

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Rok NOVAK

**MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA KRAŠKEGA
OVČJEGA SIRA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**FATTY ACID PROFILE OF KARST
EWE'S CHEESE**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstva - zootehnike. Kemijske analize so bile opravljene na Katedri za prehrano, na Oddelku za zootehniko, Biotehniške Fakultete.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Ireno Rogelj in za somentorico dr. Alenko Levart.

Recenzent: prof. dr. Bogdan Perko

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jurij POHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Član: as. dr. Alenka LEVART
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Rok NOVAK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 637.3:636.3(043.2)=863
KG	ovce/siri/kraški ovčji sir/sestava/maščobne kisline/CLA/sezona/paša/Slovenija
KK	AGRIC Q04/L01/9430/5240
AV	NOVAK, Rok
SA	ROGELJ, Irena (mentorica)/LEVART, Alenka (somentorica)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2006
IN	MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA KRAŠKEGA OVČJEGA SIRA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 66 str., 12 pregl., 24 sl., 67 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Ugotavljali smo maščobnokislinsko sestavo kraškega ovčjega sira, ki je v postopku priznanja za naziv označbe geografskega porekla. Maščobnokislinsko sestavo smo ugotavljali na devetnajstih vzorcih sira, ki so se razlikovali glede sezone izdelave, časa zorenja, termične obdelave mleka in paše živali. Siri so v povprečju vsebovali 67,12 ut. % nasičenih maščobnih kislin, 32,88 ut. % enkrat nenasičenih maščobnih kislin in 6,04 ut. % večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Relativno visok je bil delež kratkoverižnih maščobnih kislin (13,11 ut. %), povprečni vsebnosti srednjeverižnih in dolgoverižnih maščobnih kislin pa sta znašali 43,69 ut. % oz. 43,21 ut. %. Od posameznih maščobnih kislin je bila najbolj zastopana palmitinska kislina (24,05 ut. %), sledile pa so ji oleinska (20,30 ut. %), stearinska (11,08 ut. %) in miristinska kislina (10,80 ut. %). Siri so vsebovali 1,33 ut. % konjugirane linolne kisline, imeli pa so tudi ugodno razmerje n-6/n-3 maščobnih kislin (3,21 : 1). Siri so se v maščobnokislinski sestavi statistično značilno razlikovali glede sezone, paše in časa zorenja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 637.3:636.3(043.2)=863
CX sheep/cheese/Karst ewe's cheese/composition/fattyacids/CLA/season/pasture/
Slovenia
CC AGRIS Q04/L01/9430/5240
AU NOVAK, Rok
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/LEVART, Alenka (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department
PY 2006
TI FATTY ACID PROFILE OF KARST EWE'S CHEESE
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 66 p., 12 tab., 24 fig., 67 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of our work was to determine fatty acid composition of karst ewe's cheese, which is in the process of getting Protected Designation of Origin. Analyzed nineteen cheese samples differed in cheesemaking season, ripening time, thermic treatment of milk and animal pasture. The average content of saturated fatty acids was 67.12 wt. %, monounsaturated fatty acids 32.88 wt. %, and 6.04 wt. % of polyunsaturated fatty acids. Cheeses contained relatively high wt. % of shortchain fatty acids (13.11 wt. %). The average content of mediumchain fatty acids and longchain fatty acids were 43.69 wt. % and 43.21 wt. %, respectively. The most abundant fatty acid in cheeses was palmitic acid with 24.05 wt. %, followed by oleic acid (20.30 wt. %), stearic acid (11.08 wt. %) and myristic acid (10.80 wt. %). Cheeses contained 1.33 wt. % of conjugated linoleic acid. They had favourable n-6/n-3 ratio (3.21 : 1), and the difference in fatty acid composition regarding season, animal pasture and ripening time was statistically significant.

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	3
2.1 KRAŠKI OVČJI SIR	3
2.1.1 Posebnosti sira in področje izdelave	3
2.1.2 Opis istrske pramenke	4
2.1.3 Ovčje mleko	5
2.1.4 Izdelava kraškega ovčjega sira	7
2.1.5 Sestava in značilnosti sira	8
2.2 MLEČNA MAŠČOBA	9
2.2.1 Sestava in lastnosti mlečne maščobe	9
2.2.2 Triacilgliceroli	11
2.2.3 Hlapne maščobne kisline	14
2.2.4 Skupne maščobne kisline	15
2.2.4.1 Nasičene maščobne kisline	16
2.2.4.2 Nenasičene maščobne kisline	17
2.2.4.3 Cis in trans maščobne kisline	17
2.2.4.4 Esencialne maščobne kisline	18

2.2.4.5	Vakcenska kislina	19
2.2.4.6	Konjugirana linolna kislina (CLA)	20
2.3	ZNAČILNOSTI MAŠČOBNOKISLINSKE SESTAVE MLEČNE MAŠČOBE	21
2.3.1	Izvor maščobnih kislin v mleku	21
2.3.2	Vpliv prehrane na maščobnokislinsko sestavo mlečne maščobe	22
2.3.3	Vpliv obdobja laktacije in sezone na maščobnokislinsko sestavo mlečne maščobe	24
2.3.4	Vrsta živali in maščobnokislinska sestava mlečne maščobe	24
2.4	MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA SIROV	26
3	MATERIAL IN METODE	27
3.1	MATERIAL	27
3.2	METODE DELA	28
3.2.1	Priprava vzorcev sirov za analizo	28
3.2.2	Ugotavljanje vsebnosti hlapnih maščobnih kislin	28
3.2.2.1	Priprava etrskih ekstraktov za ugotavljanje hlapnih maščobnih kislin s plinsko kromatografijo	28
3.2.2.2	Priprava standardnih raztopin	29
3.2.2.3	Analitska oprema in pogoji analize	29
3.2.3	Ugotavljanje vsebnosti maščobnih kislin v sirih s plinsko kromatografijo	30
3.2.3.1	Priprava metilnih estrov z metodo ISTE za določanje maščobnih kislin s plinsko kromatografijo	30
3.2.3.2	Analitska oprema in pogoji analize	31
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	33

4	REZULTATI	35
4.1	UGOTAVLJANJE HLAPNIH MAŠČOBNIH KISLIN	35
4.2	UGOTAVLJANJE SKUPNIH MAŠČOBNIH KISLIN	36
4.2.1	Statistične značilnosti vplivov sezone in časa zorenja	40
4.2.2	Vpliv paše na maščobnokislinsko sestavo sirov	45
4.2.3	Konjugirana linolna kislina (CLA)	47
5	RAZPRAVA	51
5.1	HLAPNE MAŠČOBNE KISLINE	51
5.2	SKUPNE MAŠČOBNE KISLINE	51
5.3	VPLIVI NA MAŠČOBNOKISLINSKO SESTAVO	53
5.4	RAZMERJE N-6 IN N-3 MAŠČOBNIH KISLIN IN Δ^9 DESATURAZNA AKTIVNOST	54
5.5	KONJUGIRANA LINOLNA KISLINA	56
6	SKLEPI	58
7	POVZETEK	59
8	VIRI	61
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Pregled maščobnih kislin (IUPAC nom., 1984; Koman-Rajšp in sod., 1998)	12-13
Preglednica 2: Vsebnost CLA (v ut. %) v različnih ovčjih sirih in ovčjem maslu (Zlatanos in sod., 2002)	20
Preglednica 3: Maščobnokislinska sestava mleka (ut. %) različnih živalskih vrst in humanega mleka (Chow, 1992; Malacarne, 2002; Jahreis, 1999)	25
Preglednica 4: Maščobnokislinska sestava (ut. %) različnih grških sirov (Zlatanos in sod., 2002)	26
Preglednica 5: Opis vzorcev in datumi izdelave sirov	27
Preglednica 6: Sestava osnovne standardne raztopine (stock solution) (g/l)	29
Preglednica 7: Sestava delovnih standardnih raztopin (g/l)	29
Preglednica 8: Vsebnosti hlapnih maščobnih kislin v posameznih vzorcih sirov (g/kg sira)	35
Preglednica 9: Osnovni statistični parametri posameznih maščobnih kislin (ut. %) določenih v kraškem ovčjem siru	37
Preglednica 10: Osnovni statistični parametri za nekatere vsote (ut. %) in razmerja maščobnih kislin	39
Preglednica 11: Statistične značilnosti vplivov sezone in časa zorenja sira na maščobnokislinsko sestavo sirov	41
Preglednica 12: Primerjava razmerij naše študije z literaturnimi viri	55

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Strukturni prikaz sestave triacilglicerola (Carter, 1996)	12
Slika 2: Nastanek hlapnih maščobnih kislin z mikrobno razgradnjo ogljikovih hidratov (prirejeno po Žgajnar, 1990)	14
Slika 3: Metabolne poti v biosintezi konjugirane linolne kisline (cis-9, trans-11) (Chouinard, 1999)	19
Slika 4: Kromatogram vzorca K35	32
Slika 5: Kromatogram standarda (NuChek, GLC # 411)	32
Slika 6: Vsebnosti nasičenih (SFA), enkrat- (MUFA) in večkrat nenasičenih (PUFA) maščobnih kislin (ut. %) v posameznih vzorcih	40
Slika 7: Vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije	43
Slika 8: Vsebnost srednjeverižnih maščobnih kislin (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije	43
Slika 9: Vsebnost dolgoverižnih maščobnih kislin (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije	43
Slika 10: Vsebnost nasičenih maščobnih kislin (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije	43
Slika 11: Vsebnost enkrat nenasičenih maščobnih kislin (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije	43
Slika 12: Vsebnost večkrat nenasičenih maščobnih kislin (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije	43
Slika 13: Razmerje n-6 in n-3 maščobnih kislin v odvisnosti od dneva laktacije	44
Slika 14: Razmerje linolne in linolenske maščobne kisline v odvisnosti od dneva laktacije	44
Slika 15: Vsebnost miristinske kisline (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije	44
Slika 16: Vsebnost palmitinske kisline (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije	44
Slika 17: Vsebnost stearinske kisline (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije	44
Slika 18: Vsebnost oleinske kisline (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije	44
Slika 19: Povprečne vsebnosti (ut. %) skupin maščobnih kislin dolinske in višinske paše	45
Slika 20: Vpliv paše na razmerji n-6/n-3 in linolna/linolenska MK	46
Slika 21: Odvisnost CLA (g/100g) od vsebnosti t- vakcenske kisline (g/100g)	47
Slika 22: Povprečne vsebnosti dveh izomer CLA (ut. %) v sirih dolinske in višinske paše	48
Slika 23: PCA analiza vsebnosti maščobnih kislin v dolinskih in višinskih ovčjih sirih	49
Slika 24: Korelacije med glavnimi maščobnimi kislinami vzorcev sira	50

