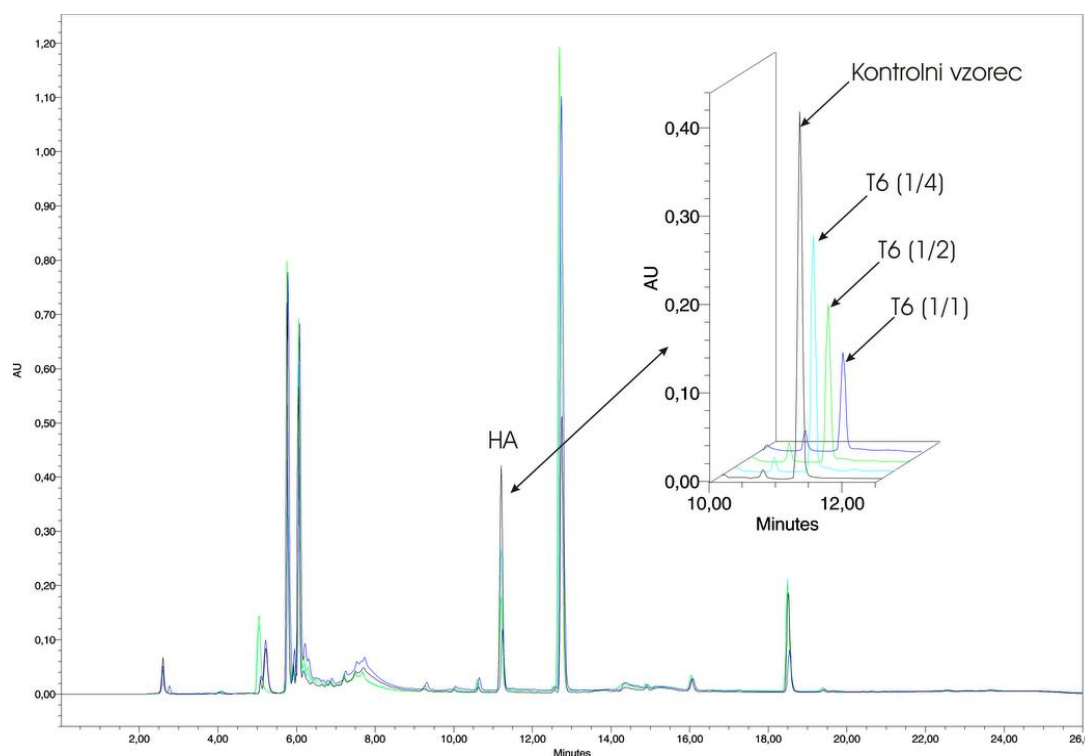
Na kromatogramu (Slika 3) je prikazana ločba reakcijske mešanice, kjer pri reakciji ACE s HHL nastane produkt hipurna kislina (HA). Retencijski čas za hipurno kislino smo določili pri 11,00-11,50 min. Na podlagi teh meritev (predstavljale so koncentracijo nastale HA pri kontrolnem vzorcu), smo kasneje lahko izračunali ACE-inhibitorno aktivnost peptidov, prisotnih v ekstraktih sirov.

4.2.4.2 ACE-inhibitorna aktivnost vodotopnih ekstraktov sirov

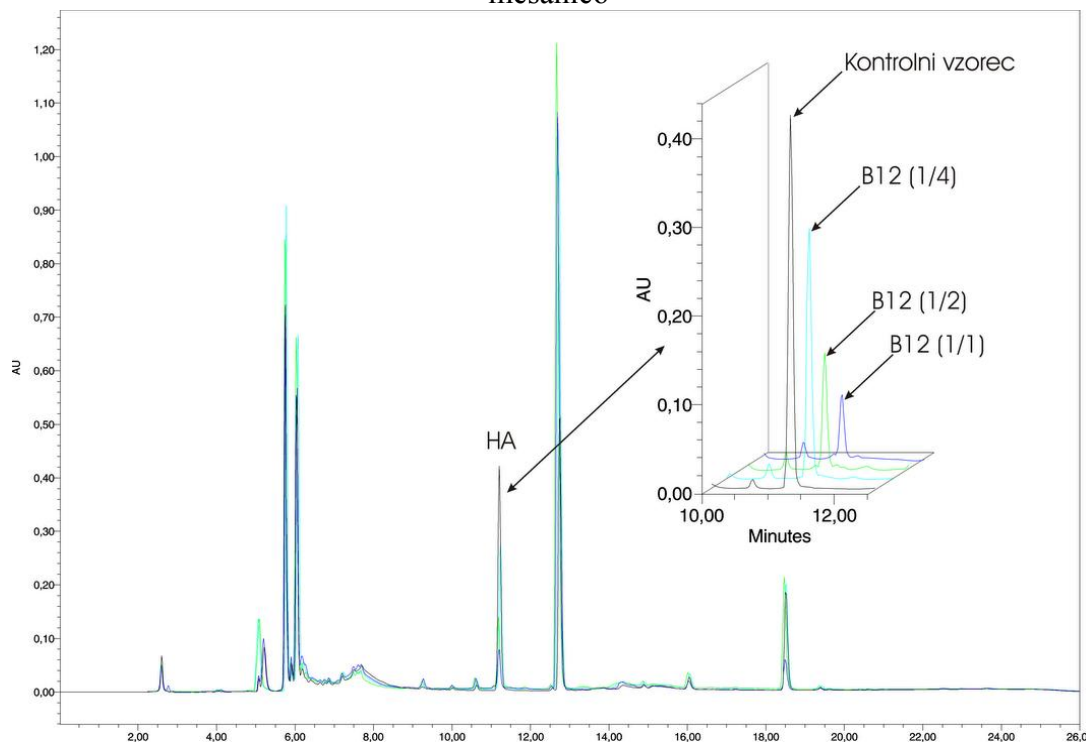
Iz slik 4, 5, 6 in 7 je razvidno, da se produkcija HA zmanjša ob dodatku ACE-inhibitornih peptidov iz ekstrakta. Razlike v koncentraciji HA so podrobneje prikazane za dodatek različno razredčenih ($1/2$; $1/4$) vodotopnih ekstraktov sirov v reakcijsko mešanico. Razvidno je, da je bila inhibicija encima pri manj razredčenih vzorcih večja.



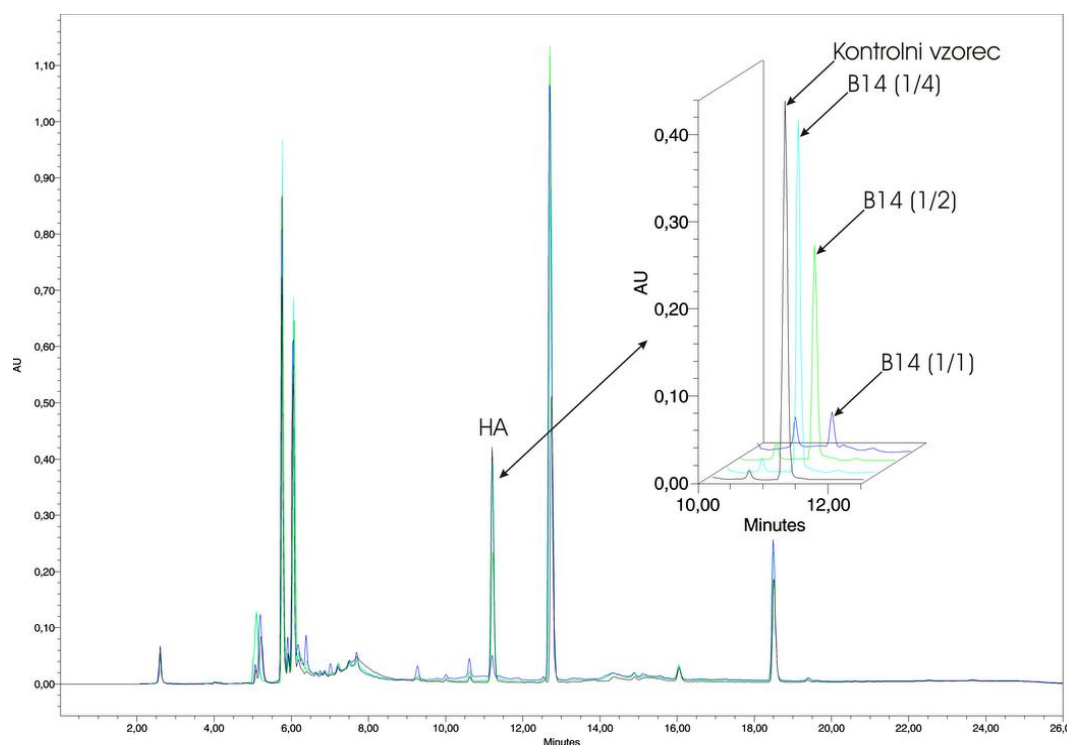
Slika 4: Nastanek HA ob dodatku različno razredčenega ekstrakta T1 v reakcijsko mešanico



Slika 5: Nastanek HA ob dodatku različno razredčenega ekstrakta T6 v reakcijsko mešanico