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CLA	konjugirana linolna kislina (<i>angl.</i> conjugated linoleic acid)
CSR	center za sonaravno rekultiviranje
DHA	dokozaheksaenojska kislina (<i>angl.</i> dokozaheksaenoic acid)
DPA	dokozapentaenojska kislina (<i>angl.</i> dokozapentaenoic acid)
EGS	evropska gospodarska skupnost
EPA	eikozapentaenojska kislina (<i>angl.</i> eikozapentaenoic acid)
FID	plamensko ionizacijski detektor (<i>angl.</i> flame ion detector)
GLA	gama linolenska kislina (<i>angl.</i> gama linolenic acid)
GLC	plinsko tekočinska kromatografija (<i>angl.</i> gas liquid chromatography)
GLM	splošni linearni modeli (<i>angl.</i> general linear models)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
ISTE	<i>in situ</i> transesterifikacija
LSM	metoda najmanjših kvadratov (<i>angl.</i> least square mean)
MAX	maksimum
MIN	minimum
MK	maščobna kislina
MUFA	enkrat nenasičene maščobne kisline (<i>angl.</i> monounsaturated fatty acids)
N	število vzorčenj
OGP	označba geografskega porekla
PCA	metoda glavnih osi (<i>angl.</i> principal component analysis)
PUFA	večkrat nenasičene maščobne kisline (<i>angl.</i> polyunsaturated fatty acids)
RSD	relativni standardni odmik (<i>angl.</i> relative standard deviation)
SFA	nasičene maščobne kisline (<i>angl.</i> saturated fatty acids)
ST	standard
STD	standardni odklon (<i>angl.</i> standard deviation)
UFA	nenasičene maščobne kisline (<i>angl.</i> unsaturated fatty acids)

1 UVOD

Kraški ovčji sir izdelujejo na področju Krasa že stoletja. V letu 2000 je Društvo rejcev drobnice Krasa in Istre vložilo elaborat za priznanje geografskega porekla, saj želijo kraški ovčji sir zaščititi.

Z nazivom označbe geografskega porekla (OGP) bi se kraški ovčji sir pridružil mohantu, tolmincu, nanoškemu in bovškemu siru, ki so to priznanje že dobili. Seveda pa je za pridobitev naziva potrebno značilnosti in posebnosti sira, vključno s sestavo, natančno opisati.

Določba avtentičnosti in geografskega porekla sta danes odločilnega pomena za zaščito tradicionalnih izdelkov, dobro poznavanje sestave pa osnova za kontrolo kvalitete in varnosti nekega izdelka oziroma živila. Vse več potrošnikov se zaveda pomena zdrave prehrane, a je med poplavo ponujenih izdelkov in živil izbira postala težja. Nemalokrat se določeni proizvodi prodajajo pod istim marketinškim imenom, čeprav so po kvaliteti in izvoru lahko precej daleč od originala. Velik problem predstavljajo tudi potvorbe. Pri mlečnih izdelkih se najpogosteje dogaja, da je izdelkom iz ovčjega ali kozjega mleka dodano kravje mleko, kar je tudi oblika potvorbe.

Z namenom vzpodbujanja tržnih prizadevanj proizvajalcev, pa tudi zaščite tako proizvajalca kot potrošnika, je evropska kmetijska politika vpeljala kategorijo tako imenovanih posebnih kmetijskih in živilskih izdelkov. Pravno gledano se naslanja na Pravilnik o zaščiti geografskih oznak in zaščiti oznak porekla kmetijskih in prehrabnih izdelkov (Uredba Sveta (EGS) št. 2081/92) in Pravilnik o certifikatih o posebnih lastnostih za kmetijske proizvode in živila (Uredba Sveta (EGS) št. 2082/92). S tema uredbama poskuša evropska politika pospešiti razvoj regionalnih in posebnih izdelkov, ki prispevajo k večji raznovrstnosti kmetijskega blaga in pospešujejo razvoj podeželja.

Avtentičnost sira je odvisna od mnogih dejavnikov, ki se pojavljajo v celotni verigi od reje in prehrane živali, pridobivanja, obdelave in predelave mleka ter zorenja in skladiščenja sirov, vsi pa so odvisni od geografskega porekla. Na kvaliteto mleka vplivajo klima, geologija, paša in sama reja, na predelavo pa lokalna oziroma regionalna tradicija.

Omenjene individualne značilnosti izdelkov so bistvene pri ugotavljanju geografskega porekla. Različne metode dokazovanja avtentičnosti temeljijo na lastnostih izdelka, ki so v tesni povezavi z geografskim poreklom. Te lastnosti (parametre) imenujemo indikatorji ali markerji, ki so lahko kemijskega, biokemijskega, mikrobnega ali kakega drugega izvora. Poleg iskanja markerjev za dokazovanje avtentičnosti, pa je za ohranjanje tradicionalnih izdelkov izjemnega pomena dobro poznavanje sestave in variabilnosti izdelka. Sestava vpliva na senzorične značilnosti izdelka, ki so za potrošnika največkrat odločilnega pomena za nakup izdelka. K senzoričnim značilnostim sirov pomembno prispeva maščoba oziroma maščobnokislinska sestava. Kljub negativnemu slovesu, ki ga ima mlečna maščoba zaradi visoke vsebnosti nasičenih maščobnih kislin, pa znanstveniki v zadnjem času odkrivajo tudi njene pozitivne učinkovine. Ena izmed njih je konjugirana linolna kislina (CLA), ki naj bi imela antiaterogeno, antikancerogeno in antidiabetično delovanje.

Cilj diplomske naloge je bil ugotoviti maščobnokislinsko sestavo kraškega ovčjega sira, ki je v postopku priznanja naziva OGP. Pričakovali smo, da bo maščobnokislinska sestava tipična za ovčje sire, da bodo siri vsebovali veliko CLA in da se bodo vzorci sirov razlikovali glede na kraj paše (višina, dolina) in stadij laktacije.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KRAŠKI OVČJI SIR

2.1.1 Posebnosti sira in področje izdelave

Izdelava kraškega ovčjega sira ima dolgoletno tradicijo. Specifičnost izdelka temelji na lokalnih dejavnikih, kot so pasma, specifičnost kraške pokrajine, podnebje, sestava tal in travinja, kemijska in mikrobiološka sestava mleka pridelanega na Krasu, mikroflora in pogoji skladiščenja. Zorenje kraškega sira, ki ima značilen okus, aromo in teksturo, je celosten proces mikrobioloških, kemijskih in fizikalnih sprememb sirnine. Te lastnosti sira nastanejo kot rezultat delovanja naravne mikroflore, ki je prisotna že v surovem mleku, ter bakterijske kulture, ki jo lahko dodajamo tako surovemu mleku, še posebno pa mleku po toplotni obdelavi. Razvoj okusa, arome in teksture je rezultat procesov, ki se začnejo že v surovem mleku in se nadaljujejo med izdelavo in stiskanjem sira. Dokončno se te lastnosti oblikujejo med zorenjem sira v zorilnem prostoru (Gerželj in sod., 2000).

Kraški ovčji sir izdelujejo iz ovčjega mleka. Na območju Krasa in Istre so ovčarji redili domačo avtohtono ovco, ki so ji rekli istrijanka, kraška ovca, primorska ovca in celo ovca surovine volne. Nekoč je bila ovčereja na Krasu dokaj razvita. Istrijansko ovco so redili predvsem zaradi njenih izrednih lastnosti. Odlikujeta jo dolga hoja in paša med kamenjem, popase tudi suho staro pašo, čeprav spretno išče mlado travo med kamenjem. Rejci istrijanske ovce so bili na Krasu in Istri (v Prešnici in Socerbu, Dolenji vasi pa tudi na Bistriškem, Pivškem in Postojnskem). Današnje območje, kjer se izdeluje kraški ovčji sir, je omejeno z mejo, ki poteka od Opatjega sela, Kostanjevice na Krasu, Temnice, Lipe, Škrbine in Štanjela preko Nanoške planote, zahodnih pobočij Javornika, zahodnih obronkov Snežnika proti Rupi, ob državni meji z republiko Hrvaško, vključujoč goro Slavnik do Zazida, Rakitovca, Črnega kala, Prešnice, Ospa, Socerba (Kraški rob), ob državni meji z Italijo spet do Opatjega sela (Gerželj in sod., 2000).

Značilno za istrijansko ovco je vime pravilne oblike, visoko pripeto z velikimi in lepimi seski. Istrijansko ovco odlikuje velika odpornost in prilagojenost razmeram skromnega okolja. Sedaj dajejo istrijanske ovce v povprečju več mleka kot pred leti, ko je bila oskrba in prehrana skromnejša. Ovce dajo v laktaciji povprečno 143 kg mleka s 6,2 % mlečne maščobe in 5,2 % beljakovin. Nekatero ovce dajejo mleko, ki v povprečju vsebuje več kot 8 % masti in 6 % beljakovin (Gerželj in sod., 2000).

Območje, kjer se ovce pasejo, lahko razdelimo na:

- nižinsko - dolinsko travinje; ki se razprostira v rečnih in kraških dolinah do nadmorske višine 300 m. Običajno so to težka tla, manj primerna za obdelavo ali pa so tako plitva, da oranje ni mogoče. V ruši najdejo prostor visoke trave (visoka pahovka, mačji rep, travniška biljnica in navadna latovka), metuljnice (črna detelja, grašice, nakota) in zeli. Ruša je sestavljena iz visokih rastlin, predvsem trav (modra stožka, rušnata masnica, trst), podtrav (šaši, ločki, srplje) in zeli (mehki osat, preslice, zlatice) (Gerželj in sod., 2000).
- hribovsko - kraško travinje: to se razprostira do nadmorske višine 1000 m. Ta zemljišča so strma pobočja ali pa je površje razgibano in kamnito. Slabe rastne razmere za uspevanje kakovostne ruše so druga značilnost tega travnatega sveta. Zaradi tanke plasti zemlje na nagnjenih zemljiščih so to slabo rodovina tla. Rastline pogosto trpijo zaradi suše, kljub zadostni količini padavin, ker tla slabo zadržujejo vodo. Večji del tega travinja (senožeti, lazi) je bilo zadnjih 200 let namenjeno pridelovanju mrve z ročno košnjo in paši drobnice (Gerželj in sod., 2000).

2.1.2 Opis istrske pramenke

Istrska pramenka je dobila ime po polotoku Istra in izrazito dolgi pramenasti ter grobi volni. Danes je ta pasma zastopana predvsem na Krasu, v Istri in ponekod v Beli krajini. Istrska pramenka izvira od evropskega muflona. Njen prednik je domača primitivna bela ovca, ki je bila razširjena po vsej Evropi in je znana pod imenom Zackel. Skupino pramenk delimo na posamezne soje; ti so nastali v različnih podnebnih razmerah in pri različnih načinih reje. Poznamo veliko sojev pramenk, ki se med seboj zelo razlikujejo po prireji. Istrska pramenka sodi med večje soje pramenk (Kompan in sod., 1996).

Telesna masa ovc znaša 65 do 80 kg, ovnov 80 do 100 kg. Ovce so praviloma brez rogov, ovni pa imajo dobro razvite, zavite rogove. Istrska pramenka je prilagojena dolgi hoji in paši po suhem kraškem terenu, kar kaže že njena zgradba, saj ima dolg trup ter močne in čvrste noge. Barva večine ovc je bela s temnimi pikami po glavi in trupu, pri nekaterih prevladuje temna barva. Ima močno glavo z izbočenim nosnim grebenom, vendar ošiljen sprednji del, da lahko išče skromno pašo med kamni. Ušesa so štrleča in ne prevelika. Vime je obsežno z velikimi seski, primerno za ročno in strojno molžo. Za pramenke je značilna slaba obraslost po trebuhu, spodnjem delu vratu in nog. Drugod jo pokriva redka, groba in resasta krovna dlaka. Vsi soji pramenke so pozno zreli, rast končajo pri starosti treh do štirih let. Spolno dozoriijo pri starosti 16 do 18 mesecev. Pri tej starosti istrsko pramenko tudi prvič pripuščajo. Nekdaj so za pleme odbirali le vzdržljive in skromne živali z enim jagnjetom, ki so bile sposobne prehoditi tudi po več deset kilometrov na dan. Istrsko pramenko uporabljajo kot mlečno pasmo, zadnje čase v kombinaciji s prirejo jagnjet. V običajnih rejskih razmerah je njena mlečnost med 100 in 150 kg v laktaciji z 9 % mlečne maščobe in več kot 6,4 % beljakovin. Nekatere živali dajejo celo mleko, ki vsebuje več kot 13 % maščobe, nad 7 % beljakovin in več kot 25 % suhe snovi. V Sloveniji redimo približno 300 do 400 ovc te pasme, ki je vključena tudi v program genske banke (Kompan in sod., 1996).

2.1.3 Ovčje mleko

Ovčje mleko vsebuje razmeroma veliko suhe snovi, maščobe in beljakovin, a se sestava mleka znatno spreminja odvisno od pasme, obdobja laktacije, klimatskih pogojev, kot tudi od vzreje in načina reje (Miletič, 1994).

Vsebuje povprečno 18,3 % suhe snovi, kar je približno za tretjino več, kot je vsebuje kravje mleko. To je predvsem posledica večje vsebnosti maščobe in beljakovin, ki jih ovčje mleko vsebuje povprečno 7,1 % in 5,7 %. Prav zaradi visoke vsebnosti teh dveh komponent je ovčje mleko najprimernejše za izdelavo sirov, saj je izplen sira skoraj dvakrat večji kot pri izdelavi sira iz kravjega mleka (Đorđević, 1982).

Beljakovine ovčjega mleka se kakovostno ne razlikujejo od beljakovin kravjega mleka. Delimo jih na kazeine in serumske oz. sirotkine beljakovine. Glavni predstavnik kazeinov v ovčjem mleku je α_{s1} kazein, prav tako kot v kravjem. Velika je tudi podobnost β - in κ - (kapa) kazeina, z majhno razliko v aminokislinski sestavi. Serumske ali sirotkine beljakovine so beljakovine, ki ostanejo raztopljene v mlečnem serumu ali sirotki po izločanju kazeinov pri vrednosti pH 4,6. Njihova topnost se zmanjša, če mleko segrevamo, zato se pri temperaturah nad 60 °C postopno izkosmičijo. To lastnost izkoriščamo predvsem pri ovčjem mleku za izdelavo albuminske skute. Glavni sirotkini beljakovini sta β -laktoglobulin in α -laktalbumin (Rogelj, 1996).

Ovčje mleko vsebuje povprečno 4,6 % laktoze, kar je v primerjavi s kravjim mlekom nekoliko manj. Razlika je tudi v dejstvu, da količina laktoze v ovčjem mleku precej bolj variira z obdobjem laktacije in celo iz dneva v dan (Đorđević, 1982).

Mleko ovc vsebuje povprečno 0,9 % mineralov, kar je nekoliko več kot jih vsebujeta kravje in kozje mleko. Je sicer nekoliko manj bogato s kalcijem (0,16 %) in fosforjem (0,14 %) kot kozje in kravje mleko, vsebuje pa povprečno 0,27 % klora (v obliki kloridov), kar je precej več kot ga vsebuje kozje (0,15 %) ali kravje mleko (0,10 %) (Jandal, 1996).

Ovčje mleko je bele barve, prijetnega okusa in brez vonja, če so bili postopki v času molže in po njej ustrezni. Kislost svežega ovčjega mleka se giblje od 8 °SH do 10 °SH, vrednost pH pa doseže 6,65. Gostota variira od 1,034 do 1,036 g/ml, temperatura točke ledišča pa od -0,570 °C do -0,575 °C (Miletič, 1994).

2.1.4 Izdelava kraškega ovčjega sira

Sir tradicionalno izdelujejo iz surovega mleka, v večjih sirarnah pa je priporočljivo mleko termizirati (Gerželj in sod., 2000).

Termizacija: Mleko segrejejo na 64 °C za 30 minut in ohladijo na temperaturo usirjenja 31 - 33 °C.

Sirjenje poteka tako, da mleko najprej temperirajo na 31 – 33 °C. Mleku v sirarskem kotlu dodajo, 5 do 10 minut pred dodatkom sirišča, 0,4 do 0,6 % fermentirane sekundarne sirotke, nato pa toliko sirišča, da mleko koagulira v 30 do 40 minutah. Ko je koagulum dovolj čvrst (poskus z roko - školjkast lom), ga pričnejo rezati in drobiti do velikosti pšeničnega zrna, kar traja približno 5 do 10 minut. Zrno nato v sirotki ob stalnem mešanju dogrevajo na temperaturo 38 do 42 °C (sušenje zrna). Drobljenju in sušenju zrna, ki traja 10 do 15 minut, sledi 10 minutno počivanje. Po 10 minutah v kotlu (v sirotki) oblikujejo iz sirnine hlebec, ki ga v sirotki razrežejo na kose. Kose sirnine prenesejo v modele na sirarsko mizo. V primeru, da imajo ustrezna perforirana oblikovala, lahko postopek ločevanja sirnega zrna od sirotke izvedejo tudi z ulivanjem ali prečrpavanjem sirnega zrna in sirotke direktno v oblikovala. Sledi 12 do 18 urno stiskanje. Medtem povečujejo pritisk in modele večkrat obrnejo. Po stiskanju prenesejo sire v slanico ali pa ga solijo na suho. V slanici, s temperaturo 15 do 18 °C in koncentracijo 20 % kuhinjske soli, ostane sir do 24 ur. Po odcejanju in sušenju površine sira, prenesejo sire v zorilni prostor (temperatura 15 - 18 °C, relativna vlaga 75 do 85 %). Sir zorijo najmanj dva meseca, v izjemnih primerih tudi do enega leta. V času zorenja je potrebno sire obračati in negovati (čiščenje). Iz 100 kg ovčjega mleka izdelajo 15 do 17 kg zrelega kraškega ovčjega sira (Gerželj in sod., 2000).

2.1.5 Sestava in značilnosti sira

Opredelitev kraškega ovčjega sira po Gerželj in sod. (2000):

Izvor: Slovenija
Tip: trdi tip
Oblika: okrogli hlebec
Dimenzije: teža = 2,5 – 5 kg
premer = 20 – 26 cm
višina = 9 – 10 cm

Zunanji videz: Skorja sira je gladka, ravna, obodna stran lahko rahlo izbočena, sivo-rjave barve.

Slika na prerezu: Testo je kompaktno, povezano, lomljivo vendar ne drobljivo, enakomerne sivo-bež barve, načelno brez oces 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: Aromatična, intenzivna, polna do rahlo pikantna, značilna za ovčji sir.

Normalna konzumna zrelost: Najmanj 60 dni, lahko ga zorimo 90 dni do enega leta.