Slika 6: Nastanek HA ob dodatku različno razredčenega ekstrakta B12 v reakcijsko mešanico

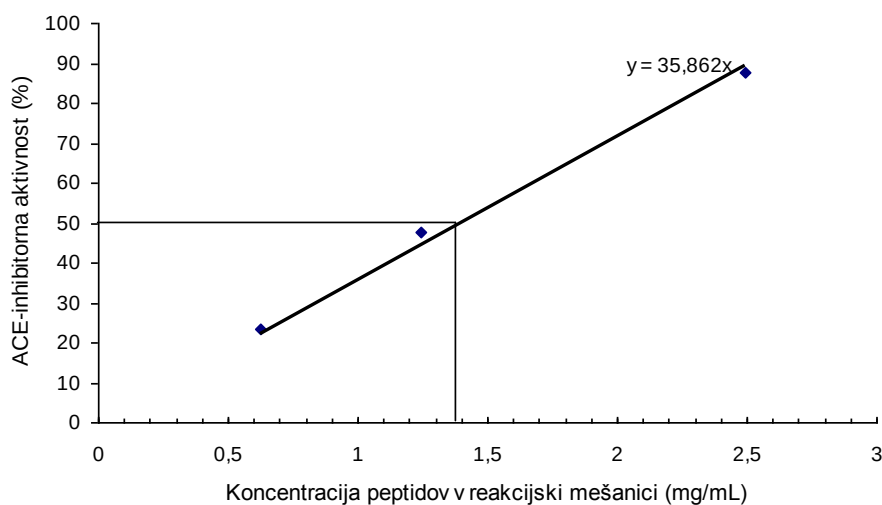


Slika 7: Nastanek HA ob dodatku različno razredčenega ekstrakta B14 v reakcijsko mešanico

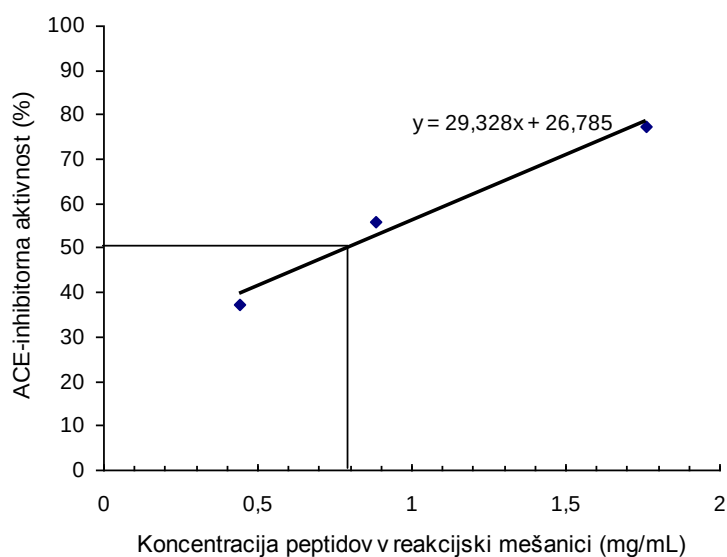
4.2.5 Določanje vrednosti IC_{50} pri ekstraktih sira

V slikah 8 do 18 so prikazane ocene IC_{50} pri analiziranih sirih.

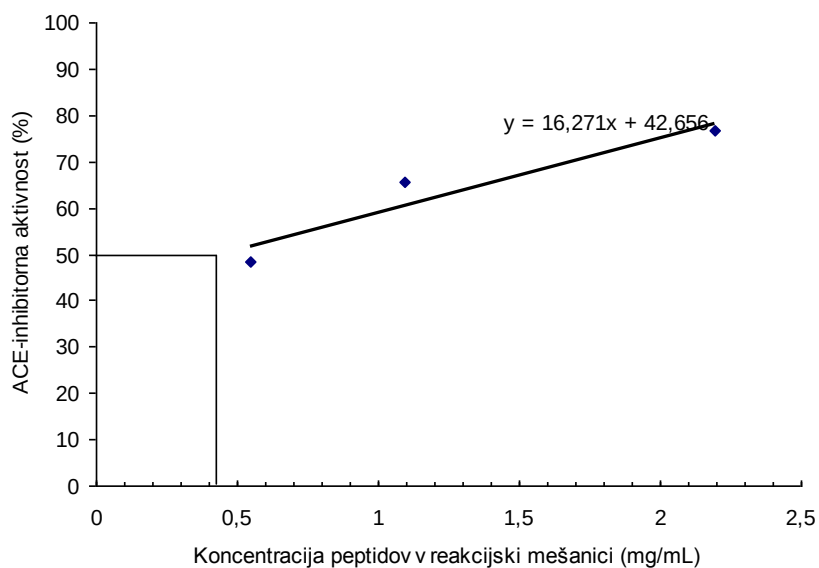
Točke na slikah predstavljajo povprečne vrednosti inhibicije ACE dveh meritev.

Slika 8: Ocena IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira T1

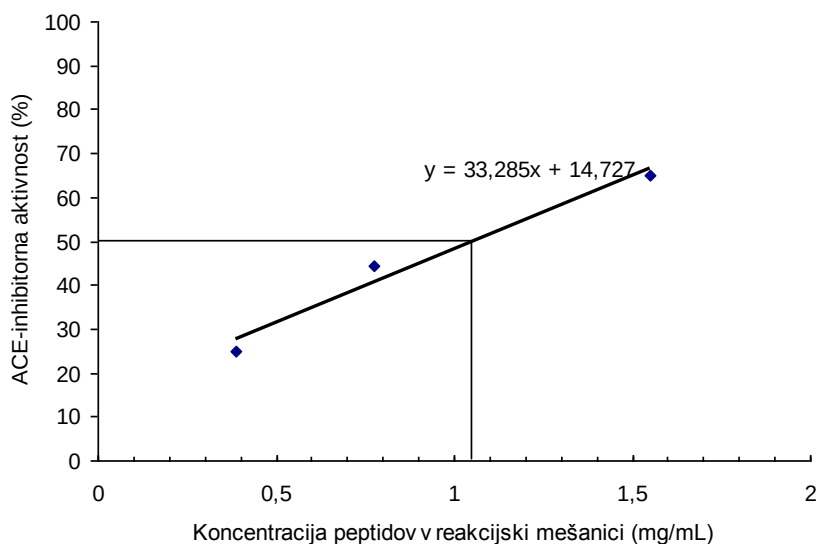
Ocenjena vrednost IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira T1 je znašala 1,394 mg prot/ml reakcijske mešanice (Preglednica 11).

Slika 9: Ocena IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira T3

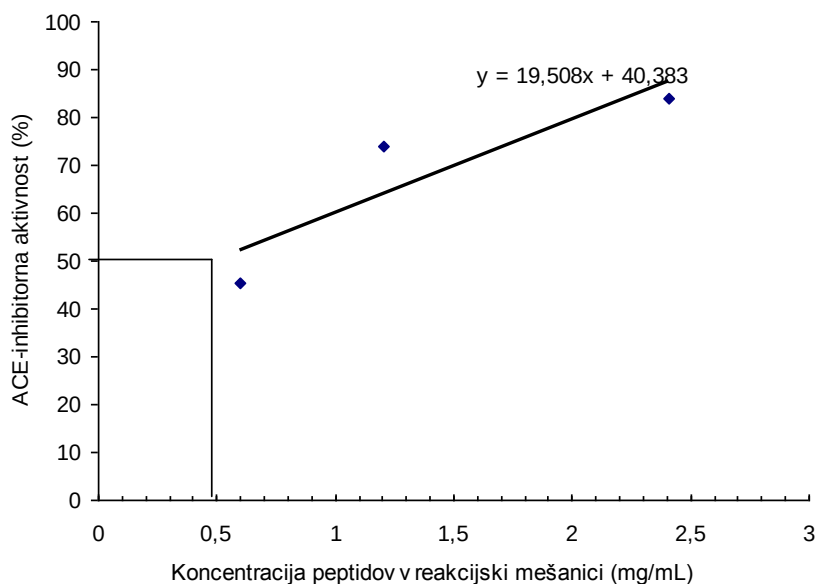
Ocenjena vrednost IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira T3 je znašala 0,792 mg prot/ml reakcijske mešanice (Preglednica 11).

Slika 10: Ocena IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira T6

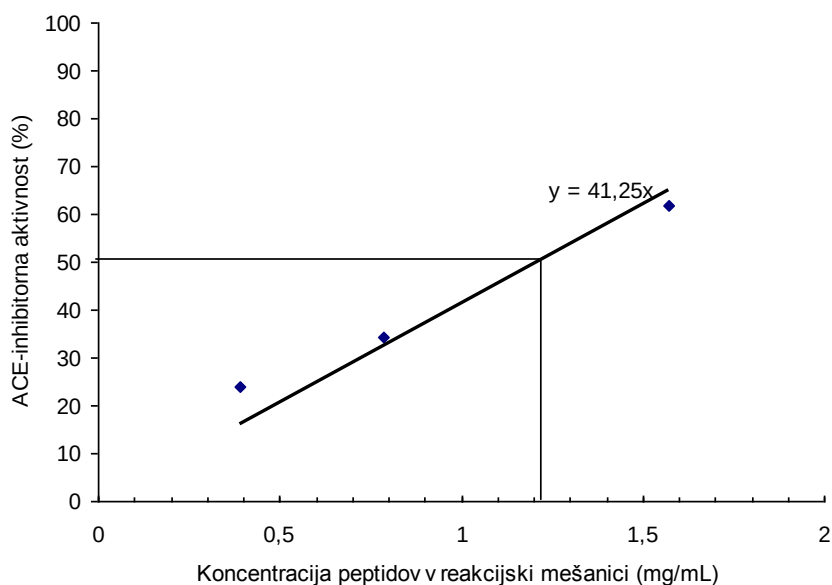
Ocenjena vrednost IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira T6 je znašala 0,451 mg prot/ml reakcijske mešanice (Preglednica 11).