Osnovna kemijska sestava: % suhe snovi = najmanj 60 %
% maščobe v suhi snovi = najmanj 45 %
% soli = 1,5 do 2,5 %

2.2 MLEČNA MAŠČOBA

Mlečna maščoba je, poleg beljakovin, poglavitna sestavina mleka, gledano tako s fiziološko funkcionalnega kot tudi ekonomskega stališča. Na podlagi vsebnosti maščobe (in beljakovin) se oblikuje odkupna cena mleka, kar je za pridelovalca bistvenega pomena (Miletič, 1994). Nas bo v nalogi bolj zanimala mlečna maščoba v smislu fiziološke funkcionalnosti in prehranske vrednosti.

Mlečna maščoba je bogat vir energije, saj od celotne energetske vrednosti mleka odpade na maščobo povprečno 54 % energije. Pri vrstah, ki imajo višji delež mlečne maščobe, pa je ta odstotek še višji. Povprečna energetska vrednost mlečne maščobe je 9 kcal/g ali 37 kJ/g (Tratnik, 1998).

Poleg energetske vrednosti je pomembna tudi prehranska oziroma nutritivna vrednost. Mlečna maščoba je pomemben vir esencialnih maščobnih kislin in v maščobi topnih vitaminov (A, D, E in K) (Tratnik, 1998).

V sirarstvu je mlečna maščoba pomembna, ker daje prijeten okus siru, izboljšuje njegovo teksturo in preprečuje premočno krčenje kazeina. Prav tako sodeluje pri vezanju vode in vpliva na pridobitev sira. Pri zorenju, predvsem mehkih sirov, jo mikroorganizmi z encimi razgrade, kar prispeva k specifičnemu okusu in aromi sira (Slanovec, 1982; Akin in sod., 2003). Po drugi strani pa lahko povzroči številne napake v mlečnih izdelkih (napake v aromi in okusu).

2.2.1 Sestava in lastnosti mlečne maščobe

Mlečna maščoba je v 98 % sestavljena iz triacilglicerolov. Ti so zgrajeni iz glicerola, na katerega so, z estrskimi vezmi, vezane maščobne kisline. Poleg triacilglicerolov so v mleku prisotne manjše količine di- in monoacilglicerolov, fosfolipidov, prostih maščobnih kislin, holesterola in holesterol-estrov (Rogelj, 1996).

Maščoba se v mleku nahaja v obliki kroglic, obdanih z adsorpcijskim slojem ali membrano, ki stabilizira maščobo v notranjosti in jo varuje pred encimsko razgradnjo in oksidacijo. Velikost kroglic variira od 0,1 do 22 μm , kar je odvisno od vrste živali, pasme živali in obdobja laktacije (Đorđević, 1982).

Velikost kroglic ima tudi praktičen pomen. Ker ima mlečna maščoba manjšo gostoto od ostalih sestavin mleka, se maščobne kroglice dvignejo na površje. Ta pojav imenujemo razslojevanje. Večje kot so kroglice, hitreje se dvigujejo. Največje maščobne kroglice ima ovčje mleko, kar dvakrat večje od kroglic kravjega mleka, najmanjše pa so kroglice v kozjem mleku. Glede na velikost kroglic bi pričakovali, da bo razslojevanje najhitrejše v ovčjem mleku, vendar temu ni tako. Mleko ovc je zaradi velike vsebnosti maščob in beljakovin najbolj viskozno in prav to preprečuje hiter dvig maščobnih kroglic (Đorđević, 1982).

Ko govorimo o razslojevanju, je potrebno omeniti aglutinin. To je snov, ki je sestavljena iz imunoglobulinov in lipoproteinov in ima sposobnost zlepljanja maščobnih kroglic. Taki skupki zlepljenih maščobnih kroglic se hitreje dvignejo na površino in tako še pospešijo razslojevanje. Aglutinin se nahaja v kravjem mleku, medtem ko ga v ovčjem in kozjem mleku ni. Zato se na ohlajenem kravjem mleku hitreje pojavi smetana, ki je tudi bolj čvrsta od smetane ovčjega mleka. Pri kozjem mleku se zaradi odsotnosti aglutinina in povprečno najmanjših maščobnih kroglic smetana pojavi le redkokdaj (Rogelj, 1996).

Pri proizvodnji sirov je velikost maščobnih kroglic pomembna pri zadrževanju maščobe v sirnini oziroma pri prehodu maščobe v sirotko. Če so maščobne kroglice večje, je tudi prehod maščobe v sirotko večji. Zgodi se, da maščobne kroglice izplavajo na površino pred zaključkom koagulacije mleka. Tako se kazein nahaja pod dvignjeno maščobo in, ko koagulira, ne more zadržati vse maščobe. Drugi razlog za večji prehod maščobe v sirotko pa je izločanje maščobe pri rezanju in obdelavi koaguluma. Maščoba se izloča s prostih ploskev razrezanega koaguluma in večje kot so maščobne kroglice, večja je izguba (Đorđević, 1982).

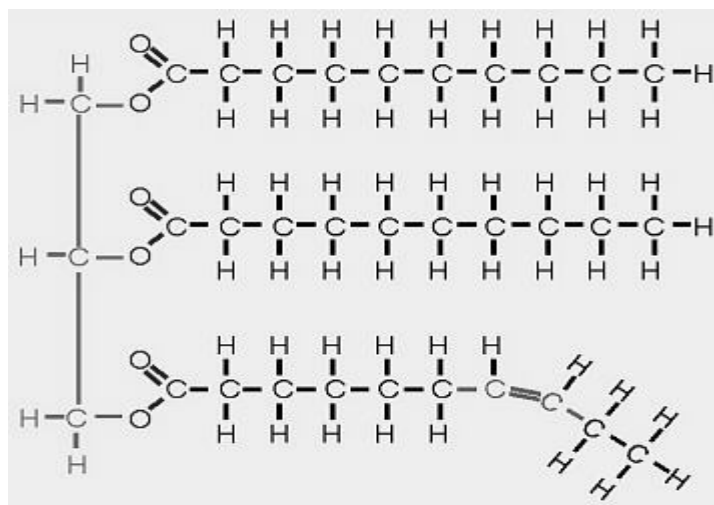
Membrana, ki obdaja maščobne kroglice je dvoplastna. Sestavljena je iz fosfolipidov in proteinov, ki ločujejo kroglico od okolice. Ta lipoproteinski kompleks je pri različnih vrstah živali različno čvrst. Membrana maščobnih kroglic ovčjega in kravjega mleka je močnejša kot v kozjem mleku, zato moramo biti pri delu s kozjim mlekom previdnejši, da ne pride do poškodb membrane in posledično razgradnje maščob, saj se tako razvije 'okus pa kozah' (Rogelj, 1996).

V sloju fosfolipidov znotraj membrane in pod njo se nahajajo tudi holesterol (85 % skupne količine v mleku), nevtralni gliceridi, vitamin A in karotenoidi. Slednji vplivajo na barvo mleka in kasneje tudi sira. Največ karotenoidov vsebuje kravje mleko, od tod tudi rumenkasta barva mleka in sira. V ovčjem in kozjem mleku pa je večina (80 %) karotenoidov pretvorjenih v vitamin A, zato sta kozje mleko in sir izrazito bele barve, ovčji sir pa je sive barve (Tratnik, 1998; Saini in Gill, 1991).

2.2.2 Triacilgliceroli

Najenostavnejša struktura lipidov so triacilgliceroli, imenovani tudi trigliceridi oziroma nevtralne maščobe. Triacilgliceroli so sestavljeni iz maščobnih kislin, ki so estrsko vezane na glicerol (Slika 1). Večina triacilglicerolov, ki se pojavljajo v naravi, je mešanih. To pomeni, da vsebujejo dve ali tri različne maščobne kisline. Triacilgliceroli so zaradi estrske vezi med polarnim glicerolom in polarno karboksilno skupino (-COOH) maščobnih kislin, nepolarne in hidrofobne molekule, ki se ne topijo v vodi (Nelson in Cox, 2000).

Triacilgliceroli so poimenovani po maščobnih kislinah, ki jih vsebujejo (tristearin, triolein, palmito- stearin, itd.). Te vplivajo tudi na fizikalne lastnosti triacilglicerola. Tiste maščobe, ki vsebujejo večji delež kratkoverižnih maščobnih kislin in nenasičenih maščobnih kislin, imajo nižje tališče (in visoko jedno število) kot nasičene dolgoverižne maščobne kisline (nizko jedno število). Zato so rastlinske maščobe pri sobni temperaturi tekoče (olja), živalske maščobe pa trdne (loj) (McDonald in sod., 1995).



Slika 1: Strukturni prikaz sestave triacilglicerola (Carter, 1996)

V preglednici 1 so prikazane maščobne kisline z njihovimi kemijskimi in trivialnimi imeni.

Preglednica 1: Pregled maščobnih kislin (IUPAC nom., 1984; Koman-Rajšp in sod., 1998)

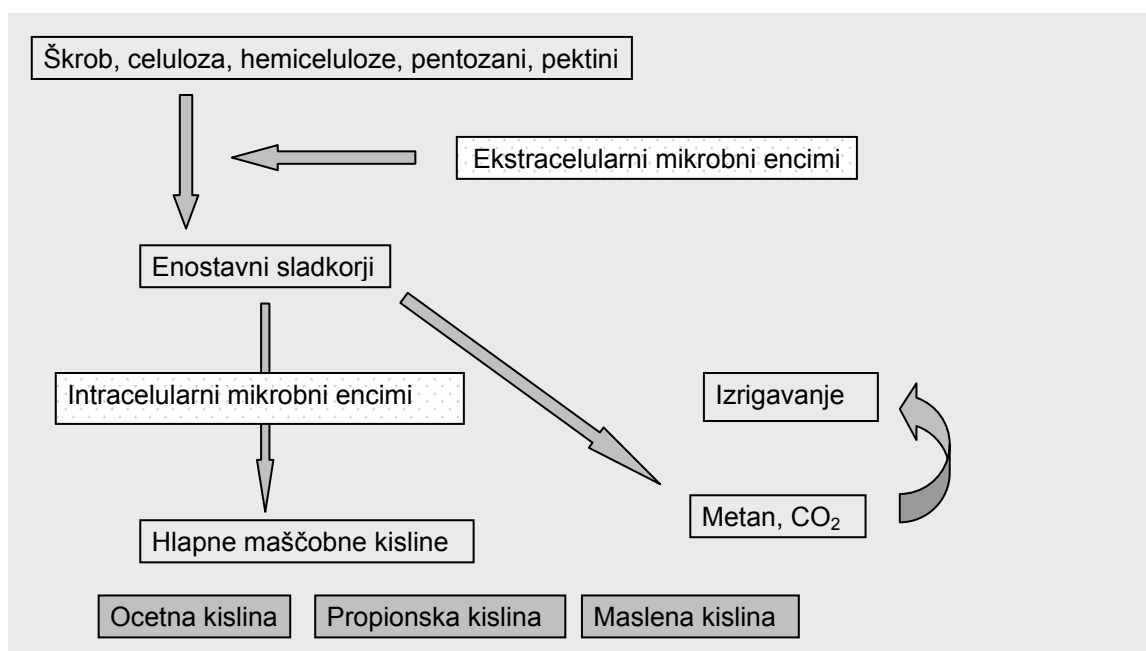
Okrajšava	Sistematsko ime	Trivial name	Trivialno ime
C1:0	metanojska	formic	mravljična
C2:0	etanojska	acetic	ocetna
C3:0	propanojska	propionic	propionska
C4:0 iso	2-metil propanojska	isobutyric	izomaslena
C4:0	butanojska	butyric	maslena
C4:1	trans-2-butenjska	α -krotonic	krotonska
C5:0	pentanojska	valeric	valerianska
C6:0	heksanojska	caproic	kaprojska
C8:0	oktanojska	caprylic	kaprilska
C9:0	nonanojska	pelargonic	pelargonska
C10:0	dekanojska	capric	kaprinska
C10:1 n-1	9-decenojska	caproleic	kaproleinska
C11:0	undekanojska		
C11:1 n-1	cis-10-undekanojska		
C12:0	dodekanojska	lauric	lavrinska
C12:1 n-1	cis-11-dodecenojska		
C13:0	tridekanojska		
C13:1 n-1	cis-12-tridecenojska		
C14:0	tetradekanojska	myristic	miristinska
C14:1 n-5	cis-9-tetradecenojska	myristoleic	miristooleinska
C15:0 iso	13-metiltetradekanojska	13-methylmyristic	13-metilmiristinska
C15:0 anteiso	12-metiltetradekanojska	12-methylmyristic	12-metilmiristinska
C15:0	pentadekanojska		
C15:1 n-5	cis-10-pentadecenojska		
C16:0 iso	14-metilpentadekanojska	isopalmitic	izopalmitinska
C16:0	heksadekanojska	palmitic	palmitinska
			se nadaljuje

nadaljevanje

Okrajšava	Sistematsko ime	Trivial name	Trivialno ime
C16:1 n-7	cis-9-heksadecenojska/ trans-9-heksadecenojska	palmitoleic/ palmitelaicid	palmitoleinska/ palmitelaidinska
C17:0 iso	15-metilheksadekanojska	15-methylpalmitic	15-metilpalmitinska
C17:0 anteiso	14-metilheksadekanojska		
C17:0	heptadekanojska	margaric/ daturic	
C17:1 n-7	cis-10-heptadecenojska		
C18:0	oktadekanojska	stearic	stearinska
C18:1 n-12	cis-6-oktadecenojska/ trans-6-oktadecenojska	petroselinic/ petroselaidic	petroselinska/ petroselaidinska
C18:1 n-9	cis-9-oktadecenojska/ trans-9-oktadecenojska	oleic/elaidic	oleinska/ elaidinska
C18:1 n-7	cis-11-oktadecenojska/ trans-11-oktadecenojska	asclpic/ cis-vaccenic	cis- vakcenska
C18:2 n-6	cis-9,12-oktadekadienojska/ trans-9,12-oktadekadienojska	linoleic + linolelaidic	linolna + linolelaidinska
C18:3 n-6	cis-6,9,12-oktadekatrienojska	gamma linolenic (GLA)	
C19:0	nonadekanojska		
C19:1 n-9	cis-10-nonadecenojska		
C18:3 n-3	cis-9,12,15-oktadekatrienojska	alpha linolenic (ALA)	linolenska
CLA	cis-9,trans-11-oktadekadienojska	linoleic (conjugated)	linolna (konjugirana)
C18:4 n-3	cis-6,9,12,15-oktadekatetraenojska	stearidonic	stearidonska
CLA	trans-10,cis-12-oktadekadienojska	linoleic (conjugated)	linolna (konjugirana)
C20:0	eikozanojska	arachidic	arahidinska
C20:1 n-15	cis-5-eikozanojska		
C20:1 n-12	cis-8-eikozanojska		
C20:1 n-9	cis-11-eikozanojska		
C20:2 n-6	cis-11,14-eikozadienojska		
C20:3 n-6	cis-8,11,14-eikozatrienojska	homo-γ-linolenic (HGLA)	
C20:4 n-6	cis-5,8,11,14-eikozatetraenojska	arachidonic (AA)	arahidonska
C20:3 n-3	cis-11,14,17-eikozatrienojska		
C20:5 n-3	cis-5,8,11,14,17-eikozapentaenojska	EPA	
C22:0	dokozanojska	behenic	behenska
C22:1 n-9	cis-13-dokozaenojska/ trans-13-dokozaenojska	erucic/brassicidic	eruka kisl./ brasidinska
C22:2 n-6	cis-13,16-dokozadienojska		
C23:0	trikozanojska		
C22:4 n-6	cis-7,,10,13,16-dokozatetraenojska	adrenic	adrenska
C22:3 n-3	cis-13,16,19-dokozatrienojska		
C22:5 n-3	cis-7,10,13,16,19-dokozapentaenojska	ω3 - DPA	
C24:0	tetrakozanojska	lignoceric	
C22:6 n-3	cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenojska	DHA	
C24:1 n-9	cis-15-tetrakozenojska	selacholeic/ nervonic	selaholeinska/ nervonska

2.2.3 Hlapne maščobne kisline

Pri razgradnji ogljikovih hidratov v vampu prežvekovalcev mikrobi uporabijo enostavne sladkorje za lastno presnovo. V teh procesih nastajajo hlapne (nižje) maščobne kisline, kot so očetna, propionska in maslena kislina, ter plini (predvsem metan in CO₂) (Slika 2). Hlapne maščobne kisline se absorbirajo skozi vampno sluznico in jih organizem prežvekovalca uporablja v svoji presnovi. Te kisline so zelo pomembne za energijsko preskrbo gostiteljevega organizma, saj predstavljajo kar 65 – 80 % vse energije, ki se sprostí kot posledica mikrobne fermentacije v vampu (Žgajnar, 1990).



Slika 2: Nastanek hlapnih maščobnih kislin z mikrobno razgradnjo ogljikovih hidratov (prirejeno po Žgajnar, 1990)

Skupna količina in razmerje med hlapnimi maščobnimi kislinami sta močno odvisna od kakovosti in količine zaužite krme. Pri mlečnih živalih moramo biti pozorni na razmerje med očetno in propionsko kislino, saj nastajajo mlečne maščobe zvečine iz očetne kisline (Žgajnar, 1990).

Pri prežvekovalcih nastaja veliko hlapnih maščobnih kislin. Krava z 20 litri mleka tvori dnevno 3 – 5 kg očetne kisline, 0,6 – 1,2 kg propionske kisline in 0,3 - 0,6 kg maslene kisline (Žgajnar, 1990).

Propionska kislina prehaja v kri in se v jetrih pretvori v glukozo (v procesu glukoneogeneze). Maslena kislina se absorbira kot β -hidroksi maslena kislina (BHBA), s krvjo preide v tkiva, predvsem v skeletno mišičje in srčno mišico, kjer se porablja kot vir energije. Očetna kislina, ki je glavni produkt razgradnje ogljikovih hidratov v vampu, je v krvi prisotna v precejšnji količini. Veliko tkiv jo lahko uporablja kot vir energije. Očetna kislina je v sirih količinsko najbolj zastopana hlapna maščobna kislina. V Feta siru je celo glavna nosilka arome. V sirih nastane v glavnem z razgradnjo (oksidativna deaminacija ali dekarboksilacija) aminokislin (alanina in serina) s pomočjo bakterij. Druga pot nastanka očetne kisline v sirih pa poteka s fermentacijo laktoze (Molimard in Spinnler, 1996).

2.2.4 Skupne maščobne kisline

Maščobne kisline so funkcionalne komponente maščobne molekule. Sestavljene so iz alkilne verige ogljikovih in vodikovih atomov in karboksilne skupine. Število C-atomov se giblje od 4 do 36. Glede na njihovo število v verigi, ločimo maščobne kisline na kratkoverižne, srednjeverižne in dolgoverižne (Lobb, 1992).

- Kratkoverižne maščobne kisline (C4 - C10): Vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin je v mlečni maščobi precej visoka. Literatura navaja 6 – 10 % delež od skupnih maščobnih kislin. Znano je, da imajo nekatere kratkoverižne maščobne kisline precej neprijeten vonj. Med njih spadajo maslena kislina, ki jo lahko zaznamo že v koncentraciji 10^{-6} g/m³, ter kaprojska in kaprilska kislina. Če se te maščobne kisline znajdejo proste v mleku in mlečnih izdelkih v večjih količinah, povzročijo neprijetne spremembe vonja in okusa (Đorđević, 1982).