Slika 11: Ocena IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira T7

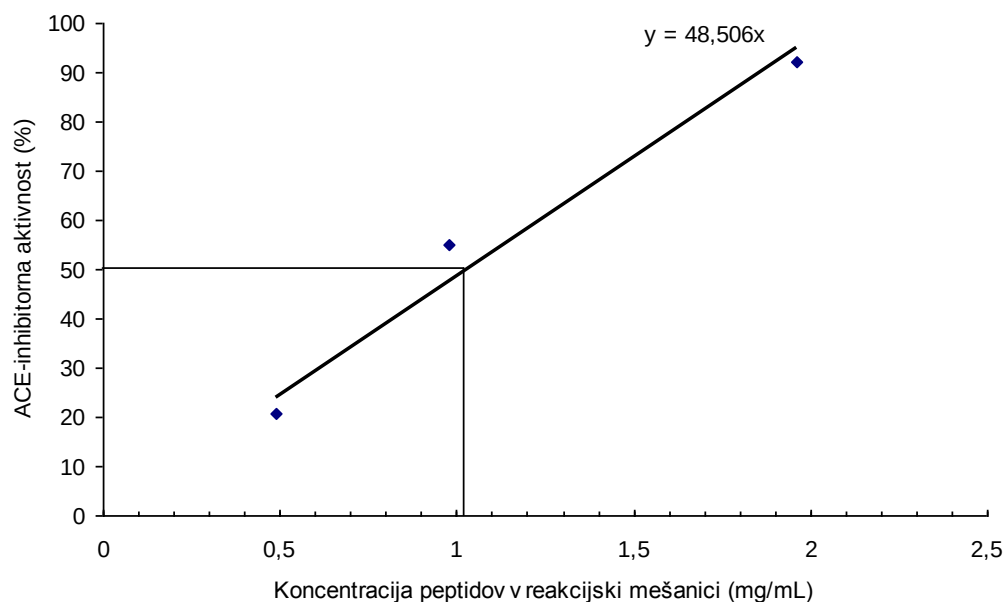
Ocenjena vrednost IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira T7 je znašala 1,060 mg prot/ml reakcijske mešanice (Preglednica 11).

Slika 12: Ocena IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B12

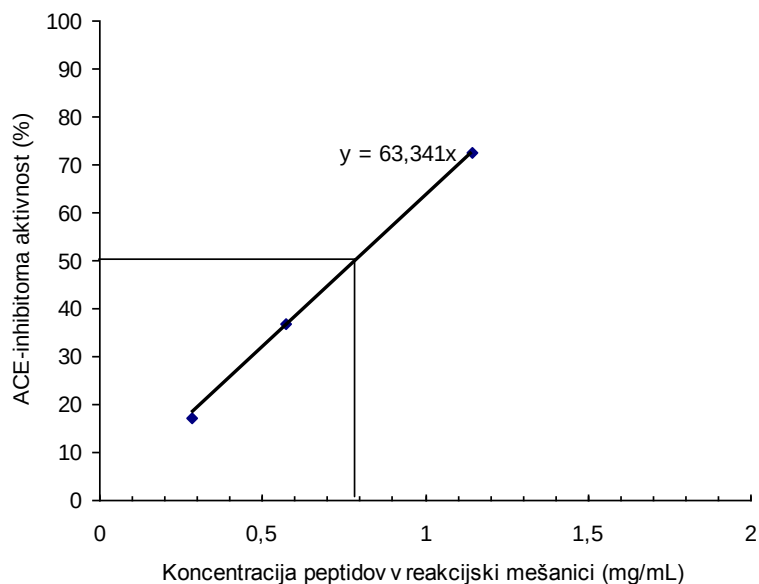
Ocenjena vrednost IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B12 je znašala 0,493 mg prot/ml reakcijske mešanice (Preglednica 11).

Slika 13: Ocena IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B13

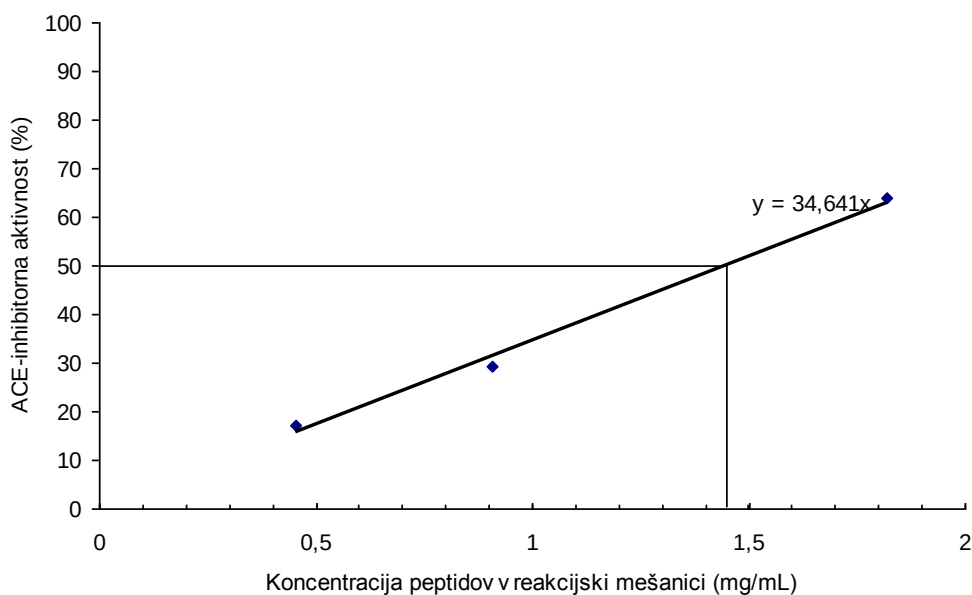
Ocenjena vrednost IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B13 je znašala 1,212 mg prot/ml reakcijske mešanice (Preglednica 11).

Slika 14: Ocena IC₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B14

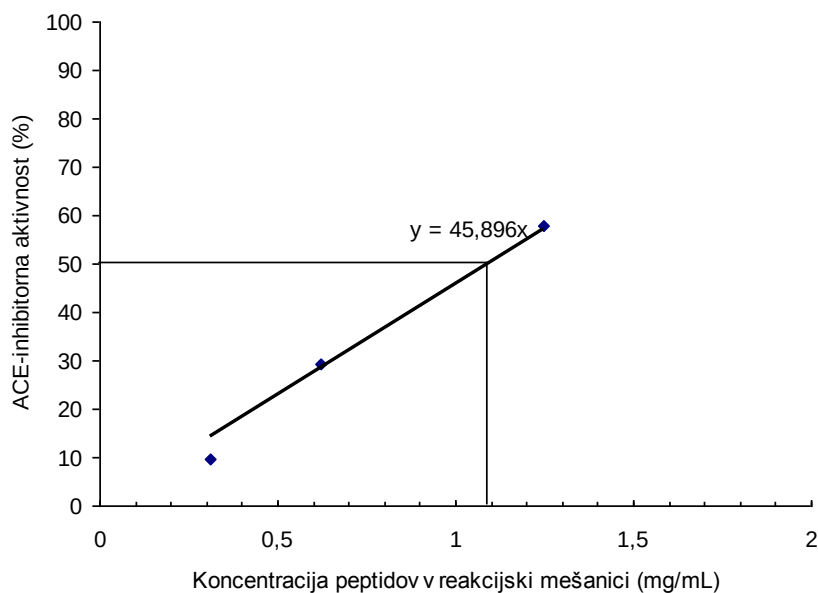
Ocenjena vrednost IC₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B14 je znašala 1,031 mg prot/ml reakcijske mešanice (Preglednica 11).