- Srednjeveržne maščobne kisline (C11 - C17): Te maščobne kisline, predvsem lavrinsko (C12:0), miristinsko (C14:0) in palmitinsko (C16:0), uvrščamo med najbolj škodljive, saj povzročajo aterosklerozo t.j. odlaganje maščob na žilne stene, zvišujejo raven holesterola v krvi, zvišujejo krvni pritisk in celo povečujejo verjetnost pojava določenih oblik raka (Dexheimer, 1992).
- Dolgoveržne maščobne kisline (C18 in naprej): Med dolgoveržnimi maščobnimi kislinami poleg stearinske (C18:0) prevladuje z 21 % oleinska (C18:1), daleč najpomembnejši predstavnici dolgoveržnih maščobnih kislin pa sta linolna (C18:2 n-6) in linolenska (C18:3 n-3). Teh živalski in človeški organizem ni sposoben sintetizirati, zato jih mora zaužiti s krmo oziroma hrano. Pravimo, da sta maščobni kislini esencialni (McDonald in sod., 1995).

Število vodikovih atomov, vezanih na ogljik, da maščobni kislini njen funkcionalni status. Če imajo C- atomi popolno število vodikovih atomov, je veriga nasičena in ima ravno obliko. Če pa so vodikovi atomi odstranjeni iz strukture, pravimo, da je veriga nenasičena. Preostali atomi stabilizirajo verigo tako, da se ustvari dvojna vez. Nenasičene maščobne kisline imajo lahko različno število dvojnih vezi. Tako ločimo enkrat nenasičene ali mononenasičene (MUFA) in večkrat nenasičene ali polinenasičene (PUFA) maščobne kisline (Lichtenstein, 1995).

2.2.4.1 Nasičene maščobne kisline

Nasičene maščobne kisline v svoji alkilni verigi ne vsebujejo dvojnih vezi. Veriga je bolj ali manj ravna in kompaktna. Maščobe z vgrajenimi nasičenimi maščobnimi kislinami so pri sobni temperaturi trdne. Za metabolne procese živali nasičene maščobne kisline niso esencialne, saj jih organizem lahko producira sam. Glavni vir nasičenih maščobnih kislin so živalske maščobe, veliko pa jih vsebujejo tudi olja tropskih rastlin (McDonald in sod., 1995).

2.2.4.2 Nenasičene maščobne kisline

Nenasičene maščobne kisline imajo zgradbo podobno nasičenim, le da se vzdolž alkilne verige ustvari ena ali več dvojnih vezi. Pozicijo dvojnih vezi označujemo na dva načina:

- Štetje ogljikovih atomov se začne pri karboksilni skupini ($-\text{COOH}$), ki dobi številko 1. Simbol Δ ponazarja dvojne vezi, številke pa njihove pozicije. Pri večini enkrat nenasičenih maščobnih kislinah se dvojna vez pojavlja med devetim in desetim C-atomom (Δ^9), pri večkrat nenasičenih pa med C12 in C13 (Δ^{12}) ali C15 in C16 (Δ^{15}) (Nelson in Cox, 2000).
- Štetje ogljikovih atomov se začne pri metilni skupini ($-\text{CH}_3$), pri katerem dobi številko 1 ogljik metilne skupine. Glede na položaj prve dvojne vezi, ločimo tri glavne skupine nenasičenih maščobnih kislin: n-3, n-6 in n-9. Obstajajo tudi n-1, n-5, n-7, n-12 in n-15 maščobne kisline, vendar so manjšega pomena. Ta način štetja se uporablja predvsem v prehranski stroki (Lobb, 1992).

2.2.4.3 Cis in trans maščobne kisline

Nenasičene maščobne kisline se lahko nahajajo v dveh konfiguracijah. Če sta vodikova atoma ob dvojni vezi na isti strani, je maščobna kislina v **cis** konfiguraciji (Beare- Rogers in sod., 2001). To povzroči, da se alkilna veriga 'zalomi'. Taka struktura maščobnim kislinam onemogoča tesno prileganje, kar ima za posledico nižje tališče. Zato so maščobe, ki vsebujejo veliko nenasičenih maščobnih kislin v cis konfiguraciji (npr. rastlinska olja, ribje olje), pri sobni temperaturi tekoče. V naravi je večina dvojnih vezi v cis konfiguraciji, kar je pomembno predvsem pri celičnih membranah, ki tako ohranjajo svojo prožnost (fluidnost). V mlečni maščobi najbolj zastopana cis- maščobna kislina je oleinska (C18:1 n-9) (Nelson in Cox, 2000).

O **trans** konfiguraciji govorimo, ko se vodikova atoma pojavita na nasprotni strani dvojne vezi (Beare- Rogers in sod., 2001). Zato so maščobne kisline bolj linearne, toge in imajo višje tališče. Bolj linearna struktura jim omogoči boljše prileganje, zato so maščobe z visoko vsebnostjo trans maščobnih kislin (npr. margarina, arašidovo maslo) pri sobni temperaturi trdne. V mleku se v največji količini pojavlja vakcenska kislina (tC18:1 n-7) (Nelson in Cox, 2000).

2.2.4.4 Esencialne maščobne kisline

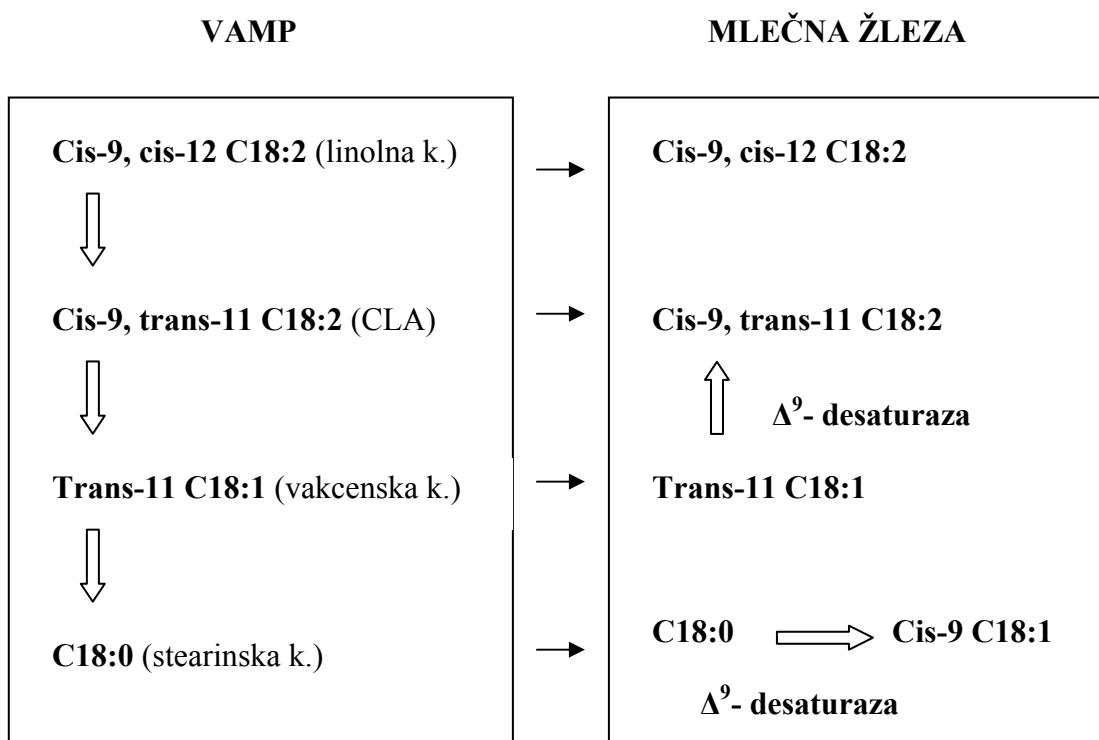
Živalsko in človeško telo lahko izgradita večino maščob, ki jih potrebujeta, vključno s holesterolom, nasičenimi in nenasičenimi maščobnimi kislinami. Ne moreta pa izgraditi dveh maščobnih kislin, ki ju imenujemo esencialni in ju moramo zaužiti s krmo oziroma hrano. To sta linolna (C18:2 n-6) in linolenska kislina (C18:3 n-3). Obe sta večkrat nenasičeni, predstavljata pa tudi osnovo za vse ostale n-6 in n-3 maščobne kisline (Nelson in Cox, 2000).

Iz linolne kisline se v telesu sintetizirata arahidonska kislina (C20:4 n-6) in gama linolenska kislina (GLA) (C18:3 n-6). Ti sicer nista striktno esencialni, a sta v organizmu zelo pomembni, saj predstavlja arahidonska kislina osnovo za sintezo eikozanoidov (prostaglandini, prostaciklini, levkotrieni, tromboksani) in hormonom podobnih snovi, ki imajo vpliv na imunski sistem, krvni pritisk, strjevanje krvi in razna vnetja (Mozzon in sod., 2002).

Linolenska kislina (včasih tudi alfa linolenska) predstavlja osnovo ostalim maščobnim kislinam iz n-3 skupine, kot so eikozapentaenojska (EPA), dokozapentaenojska (DPA) in dokohaheksaenojska kislina (DHA). EPA je prekursor za poseben razred eikozanoidov podobno kot arahidonska kislina. Vse n-3 maščobne kisline močno vplivajo na zdravje človeka, saj preprečujejo kardiovaskularne in nevrološke bolezni, pripisujejo pa jim tudi vlogo pri plodnosti in razvoju živčnega sistema (Mozzon in sod., 2002).