Slika 15: Ocena IC₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B15

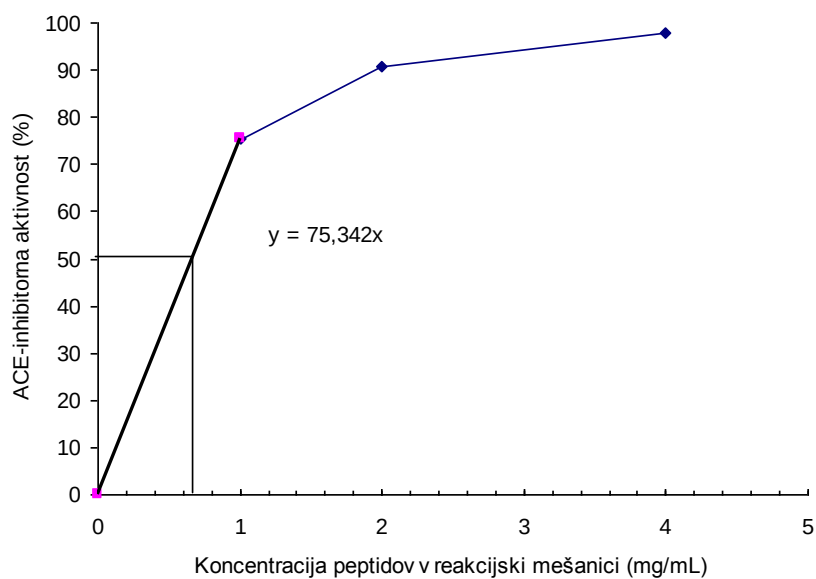
Ocenjena vrednost IC₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B15 je znašala 0,789 mg prot/ml reakcijske mešanice (Preglednica 11).

Slika 16: Ocena IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B17

Ocenjena vrednost IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira B17 je znašala 1,443 mg prot/ml reakcijske mešanice (Preglednica 11).

Slika 17: Ocena IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira E1

Ocenjena vrednost IC_{50} za vzorec vodotopnega ekstrakta sira E1 je znašala 1,089 mg prot/ml reakcijske mešanice (Preglednica 11).



Slika 18: Ocena IC₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira G3

Ocenjena vrednost IC₅₀ za vzorec vodotopnega ekstrakta sira G3 je znašala 0,664 mg prot/ml reakcijske mešanice (Preglednica 11). Pri vzorcu sira G3 (Slika 18) lahko sklepamo, da bi bilo potrebno pripraviti še dodaten ekstrakt za IC₅₀, saj je redčitev $\frac{1}{4}$ še vedno inhibirala več kot 70 % ACE.

4.3 POVZETEK REZULTATOV ANALIZE ACE-INHIBITORNE AKTIVNOSTI VODOTOPNIH EKSTRAKTOV SIROV

V preglednici 11 so prikazani podatki za ACE-inhibitorno aktivnost vodotopnih ekstraktov analiziranih sirov.

Preglednica 11: ACE-inhibitorna aktivnost vodotopnih ekstraktov sirov

Ekstrakt	koncentracija proteinov v ekstraktu sirov (mg/ml)	koncentracija proteinov v reakcijski mešanici (mg/mL)	AI (%)	IC 50 (mg prot/ml reakcijske mešanice)	IC50 (mg sira/mL reakcijske mešanice)	AI (%) 3Kda*
T1	32,38933	2,491486721	87,5	1,394	21,5	59,0
T3	22,91623	1,762786661	77,4	0,792	17,3	33,3
T4	32,24411	2,480316138	39,8	n.d.	n.d.	19,4
T6	28,48722	2,191324576	76,6	0,451	7,9	28,5
T7	20,1772	1,552092289	65,1	1,060	26,3	33,8
B12	31,30176	2,407827651	84,0	0,493	7,9	23,7
B13	20,42965	1,571511917	61,9	1,212	29,7	39,1
B14	25,46714	1,959010831	92,0	1,031	20,2	58,7
B15	14,86805	1,143695793	72,4	0,789	26,5	24,4
B17	23,63919	1,818398976	63,8	1,443	30,5	18,8
E1	16,21522	3,999824698	58,0	1,089	33,6	17,4
G3	51,99772	1,247324427	97,8	0,664	6,4	57,9

* koncentracija proteinov v 3kDa ekstraktih ni bila analizirana

Odstotek ACE inhibitorne aktivnosti vodotopnih ekstraktov sirov je pri vzorcih tolminca znašal od 39,8 do 87,5 %, pri bovškem siru pa od 61,9 do 92,0 %. Visok odstotek ACE inhibitorne aktivnosti je bil v veliki večini vzorcev povezan z visokim deležem WSN/TN.

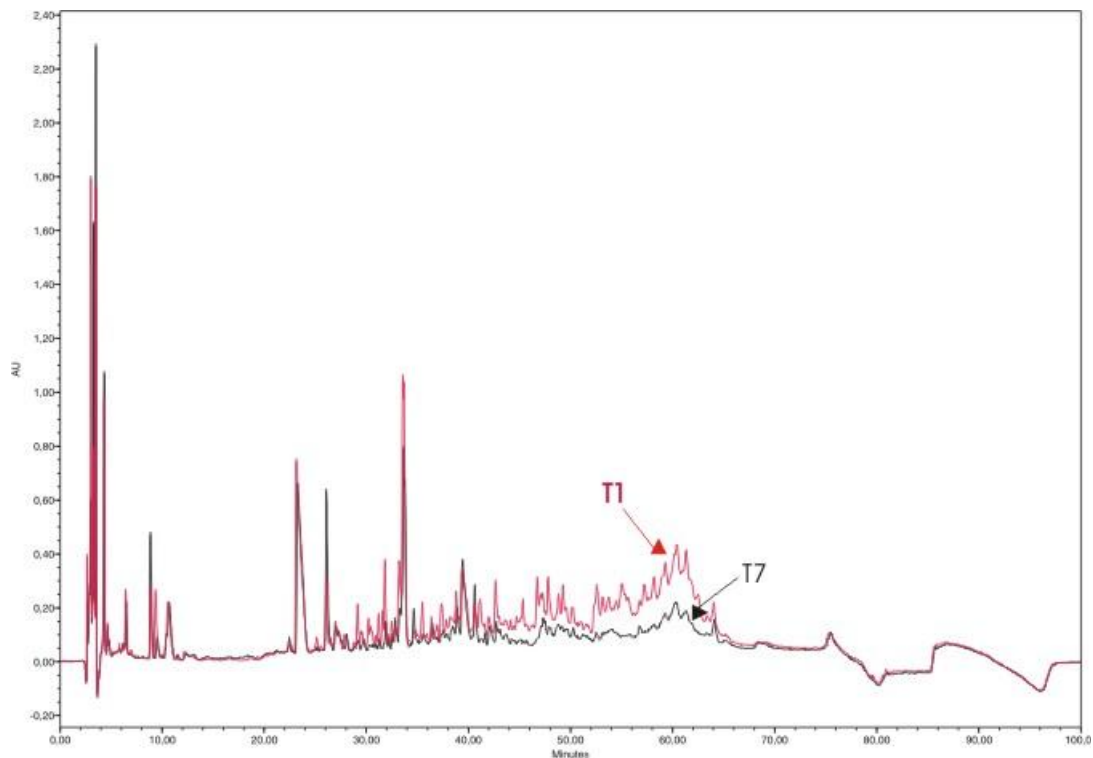
Pri vzorcu tolminca (T1) z najvišjim deležem WSN/TN (24,10 % (Preglednica 10)) smo tako ugotovili najvišjo ACE inhibitorno aktivnost znotraj skupine (87,5 %), kot tudi pri vzorcu G3 (najvišji delež WSN/TN; najvišja ACE inhibitorna aktivnost). Vzorec E1 je z

relativno majhnim deležem WSN/TN imel praktično najvišjo IC_{50} , kar pomeni, da je vseboval majhno količino ACE-inhibitornih peptidov.

Koncentracija proteinov v reakcijski mešanici ni bila v korelaciji z ugotovljeno ACE-inhibitorno aktivnostjo, torej več proteinov v reakcijski mešanici ne pomeni nujno tudi višjo ACE-inhibitorno aktivnost. Vzorec sira G3 je imel 97,8 odstotno inhibicijo pri trikrat manjši koncentraciji proteinov, kar nam pove, da je vseboval bistveno več ACE-inhibitornih peptidov kot vzorec sira z oznako E1, kar se je pokazalo v najnižji določeni vrednosti IC_{50} , ki je merilo za ACE-inhibitorno moč peptidov. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi pri analizi ACE-inhibitorne aktivnosti 3kDa ekstraktov. Največji odstotek inhibicije ACE smo zabeležili pri vzorcih z oznako T1, B14 in G3, najmanjši odstotek inhibicije pa pri vzorcu z oznako E1. Iz rezultatov lahko sklepamo, da so bili pri vzorcih T1, B14 in G3 za več kot 50 odstotkov inhibicije ACE odgovorni peptidi, ki so imeli molekulsko maso manjšo od 3kDa.

4.4 PEPTIDNI PROFIL EKSTRAKTOV SIROV

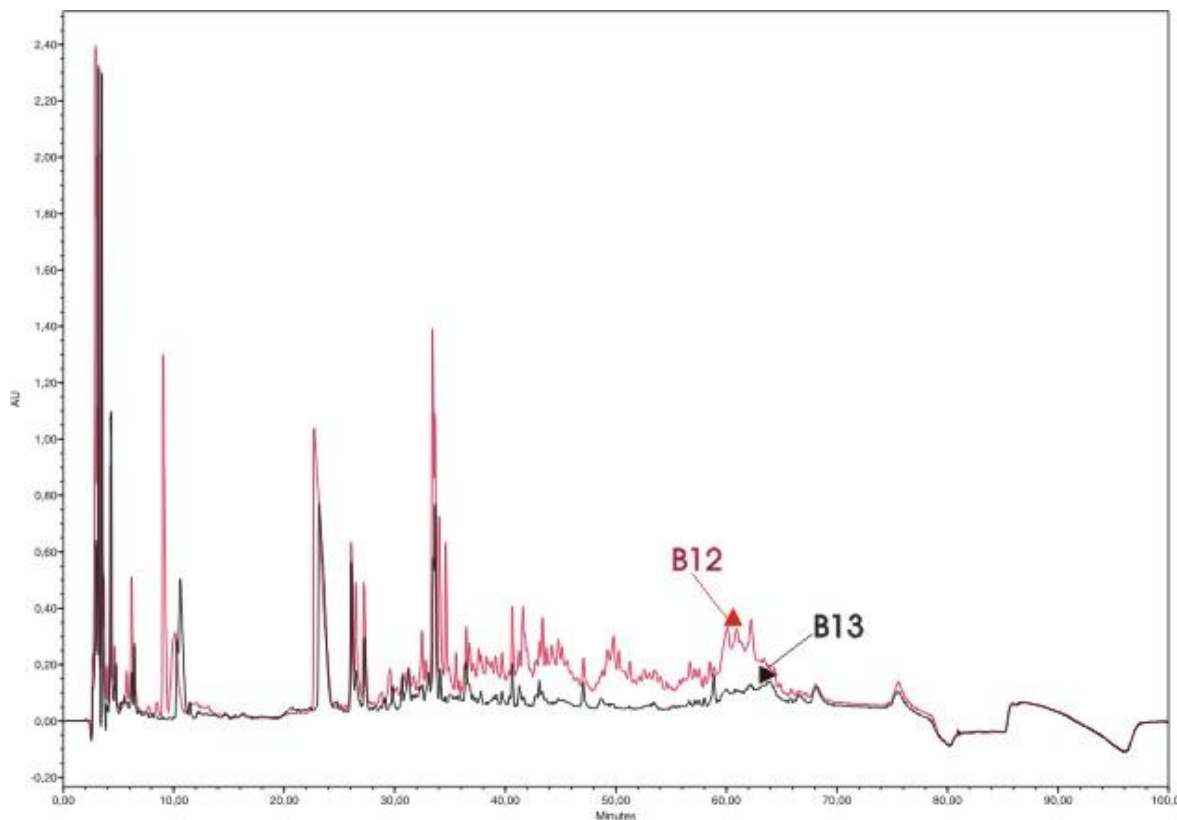
Slika 19 prikazuje kromatografski profil peptidov vodotopnih ekstraktov vzorcev tolminca.



Slika 19: Kromatografski profil peptidov vodotopnih ekstraktov vzorcev T1 in T7 (sir tolminc).

Iz slike 19 lahko razberemo, da je v vzorcu T1 bolj pestra peptidna sestava kot v vzorcu T7. Opazimo, da je v vzorcu ekstrata sira T1 več hidrofobnih peptidov, kot v vzorcu ekstrata sira T7. Hidrofobni peptidi so se s kolone eluirali na koncu koncentracijskega gradienta acetonitrila. Elucija peptidov s kolone je prenehala po 65 minutah kromatografske ločbe (koncentracija eluenta B (acetonitrila) pri 65 minutah je znašala nekaj več kot 62 % (glej točko 3.2.8.4)).

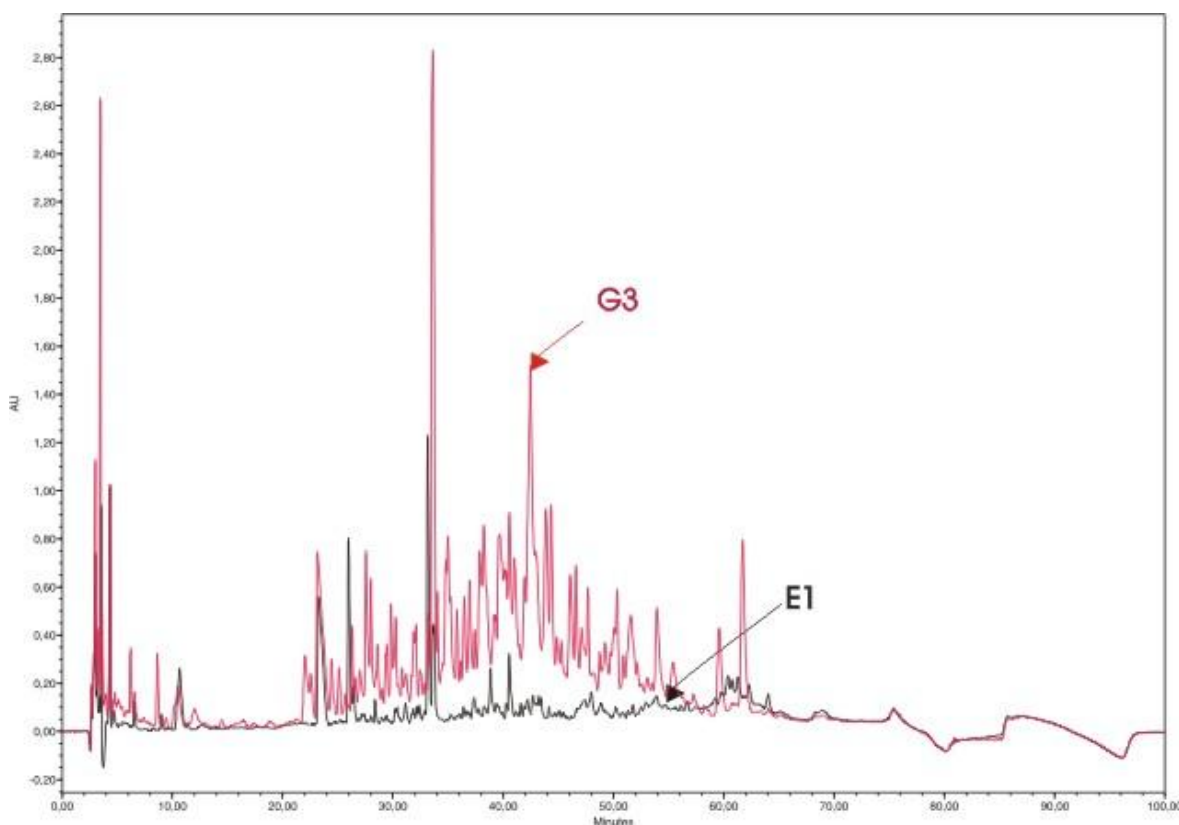
Slika 20 prikazuje kromatografski profil peptidov vodotopnih ekstraktov vzorcev bovških sirov.



Slika 20: Kromatografski profil peptidov vodotopnih ekstraktov vzorcev B12 in B13 (bovški sir)

Iz slike 20 lahko razberemo, da je v vzorcu ekstrakta sira B12 bolj pestra peptidna sestava kot v vzorcu ekstrakta sira B13. Večja kot je koncentracija ACN v eluentu bolj hidrofobnih peptidov se pričnejo eluirati iz kolone. Elucija peptidov se je zaključila po 68 minutah (koncentracija eluenta B pri 68 minutah je znašala okoli 94,44%).

Slika 21 prikazuje kromatografski profil peptidov vodotopnih ekstraktov vzorcev eksperimentalnega sira in sira edamca.



Slika 21: Kromatografski profil peptidov vodotopnih ekstraktov vzorcev G3 in E1 (eksperimentalni sir G3 ter vzorec sira edamec Tuš)

Vzorec ekstrakta E1 smo pripravili iz komercialno dostopnega edamca. Iz slike 21 je razvidno, da je pri vzorcu sira E1 peptidna sestava veliko bolj revna kot pri vzorcu z ekstraktom eksperimentalnega sira G3, kjer je jasno razvidna pestra peptidna sestava. Razberemo lahko tudi, da se prične pri vzorcu ekstrakta sira G3 iz kolone eluirati večja količina peptidov kmalu po pričetku gradienta acetonitrila (vzorec je vseboval poleg hidrofbnih tudi večjo količino hidrofilnih peptidov).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Med pregledovanjem literature o slovenskih tradicionalnih sirih smo prišli do zanimivih ugotovitev. Vsak izmed njih ima posebne značilnosti, nekaj pa je tudi skupnih. Vsi so posledica razvoja planinskega sirarstva. Ponašajo se z imenom geografskega porekla.