2.2.4.5 Vakcenska kislina

Vakcenska kislina (trans-11-oktadecenojska kislina) je glavna trans maščobna kislina v mlečni maščobi. Predstavlja povprečno 1,7 % delež od vseh maščobnih kislin (razpon od 0,4 do 4 %). V biohidrogenaciji C18 večkrat nenasičenih maščobnih kislin, se pojavlja kot vmesni produkt, je pa tudi glavni prekurzor za konjugirano linolno kislino v mleku (Turpeinen in sod., 2002; Cabiddu in sod., 2005) (Slika 3). Hidrogenacija vakcenske kisline v vampu poteka počasneje kot hidrogenacija ostalih komponent (vršijo jo drugi mikroorganizmi), zato jo smatramo za hitrost limitirajočo v procesu biohidrogenacije. Zaradi tega se vakcenska kislina v vampu praviloma akumulira (Chouinard, 1999).



Slika 3: Metabolne poti v biosintezi konjugirane linolne kisline (cis-9, trans-11) (Chouinard, 1999)

2.2.4.6 Konjugirana linolna kislina (CLA)

Konjugirana linolna kislina (CLA) je skupek izomer oktadekadienojske kisline s konjugiranimi dvojnimi vezmi (Ha in sod., 1989), ki se pojavlja v majhnih količinah (<1 % od vseh maščobnih kislin) v mnogih živilih živalskega izvora. Največji del CLA (od 64 – 98 %) v maščobi mleka se ustvari v mlečni žlezi iz vakcenske kisline, s pomočjo encima Δ^9 desaturaze (Piperova in sod., 2002; Kay in sod., 2004) (Slika 3). Manjši del CLA lahko preide v mlečno maščobo posredno iz vampa, saj biohidrogenacija linolne kisline ni vedno popolna. Tako lahko CLA preide iz vampa v krvni obtok, od tu pa v mlečno žlezo. CLA v vampu nastane s pretvorbo linolne kisline s pomočjo bakterije *Butyrivibrio fibrosolvens* v vampu (Mir in sod., 2000), zato vsebujejo maščobe prežvekovalcev več CLA od maščob neprežvekovalcev.

V mleku so odkrili šest izomer CLA, od katerih prevladuje izomera cis-9, trans-11, saj predstavlja 80 - 90 % od skupnih CLA. Druga najštevilčnejša v mleku in mlečnih izdelkih je izomera trans-10, cis-12 (Chin in sod., 1992; Sehat in sod., 1998).

Vsebnost CLA, določena s plinsko kromatografijo, v različnih mlečnih izdelkih variira od 0,55 - 9,12 mg/g maščobe (Lin in Lee, 1997). V splošnem vsebujejo siri, narejeni iz kravjega mleka, od 0,4 - 0,6 utežnega odstotka CLA v maščobi (Ha in sod., 1989).

Preglednica 2: Vsebnost CLA (v ut. %) v različnih ovčjih sirih in ovčjem maslu (Zlatanos in sod., 2002)

	Siri				ovčje maslo
	Feta	trdi (KZ)	trdi (DZ)	albuminski	
CLA (ut. %)	0,9	0,7	0,9	0,7	0,7

KZ (kratko zorenje; do 70 dni), DZ (dolgo zorenje; 5 mesecev in več)

Na vsebnost CLA v sirih vpliva več dejavnikov. Opazili so, da imajo nekateri fermentirani mlečni izdelki večjo vsebnost CLA kot nefermentirano mleko (Ha in sod., 1989; Jiang in sod., 1998). Colbert in Decker (1991) poročata o zvišanju vsebnosti CLA v siru po 4 in 8 tednih zorenja. Podobne rezultate so dobili tudi Zlatanos in sod. (2002) (Preglednica 2).

Največji vpliv na vsebnost CLA ima prehrana (Collomb in sod., 2002a; Precht in sod., 2002; Lock in Garnsworthy, 2002). Vsebnosti CLA v mleku vhlavljenih živali, krmljenih s senom in koncentratu, in mleku živali na paši, so zelo različne. Kelly in sod. (1998) in Dhiman in sod. (1999) poročajo o več kot dvakrat višji koncentraciji CLA (22 mg/g proti 8,9 mg/g maščobe oziroma 1,08 % proti 0,46 % od vseh maščobnih kislin) v mleku krav, ki so bile na paši. Zato prehrano vhlavljenih živali rejci mnogokrat popestrijo z različnimi maščobnimi dodatki. Raziskave so pokazale znatno povišanje koncentracije CLA v mleku, če je krmni obrok živali vseboval ribje olje (Mozzon in sod., 2002). Vsebnost CLA se spreminja tudi z nadmorsko višino paše živali, saj se z le-to spreminja tudi sestava travne ruše. Raziskava maščobnokislinske sestave kravjega mleka živali, ki so se pasle na treh različnih nadmorskih višinah (nižina, sredogorje in visokogorje), je pokazala, da se z dvigovanjem nadmorske višine v mleku najbolj poveča prav koncentracija CLA. Mleko iz nižine je vsebovalo 0,81 g CLA/100g maščobe, mleko s sredogorskih pašnikov 1,5 g CLA/100g, mleko iz visokogorja pa kar 2,18 g CLA/100g maščobe (Collomb in sod., 2002a).

Poleg naštetih dejavnikov vpliva na vsebnost CLA v mleku individualna mikroflora vampa in/ali genetska regulacija (Kelly in sod., 1998).

2.3 ZNAČILNOSTI MAŠČOBNOKISLINSKE SESTAVE MLEČNE MAŠČOBE

2.3.1 Izvor maščobnih kislin v mleku

Maščobne kisline mleka izvirajo iz dveh glavnih virov. Acetat in 3-hidroksi butirat, ki nastajata pri fermentaciji v vampu, sta vira ogljika za maščobne kisline od C4:0 do C14:0 in del C16:0. Te maščobne kisline se tvorijo v mlečni žlezi. Preostanek C16:0 in vse dolgoverižne maščobne kisline pa izvirajo iz krvnih lipidov, ki nastanejo pri presnovi in absorpciji zaužite maščobe ali mobilizaciji maščobnih kislin iz telesnih maščobnih tkiv (Jenkins, 1993).

Na vsebnost maščobe v mleku vpliva vrsta dejavnikov. Glavni vplivi so prehrana, zaporedna laktacija, stadij laktacije, sezona, postopki molže in genetski vplivi (med pasmami in znotraj pasem) (Rogelj in sod., 1996). V nadaljevanju je bolj podrobno opisanih le nekaj od teh vplivov.

2.3.2 Vpliv prehrane na maščobnokislinsko sestavo mlečne maščobe

Prehrana ima daleč največji vpliv na količino in sestavo mlečne maščobe. Prav zato sta ustrezna sestava in količina krmnega obroka zelo pomembna. Glede vpliva na kakovost oziroma konsistenco mlečne maščobe lahko krmila razdelimo v tri skupine (Kircheggner, cit. po Žgajnar, 1990):

- Skupina krmil z velikim jednim številom (mehka konsistenca mlečne maščobe): sončnične, ogrščične in lanene pogače, soja, koruza, ribje maščobe, mlada paša in sploh velike količine mlade zelene krme.
- Skupina krmil z majhnim jednim številom (trda konsistenca mlečne maščobe): mrva, slama, pesa, rž, pšenica, fižol, grašica, sojine in druge tropine z majhnim odstotkom maščob.
- Skupina krmil s srednje velikim jednim številom (srednje trda konsistenca mlečne maščobe): ječmen, oves, tapioka, arašidne pogače, bombažne pogače, pivske tropine, silaže, manjše količine zelene krme in seveda kombinacije krmil z majhnim in velikim jednim številom.

Veliko razliko v sestavi mlečne maščobe v sirih opisujejo Zeppa in sod. (2002), ki so naredili analizo maščobnih kislin zimskih in poletnih sirov. Živali v poskusu so bile čez zimo vhljevljene, krmili pa so jih s senom in koncentratu. Spomladi so jih spustili na pašo, kjer so jim dodajali le vodo in rudninsko - vitaminski dodatek. V poletnih sirih je bilo opaziti znižanje deleža nasičenih, kratko- in srednjeveržnih maščobnih kislin in zvišanje enkrat- in večkrat nenasičenih maščobnih kislin.

Za izboljšanje razmerja maščobnih kislin, predvsem znižanje zdravju škodljivih maščobnih kislin (C14:0, C16:0, C12:0) in zvišanje deleža večkrat nenasičenih maščobnih kislin, se v krmnih obrokih uporablja maščobne dodatke (Mozzon in sod., 2002).

V prehrani mlečnih živali uporabljamo različna rastlinska olja (sojino olje, sončnično olje, olje iz semen bombaža, kanolino olje itd.). Ta imajo 90 – 95 % maščobnih kislin daljših od 14 C atomov, kar 75 % vseh maščobnih kislin pa predstavlja oblika z 18 C atomi, pri čemer je nenasičenost močno variabilna (Mohamed in sod., 1988).

Kot maščobni dodatki se, pogosteje kot olja, uporabljajo kar surova ali toplotno obdelana oljna semena. Raziskava Mohameda in sod. (1988) je pokazala, da bistvenih razlik med krmljenjem maščobnih dodatkov v obliki olja ali oljnih semen (surovih ali toplotno obdelanih) na maščobnokislinsko sestavo ni. Vse tri oblike povzročijo znižanje C16:0 in povišanje C18:0 in C18:1 maščobnih kislin.

Krmljenje obroka z dodatkom kanolinega olja, navadnega sončničnega olja ali obogatenega sončničnega olja (visok odstotek enkrat nenasičenih maščobnih kislin), ima posledično zmanjšanje (20 – 40 %) kratko- in srednjeveržnih maščobnih kislin in 55 – 80 % povečanje maščobnih kislin C18:0 in C18:1 (Middough in sod., 1988).

Pogost dodatek koncentratom je tudi ribje olje. To je zelo bogato z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, predvsem C22:5 n-3 (DPA- dokozaheptaenojska kislina) in C20:5 n-3 (EPA- eikosaheptaenojska kislina). V raziskavi vpliva dodatka ribjega olja v krmni obrok na maščobnokislinsko sestavo ovčjega mleka so Mozzon in sod. (2002) ugotovili, da je dodatek olja povzročil povečanje deležev n-3 večkrat nenasičenih maščobnih kislin, konjugirane linolne kisline (CLA) in trans nenasičenih maščobnih kislin (Mozzon in sod., 2002).