Tolminski sir, mohant in nanoški sir pridelujejo izključno iz kravjega mleka, medtem ko sta bovški sir in kraški ovčji sir izdelana iz ovčjega mleka. K bovškemu siru nekateri pridelovalci dodajajo kozje ali kravje mleko, vendar količina ne sme presegati 20 %, seveda pa mora biti dodatek ustrezno označen na etiketi. Mohant je edini predstavnik slovenskih tradicionalnih sirov, ki zavzema obliko embalaže, saj ga uvrščamo med polmehke tipe sira. Ostale uvrščamo med trde tipe sira in imajo obliko okroglega hlebca. Skupno vsem slovenskim tradicionalnim sirom je, da morajo vse stopnje v proizvodnji potekati znotraj območja, ki je zaščiten z geografskim poreklom. Sir tolmic in nanoški sir sta pridobila označbo geografskega porekla v letu 2003, mohant in bovški sir v letu 2004, kraški ovčji sir pa v letu 2008. Za vsakega posebej je značilno, da vsebuje svojevrstne mikroorganizme, značilne za območja iz katerih izvirajo, skupno jim je, da prevladujejo vrste iz rodov *Enterococcus*, *Lactobacillus* in v manjši meri *Lactococcus*. Med sabo bi jih lahko ločili tudi glede na njihovo maščobno-kislinsko sestavo in terpensko sestavo predvsem po vsebnosti α -pinena, kamfena, α -felandrena, β -pinena, β -karena, limonena in γ -terpinena. Med posebne značilnosti slovenskih tradicionalnih sirov pa nedvomno sodi tudi vsebnost bioaktivnih peptidov.

V literaturi smo zasledili že veliko opravljenih raziskav tujih avtorjev o bioaktivnih peptidih in njihovi ACE-inhibitorni aktivnosti v sirih (Korhonen in Pihlanto, 2006; Clare in Swaisgood, 2000; Pihlanto-Leppala, 2001). Tripeptidi iz sira, ki imajo ACE-inhibitorni značaj, se lahko absorbirajo v krvni obtok in imajo antihipertenzijski učinek tudi *in vivo* (Sieber in sod., 2009).

Pri določanju ACE-inhibitorne aktivnosti uporabljajo različne metode. Mi smo pri analizah uporabili kromatografsko metodo za določanje ACE inhibicije po Hyunu in Shinu (2000).

Vzorcem je bilo potrebno na začetku določiti vsebnost dušika oz. proteinov. Uporabili smo metodo po Kjehldahlu. Pripravili smo vodotopne ekstrakte vzorcev sira in del ekstraktov

ultrafiltrirali tudi skozi 3kDa membrano. Pri analizi ultrafiltratov skozi 3kDa membrano smo zabeležili najvišjo ACE-inhibitorno aktivnost pri vzorcu tolminca T1, ki je znašala 59,0 %. Visok delež smo izmerili tudi pri vzorcu bovškega sira B14 (58,7 %) ter vzorcu eksperimentalnega sira z oznako G3 (57,9 %). Najnižji odstotek smo izmerili pri vzorcu ekstrakta edamca z oznako E1 (17,4 %). S pomočjo kromatografske metode smo najprej določili vsebnost hipurne kisline, ki nastane med hidrolizo HHL. Količina nastale HA je odvisna od koncentracije ACE-inhibitornih peptidov v vzorcu, kar je razvidno iz slik (slike 4 do 7), inhibicija encima je bila tako največja pri nerazredčenih vzorcih. ACE-inhibitorne peptide so vsebovali tako vzorci tolminca kot bovškega sira.

5.1 VSEBNOST DUŠIKA V VZORCIH TRADICIONALNIH SLOVENSKIH SIROV TOLMINE IN BOVŠKI SIR

Analizirani vzorci so zavzemali vrednosti od 3,34 do 4,29 gramov skupnega N (TN)/100g sira. Večje razlike med vzorci smo opazili pri vsebnosti vodotopnega N (WSN), kar nakazuje na različno stopnjo proteolize sirov (Preglednica 10). Sklepamo lahko, da je različna stopnja proteolize sirov posledica različnega časa zorenja in specifične mikroflore sirov. Vsebnost WSN je pri vzorcih tolminca znašala od 0,63 do 1,02 gN/100 g, pri bovškem pa od 0,46 do 0,98 gN/100g. Stopnjo proteolize smo izračunali iz razmerja WSN/TN in je pri vzorcih tolminca znašala od 14,76 do 24,10 %, pri bovškem siru pa od 11,49 do 23,46 %. Vrednosti so se gibale od 0,466 gN/100 g vzorca oz. 29,736 g prot/kg vzorca ter vse do 1,630 gN/100 g vzorca oziroma 103,995 g prot/kg vzorca. Po pričakovanjih je vzorec eksperimentalnega sira G3 vseboval daleč najvišji delež WSN/TN, ki je znašal 48,84 %. Delež WSN/TN je bil pri vzorcu edamca E1 med najnižjimi (13,07 %), najnižji delež pa je bil pri vzorcu bovškega sira z oznako B15 (11,49 %; Preglednica 11).

5.2 ACE-INHIBITORNA AKTIVNOST VODOTOPNIH EKSTRAKTOV TRADICIONALNIH SLOVENSKIH SIROV TOLMINE IN BOVŠKI SIR

Pri naših analizah ACE-inhibitorne aktivnosti vodotopnih ekstraktov sirov smo prišli do ugotovitev, ki so v skladu s spoznanji tujih avtorjev (Meisel, 1998): Stopnja proteolize je pomemben dejavnik za nastanek ACE-inhibitornih peptidov, vendar visoka stopnja proteolize ni nujno povezana z visokim odstotkom ACE-inhibitorne aktivnosti.

Vodotopni ekstrakti sirov, ki smo jih ultrafiltrirali skozi 3 kDa membrano, so pokazali okoli 60 % ACE-inhibitorne aktivnosti ne-ultrafiltriranih vzorcev. Najvišjo ACE-inhibitorno aktivnost 3 kDa ekstraktov smo opazili pri vzorcu tolminca T1 (59,0 %) in vzorcu bovškega sira B14 (58,7 %), po čemer lahko sklepamo, da so za ACE-inhibitorno aktivnost odgovorni predvsem peptidi z molekulsko maso manjšo od 3kDa, kar je v skladu z ugotovitvami, omenjenimi v strokovni literaturi (Bütikofer in sod., 2007). Odstotek ACE-inhibicije se je po ultrafiltraciji pri vzorcu tolminskega sira T1 zmanjšal za 28,5 %, pri vzorcu bovškega sira B14 pa za 33,3 %. Najbolj se je odstotek ACE-inhibicije po ultrafiltraciji zmanjšal pri vzorcu bovškega sira B12 in sicer kar za 60,3 %. Odstotek ACE-inhibicije se je po ultrafiltraciji najmanj zmanjšal pri vzorcu tolminskega sira T4 (samo za 20,4 %).

Vrednosti IC_{50} so pri vzorcih tolminca dosegale vse od 0,45 do 1,39 mg peptidov/mL ekstrakta (Preglednica 11). Izjema v tem primeru je bil vzorec tolminca z oznako T4, saj je vrednost znašala 8,85 mg peptidov/mL ekstrakta, kar je posledica najnižje izmerjenega odstotka ACE-inhibitorne aktivnosti (39,8 %). Pri vzorcih bovškega sira so vrednosti IC_{50} zasedale vrednosti od 0,49 do 1,44 mg peptidov/mL ekstrakta, kar je podobno kot pri vzorcih sira tolminca. Najvišjo izmerjeno vrednost ACE-inhibitorne aktivnosti pa smo opazili pri vzorcu eksperimentalnega sira z oznako G3.

Pri vzorcih z visokim odstotkom ACE-inhibitorne vrednosti smo pri analizi kromatografskega profila vodotopnih ekstraktov ugotovili višjo raznolikost peptidov predvsem v regiji med $t_r = 50 - 65$ min (40-50 % ACN). Kromatografski profil vzorcev z nizko ACE-inhibitorno aktivnostjo, predvsem pa vzorec E1, je v tej regiji pokazal znatno nižje število kromatografskih vrhov peptidov oz. revno peptidno sestavo.

Ob primerjavi vzorcev tolminca in bovškega sira nismo opazili večjih razlik v njihovi peptidni sestavi. Razlike v peptidni sestavi pa so bile znotraj posamezne skupine vzorcev. Največjo razliko v peptidni sestavi smo opazili pri kromatogramu vzorca edamca in eksperimentalnega sira G3 (Slika 21). Na podlagi pridobljenih podatkov lahko sklepamo, da so za ACE-inhibitorno aktivnost v tolmincu in bovškem siru odgovorni v največji meri predvsem hidrofobni peptidi.

Gomez-Ruiz in sod. (2006) so identificirali ACE-inhibitorne peptide v različnih španskih tradicionalnih siri. Vrednosti indeksa proteolize so primerljive z vrednostmi naših vzorcev ekstraktov sirov. Pri vzorcih sirov idiazábal je znašal indeks proteolize 22,38 %, pri vzorcih sira roncal 16,37 %, mahón 19,21 %, kozji sir 15,01 %, cabrales 38,99 % ter pri vzorcu sira manchego 20,85 %. Pri naših vzorcih ekstraktov sirov (Preglednica 10) so vrednosti znašale od 11,49 % do 24,10 %. Med vzorci ekstraktov tolminskega sira je imel najvišji indeks proteolize vzorec z oznako T1 in najnižjo stopnjo proteolize vzorec z oznako T7. Med vzorci ekstraktov bovškega sira pa je imel najvišji indeks proteolize vzorec z oznako B12 ter najnižji vzorec z oznako B15, ki je bila celo nižja od indeksa proteolize pri edamcu (E1). Indeks proteolize vzorca eksperimentalnega sira G3 je znašal blizu 49 %.

Sieber in sod. (2009) so ugotavljali ACE-inhibitorno aktivnost vodotopnih ekstraktov različnih vzorcev sira ter primerjali vrednosti IC_{50} izražene v mg sira/ml reakcijske mešanice. Tako je pri vzorcu sira red cheddar in camember-ju vrednost IC_{50} znašala 0,16 pri vzorcu sira blue pa 0,27 mg/ml. Pri ementalskem siru navajajo vrednosti $27,6 \pm 8,4$ mg/ml ter pri tradicionalnem siru 2,0-29,5 mg/ml.

Bütikofer in sod. (2007) so opravili meritve vrednosti IC_{50} različnih vrst sirov, večinoma švicarskega porekla. Analizirali so vzorce trdih tipov sira, poltrdih tipov ter mehkih sirov. Med trdimi siri so imeli najvišjo vrednost IC_{50} siri gruyère stari 12 mesecev in sicer $29,4 \pm 16,8$ mg sira/ml reakcijske mešanice, najnižjo vrednost pa je imela starana gavda $2,0 \pm 0,3$ mg/ml. Med analiziranimi siri gruyère so imeli najvišjo vrednost IC_{50} vzorci 12 mesecev zorenega sira. Med pol trdimi siri so se vrednosti IC_{50} (mg/ml) gibale od najnižje 4.2 (appenzeller, zoren 7-10 mesecev) in vse do vrednosti 29.5 mg/ml pri siri manchego. Pri analizi mehkih sirov (mozzarella iz kravjega in bivoljega mleka) ACE-inhibicije niso opazili. Nizko inhibicijo ACE so opazili tudi pri siri camember.

Vrednosti IC_{50} izražene v mg sira/ml reakcijske mešanice so v naših vzorcih sirov zavzemale vrednosti vse od najnižje 6,4 mg/ml pri vzorcu eksperimentalnega sira G3, pa do najvišje vrednosti pri vzorcu sira E1, kjer je bilo za 50 % inhibicijo ACE potrebnih 33,6 mg sira. Med tradicionalnimi slovenskimi siri so vrednosti IC_{50} tolminskega sira znašale od najnižje 7,9 mg/ml (T6) do najvišje 26,3 mg/ml (T7), pri bovškem siru pa od 7,9 mg/ml (B12) do 30,5 mg/ml (B17). Za 50 % inhibicijo ACE je bilo tako potrebno v povprečju

približno 20 mg sira/ml reakcijske mešanice. Izmerjene vrednosti pri vzorcih tradicionalnih slovenskih sirov so zelo primerljive z vrednostmi, ki jih navajajo Bütikofer in sod. (2007) ter Sieber in sod. (2009). V prihodnosti bi bilo vredno podrobneje raziskati peptidno sestavo tradicionalnih slovenskih sirov, saj na podlagi naših analiz obetajo dober vir ACE-inhibitornih peptidov.

5.3 SKLEPI

Pri našem raziskovalnem delu smo prišli do naslednjih sklepov:

- Med posebne značilnosti slovenskih tradicionalnih sirov spadajo: značilna terpenska, maščobnokislinska in mikrobiološka sestava ter prisotnost bioaktivnih peptidov.
- Slovenski tradicionalni siri (bovški sir in tolminc) vsebujejo ACE-inhibitorne peptide.
- Vrednosti IC_{50} so primerljive z vrednostmi, ki jih navaja tuja literatura, pri čemer je bilo potrebno za 50 % inhibicijo ACE v povprečju približno 20 mg sira/ml reakcijske mešanice.
- Vodotopni ekstrakti sirov, ki so bili podvrženi ultrafiltraciji skozi 3 kDa membrano, so pokazali okoli 60 odstotkov ACE-inhibitorne aktivnosti ne-ultrafiltriranih vzorcev. Sklepamo lahko, da so bili za ACE-inhibitorno aktivnost odgovorni predvsem peptidi z molekulsko maso manjšo od 3kDa
- Na podlagi kromatografskega profila peptidov iz tolminca in bovškega sira lahko sklepamo, da so za ACE-inhibitorno aktivnost odgovorni v največji meri predvsem hidrofobni peptidi.

V nadaljnjih raziskavah ACE-inhibitornih peptidov v tradicionalnih slovenskih sirih bi bilo potrebno:

- zagotoviti večje število vzorcev tradicionalnih slovenskih sirov,
- poznati starost vzorcev oziroma poznati čas zorenja posameznega vzorca sira,
- s pomočjo LC-MS analize določiti aminokislinsko sekvenco ACE-inhibitornih peptidov in jih okarakterizirati.

6 POVZETEK

Med posebne značilnosti slovenskih tradicionalnih sirov spada v prvi vrsti tradicionalen način njihove izdelave na specifičnem geografskem področju, značilna terpenska, maščobnokislinska in mikrobiološka sestava ter nenazadnje prisotnost bioaktivnih peptidov v sirih, ki smo jim v našem eksperimentalnem delu namenili največ pozornosti.

Zanimalo nas je ali so v tradicionalnih slovenskih sirih prisotni peptidi z ACE-inhibitorno aktivnostjo. V analizo smo vključili vzorce tolminca in bovškega sira. Analiziranim vzorcem sirov smo določili vsebnost dušika (proteinov) po Kjeldahlovi metodi, pripravili vodotopne ekstrakte sirov in del ekstraktov tudi ultrafiltrirali skozi 3 kDa membrano. S pomočjo literature smo izbrali metodo za ugotavljanje ACE-inhibitorne aktivnosti, ki je vključevala kromatografsko določanje hipurne kisline, ki nastane med encimsko hidrolizo HHL z ACE.

Med slovenskimi tradicionalnimi siri je odstotek ACE inhibitorne aktivnosti vodotopnih ekstraktov sirov pri vzorcih tolminca znašal od 39,8 do 87,5 %, pri bovškem siru pa od 61,9 do 92,0 %. Visok odstotek ACE inhibitorne aktivnosti je bil pri veliki večini vzorcev povezan z visokim indeksom proteolize. Najvišjo izmerjeno vrednost ACE-inhibitorne aktivnosti smo opazili pri vzorcu eksperimentalnega sira, pri katerem smo kot startersko kulturo uporabili avtohtono mikrofloro tolminca.

Vrednosti IC_{50} so bile primerljive s tujo literaturo, pri čemer je bilo potrebno za 50 % inhibicijo ACE v povprečju približno 20 mg sira/ml reakcijske mešanice.

Vodotopni ekstrakti sirov, ki so bili podvrženi ultrafiltraciji skozi 3 kDa membrano, so pokazali okoli 60 odstotkov ACE-inhibitorne aktivnosti ne-ultrafiltriranih vzorcev, zato sklepamo, da so bili za ACE-inhibitorno aktivnost odgovorni predvsem peptidi z molekulsko maso manjšo od 3 kDa. Najvišjo ACE-inhibitorno aktivnost 3 kDa ekstraktov smo opazili pri vzorcu tolminca T1 (59,0 %) in vzorcu bovškega sira B14 (58,7 %).

Ob primerjavi vzorcev tolminca in bovškega sira nismo opazili večjih razlik v njihovi peptidni sestavi. Razlike v peptidni sestavi pa so bile znotraj posamezne skupine vzorcev. Največjo razliko v peptidni sestavi smo opazili pri kromatogramu vzorca edamca in eksperimentalnega sira, narejenega z avtohtono mikrofloro tolminca. Na podlagi

pridobljenih rezultatov lahko sklepamo, da so za ACE-inhibitorno aktivnost v tolmincu in bovškem siru odgovorni v največji meri predvsem hidrofozni peptidi. Kromatografski profil vzorcev z nizko ACE-inhibitorno aktivnostjo, predvsem pa vzorec edamca (E1), je v tej regiji pokazal znatno nižje število kromatografskih vrhov peptidov oz. revno peptidno sestavo.

Na podlagi izvedenih analiz lahko sklenemo, da vzorci slovenskih tradicionalnih sirov (bovški sir in sir tolminc) vsebujejo ACE-inhibitorne peptide.

7 VIRI

- Buchin S., Martin B., Dupont D., Bonard A., Achilleos C. 1999. Influence of the composition of alpine highland pasture on chemical, rheological and sensory properties of cheese. *Journal of Dairy Research*, 66: 579-588
- Bütikofer U., Meyer J., Sieber R., Wechsler D., 2007. Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal* 17: 968-975
- Cankar R. 2007. Peptidni inhibitorji angiotenzinske konvertaze v fermentiranem mleku. Diolomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 55 str.
- Cencič L., Grašek V., Le Marechal A. 2006. Slovenski zaščiteni posebni kmetijski pridelki oziroma živila. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 48 str.
- Clare D.A., Swaisgood H. E. 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83, 6: 1187-1195
- Curioni P.M.G., Bosset J.O. 2002. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12: 959-984
- Cushman D.W., Cheung H.S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20: 1637-1648
- Čanžek Majhenič A., Mohar P., Rogelj I. 2007. Characterisation of the *Lactobacillus* community in traditional Karst ewe's cheese. *Interantional Journal of Dairy technology*, 60, 3: 182-190
- Fischione A. 1998. Sirarstvo na Tolminskem, Kobariškem in Bovškem. Ljubljana, Kmečki glas: 118 str.
- Gerželj E. 2006. Vloga za priznanje označbe porekla za Kraški ovčji sir. Sežana, Društvo rejcev drobnice Krasa in Istre: 41 str.
- Gomez-Ruiz J.A., Taborda L., Amigo L., Recio I., Ramos M., 2006. Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 223: 595-601
- Hyun C.K., Shin H.K. 2000. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry*, 36: 65-71
- IDF Standard 20B. Milk. Determination of nitrogen content (Kjeldahl method). 1993. 12 str.

- Jauhiainen T. 2007. Blood pressure lowering effects of *Lactobacillus helveticus* fermented milk containing bioactive peptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro: mechanistic, kinetic and clinical studies. University Helsinki: 100 str.
- Katana Burja V. 2006. Primerjava enterokokov, osamljenih iz avtohtonih sirov, s kliničnimi izolati : magistrsko delo. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97 str.
- Kirste B. 1998. Terpenes. Berlin, Institute of Chemistry, Department of Biology, Chemistry, Pharmacy, Freie Universität Berlin (2. feb. 1998): 2str.
http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/oc/terpene/terpene_en.html
(31. maj. 2011)
- Kjeldahl method for Determining Nitrogen. Cole – Parmer. (2011)
<http://www.coleparmer.com/techinfo/techinfo.asp?htmlfile=KjeldahlBasics.htm&ID=>
(02. apr. 2011)
- Koren D., Perko B., Pretner S., Fiscione A. 2003. Specifikacija za Bovški sir. Bovec, Društvo rejcev drobnice Bovške: 26 str.
- Korhonen H., Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. International Dairy Journal, 16: 945-960
- López-Fandiño R., Otte J., Camp van J. 2006. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. International Dairy Journal, 16: 1277-1293
- Marc N., Žvokelj J., 2002. Poročilo o posebnostih Nanoškega sira. Vipava, Nanoški sir GIZ: 15 str.
- Meisel H. 1998. Overview on Milk Protein – derived Peptides. International Dairy Journal, 8: 363-373
- Meyer J., Bütikofer U., Walther B., Wechsler D., Sieber R. 2009. Changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro during ripening of different Swiss cheese varieties. Journal of Dairy Science, 92: 826-836
- Mohar Lorbeg P. 2008. Fenotipska in genotipska raznolikost enterokokov iz tradicionalnih slovenskih sirov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 76 str.
- Nakamura Y., Takano T. 1995. Angiotensin converting enzyme inhibitor and method for preparing same. US Patent 5449661
- Nanoški sir, Vipava. 2005. Orjent
<http://www.vipavska-dolina.si/?id=131&oblika=ZNACILNO&isci>
(30. mar. 2011)

- Novak R. 2006. Maščobnokislinska sestava Kraškega ovčjega sira. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Oddelek za zootehniko: 61 str.
- Perko B., Koren D., 2003. Specifikacija za sir Tolminc. Tolmin, Sirarsko društvo Tolminc: 44 str.
- Perko B., Renčelj S., Čuk M., Marc N., Žvokelj J., 2002. Nanoški sir, Specifikacija. Vipava, Nanoški sir GIZ: 28 str.
- Pihlanto-Leppala A. 2001. Bioactive peptides derived from whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. Trends in Food Science and Technology, 11: 347-356
- Planšarstvo. 2007. Turizem Bohinj.
<http://www.bohinj.si/index.php?catID=1467>
 (26. jun. 2010)
- Pompe M., Tompa G., Rogelj I. 2005. Prepoznavanje in potrjevanje geografskega izvora sirov. V: Sledljivost živil. 23. Bitenčevi živilski dnevi '05, Ljubljana, 31. mar- 1. apr. 2005. Žlender B., Gašperlin L. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 133-144
- Pravilnik o označbi geografskega porekla Bovški sir. Ur. l. RS št. 47-2238/04.
<http://www.uradni-list.si/1/content?id=48959>
 (20. avg. 2011)
- Pravilnik o označbi geografskega porekla Mohant. Ur. l. RS št. 47-2239/04.
<http://www.uradni-list.si/1/content?id=48960>
 (20. avg. 2011)
- Pravilnik o označbi geografskega porekla sir Tolminc. Ur. l. RS, št. 101-4509/03.
<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlurid=20034509>
 (20. avg. 2011)
- Pravilnik o Kraškem ovčjem siru z zaščiteno označbo porekla. Ur. l. RS, št. 29-1080/08.
<http://www.uradni-list.si/1/content?id=85559>
 (20. avg. 2011)
- Pravilnik o označbi geografskega porekla Nanoški sir. Ur. l. RS, št. 15-600/03.
<http://www.uradni-list.si/1/content?id=41073>
 (20. avg. 2011)
- Renčelj S., Perko B., Bogataj J. 1995. Siri nekdanj in zdaj. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 5-51
- Renčelj S., Perko B., Ravnik M., Lončnar M. 2001. Specifikacija za sir Mohant. Bohinj, Sirarsko društvo: 11 str.
- Renčelj S. 2008. Kraški ovčji sir, za zaščiteno označbo porekla. Sežana, Društvo rejcev drobnice Krasa in Istre: 24 str.

- Rogelj I. 2005. Poročilo o raziskavah mikrobioloških značilnostih Kraškega ovčjega sira. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Katedra za mlekarstvo: 11 str
- Rondič, N. 1996. Površinska mikroflora nanoškega sira. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 61 str.
- Shalaby S. M., Zakora M., Otte J. 2006. Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FAPGG and HHL as substrates. *Journal of Dairy Research*, 73: 178-186
- Silva S.V., Malcata F.X., 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15: 1-15
- Sieber R., Bütikofer U., Egger C., Portmann R., Walther B., Wechsler D., 2009. ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science and Technology* 90: 47-73
- Silva S.V., Malcata F.X., 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15: 1-15
- Slanovec T. 1982. Sirarstvo. Ljubljana. ČZP Kmečki glas: 175 str.
- Sunesson A.-L., Nilsson C.-A., Carlson R., Blomquist G., Andersson B. 1997. Production of volatile metabolites from *Streptomyces albidoflavus* cultivated on gypsum board and tryptone glucose extracts agar – influence of temperature, oxygen and carbon dioxide levels. *Annals of Occupational Hygiene*, 41, 4: 393-413
- Tompa G. 2005. Terpeni v tradicionalnih slovenskih sirih. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 54 str.
- Tompa G. 2010. ACE-inhibitorni in imunomodulatorni peptidi v mleku, fermentiranem z *Lactobacillus helveticus* BGRA43. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 170 str.
- Tossavainen O., Suomalainen T., Sahlstein J., Mäyrä-Mäkinen A. 2005. Verfahren zur Herstellung eines Produktes, welches gegen Bluthochdruck gerichtete Tripeptide enthält. Dt. Patent DE, 600 10 742 T2
- Vermeirssen V., Van Camp J., Verstraete W. 2002. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 51, 1: 75-87
- Zakon o industrijski lastnini. Ur. l. RS št. 51-2178/06.
<http://www.uradni-list.si/1/content?id=73396>
 (20. sep. 2011)
- Zaščita geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila. Uredba Sveta (ES) št. 510/06. Eur-lex.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32006R0510:SL:NOT#top>
 (30. mar. 2011)

ZAHVALA

Za pregled diplomske naloge se zahvaljujem mentorici prof.dr. Ireni Rogelj.

Prof. dr. Bogdanu Perku se zahvaljujem za recenzijo diplomske naloge, prof. dr. Ivanu Štuhcu pa za natančen pregled.

Za strokovno pomoč pri analizah, za potek raziskovalnega dela, priporočeno literaturo, za podroben pregled ter za pomoč in spodbudne besede pri pisanju diplomske naloge se zahvaljujem dr. Gorazdu Tompi.

Hvala asist. dr. Alenki Levart za nasvete pri delu s HPLC-jem.

Zahvaljujem se Jerneji Bogataj in dr. Nataši Siard za pomoč pri obliki in pregledu bibliografskega dela naloge.

Zahvaliti se želim mojim domačim, ki so mi v času študija stali ob strani. Predvsem bi se jim rada za njihovo razumevanje in potrpežljivost, da so me spodbujali, ko sem bila v težavah in sem obupovala nad študijem.

Težko je naštet vse, ki so mi kakorkoli pripomogli v času študija in v času nastajanja diplomske naloge, zato se želim zahvaliti tudi vsem neimenovanim, ki so mi priskočili na pomoč.

Nenazadnje pa se želim še posebej zahvaliti mojemu Gorazdu za vso potrpežljivost, razumevanje in spodbudne besede, ko mi je zmanjkovalo volje.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Laura DEBEVC

**OPIS POSEBNIH ZNAČILNOSTI SLOVENSКИH
TRADICIONALNIH SIROV IN DOLOČANJE ACE-
INHIBITORNIH PEPTIDOV V SIRU TOLMINC IN
BOVŠKEM SIRU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011