Vpliv sestave maščob v krmi na lastnosti maščobe v mleku je predvsem odvisen od tega, kaj se z maščobami iz krme dogaja v vampu. Vemo, da se večina večkrat nenasičenih maščobnih kislin hidrogenira, okoli 20 % pa jih temu uide (Žgajnar, 1990).

Največji napredek pri krmljenju maščobnih dodatkov je povzročilo odkritje t.i. 'zaščitene maščobe'. Taka maščoba je nedosegljiva vampnim mikroorganizmom in s tem ni podvržena hidrolizi in hidrogenaciji. Tako lahko večkrat nenasičene maščobne kisline nespremenjene preidejo v mleko (Grummer, 1991).

2.3.3 Vpliv obdobja laktacije in sezone na maščobnokislinsko sestavo mlečne maščobe

Vemo, da sta količina in kakovost mleka izpostavljena različnim spremembam tekom leta. Te so, poleg prehrane, odvisne tudi od metabolnih in endokrinih sprememb, ki se nanašajo na klimo in stadij laktacije (Sevi in sod., 2000).

Tekom laktacije in sezone se spreminja tudi sama kakovost maščobe v mleku. Različni avtorji (Barron in sod., cit. po Sevi in sod., 2000; Perea in sod., 2000) poročajo o padcu količine kratkoverižnih in srednjeverižnih maščobnih kislin v mleku pasme ovc Latxa meseca junija (napram mesecu februarju in mesecu aprilu), medtem ko se količina dolgoverižnih maščobnih kislin junija poveča.

2.3.4 Vrsta živali in maščobnokislinska sestava mlečne maščobe

Glavne razlike v sestavi mleka med vrstami živali smo že omenili. Seveda se na ta način razlikujejo tudi posamezne komponente mleka. Razlike v maščobnokislinski sestavi mleka različnih živalskih vrst so predstavljene v preglednici 3.

Preglednica 3: Maščobnokislinska sestava mleka (ut. %) različnih živalskih vrst in humanega mleka (Chow, 1992; Malacarne in sod., 2002; Jahreis in sod., 1999)

	ovca	krava	kobila	ženska
Maščobna kislina	utežni %			
C4:0	3,2	1,4	0,2	0,1
C6:0	2,2	2,1	0,4	0,2
C8:0	2,2	1,7	3,3	0,3
C10:0	6,4	3,5	8,6	2,0
C12:0	3,8	3,9	9,3	6,8
C14:0	15,5	12,6	8,5	10,4
C16:0	25,7	29,5	23,8	28,1
C18:0	14,3	13,3	1,7	6,9
Σ nasičenih MK	73,3	68,0	55,8	54,8
C16:1	2,1	1,7	6,1	3,5
C18:1	24,9	26,3	19,1	33,6
Σ enkrat nenasičenih MK	27,3	28,0	25,2	37,1
C18:2	2,9	2,9	9,6	6,4
C18:3	2,1	1,1	9,4	1,7
Σ večkrat nenasičenih MK	4,9	4,0	19,0	8,1
CLA	1,08	1,01	0,09	0,39

Ovčje mleko vsebuje znatno več kratkoverižnih (predvsem kaprojske, kaprilske in kaprinske) kot tudi skupnih nasičenih maščobnih kislin, kot mleko primerjanih živali in humano mleko (Preglednica 3). Ima tudi najvišjo povprečno vsebnost miristinske kisline (15,5 %) in konjugirane linolne kisline (1,08 %) (Jahreis in sod., 1999).

2.4 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA SIROV

Maščobnokislinska sestava sira je v največji meri odvisna od vstopne surovine, to je mleko. Od tod tudi precejšne razlike med siri. V preglednici 4 so predstavljena povprečja posameznih maščobnih kislin (ut. %) različnih grških sirov.

Preglednica 4: Maščobnokislinska sestava (ut. %) različnih grških sirov (Zlatanov in sod., 2002)

Maščobna kislina	siri			
	Feta	trdi (KZ)	trdi (DZ)	albuminski
	utežni %			
C4:0	5,1	5,6	5,4	5,8
C6:0	4,0	4,4	3,9	4,7
C8:0	3,5	3,5	3,3	3,7
C10:0	9,8	9,0	8,7	11,3
C12:0	4,5	4,8	4,3	5,7
C14:0	10,2	10,7	10,4	11,7
C14:1 n-5	0,2	0,4	0,2	0,2
C15:0	1,0	1,0	1,1	1,1
C16:0	21,4	22,3	21,4	21,2
C16:1	1,3	1,6	1,5	1,5
C18:0	9,8	8,8	9,5	8,0
tC18:1 n-7 vakcenska	3,0	2,8	3,1	2,8
cC18:1 n-9 (oleinska)	14,8	14,8	15,7	12,6
C19:0	0,3	0,2	0,3	0,3
ccC18:2 n-6 (linolna)	2,0	2,1	2,0	1,8
C18:3 n-3 (linolenska)	1,1	0,8	1,0	0,6
C20:0	0,2	0,2	0,2	0,2
c9, t11 C18:2 (CLA)	0,9	0,7	0,9	0,7
Σ nasičenih MK	70,2	71,0	68,9	74,1
Σ enkrat nenasičenih MK	21,0	21,1	22,1	18,5
Σ večkrat nenasičenih MK	4,7	4,3	4,8	3,8

KZ – kratko zorenje (do 70 dni); DZ – dolgo zorenje (najmanj 5 mesecev)

Feta siri – narejeni iz ovčjega in/ali kozjega mleka

Trdi siri (KZ): Kapnistó, Kasseri, Lekorino (vsi narejeni iz ovčjega mleka)

Trdi siri (DZ): Formaella, Graviera, Kefalotyri, Ladotyri (vsi narejeni iz ovčjega mleka)

Albuminski siri: Anthotiro, Mizithra, Manouri (vsi narejeni iz sirotke ovčjega mleka)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

V poskusu smo ugotavljali maščobnokislinsko sestavo kraškega ovčjega sira, izdelanega iz mleka slovenske avtohtone pasme istrska pramenka. V analizo smo vključili 19 sirov, ki so bili izdelani v Centru za sonaravno rekultiviranje (CSR) Vremščica. Siri so se razlikovali v času zorenja (svež sir takoj po soljenju, siri zoreni 2 meseca), sezoni izdelave, termični obdelavi mleka (siri, narejeni iz surovega mleka in siri, narejeni iz mleka, termiziranega pri 64 °C za 30 minut) in pa paši živali (preglednica 5).

Preglednica 5: Opis vzorcev in datumi izdelave sirov

Oznaka	Oznaka laboratorija	Datum izdelave	Čas zorenja	TO	Serija	Paša
K1	1	15.4.2004	2 meseca	surovo	9	dolinska
K2	2	16.4.2004	2 meseca	surovo	10	dolinska
K3	3	26.4.2004	2 meseca	termizirano	15	dolinska
K4	4	27.4.2004	2 meseca	termizirano	16	dolinska
K5	5	2.5.2004	2 meseca	termizirano	19	dolinska
K6	6	5.5.2004	2 meseca	termizirano	21	dolinska
K9	7	13.7.2004	svež sir*	surovo	66	višinska
K35	8	13.7.2004	2 meseca	surovo	66	višinska
K11	9	15.7.2004	svež sir*	termizirano	67	višinska
K36	10	15.7.2004	2 meseca	termizirano	67	višinska
K14	11	19.7.2004	svež sir*	termizirano	69	višinska
K37	12	19.7.2004	2 meseca	termizirano	69	višinska
K15	13	20.7.2004	svež sir*	surovo	70	višinska
K38	14	20.7.2004	2 meseca	surovo	70	višinska
K17	15	22.7.2004	svež sir*	termizirano	71	višinska
K39	16	22.7.2004	2 meseca	termizirano	71	višinska
K45	17	4.9.2004	2 meseca	termizirano	87	višinska
K46	18	26.8.2004	2 meseca	termizirano	84	višinska
K47	19	29.8.2004	2 meseca	termizirano	85	višinska

TO – termična obdelava; *svež sir – vzorec odvzet takoj po soljenju

3.2 METODE DELA

3.2.1 Priprava vzorcev sirov za analizo

Vzorčenje sirov za analizo je potekalo v skladu s standardno metodo, predpisano z evropskim standardom SIST EN ISO 707: 1999. Vzorce sira smo ob sprejemu v laboratorij razdelili na manjše kose, zamrznili ter shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zmrznjene vzorce smo zrezali na drobne koščke, jih prelili s tekočim dušikom in zdrobili v terilnici. Tako pripravljene in homogenizirane smo hranili v zmrzovalniku, na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (do $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.2.2 Ugotavljanje vsebnosti hlapnih maščobnih kislin

Za pripravo etrskih ekstraktov smo uporabili modificirano metodo etrske ekstrakcije hlapnih maščobnih kislin po Anaerobe laboratory manual, fourth edition (Holdeman in sod., 1977)

3.2.2.1 Priprava etrskih ekstraktov za ugotavljanje hlapnih maščobnih kislin s plinsko kromatografijo

V Hachove epruvete smo zatehtali 1 do 2 g homogeniziranega vzorca sira, ga prelili s 5 ml destilirane H_2O in dodali 0,2 ml H_2SO_4 (50 %). Vzorce smo nato centrifugirali 10 minut pri 3000 obratih/min. V že pripravljene epruvete, z 0,4 g sušenega NaCl, smo odpipetirali 1 ml raztopine vzorca, v epruvete za standarde pa 1 ml standarda. Vse raztopine smo pripravili v treh ponovitvah. V epruvete smo dodali še 0,2 ml H_2SO_4 in 1 ml etra. Epruvete smo nato ročno stresali (20 x), jih prenesli v centrifugo in zavrteli na 2000 obratov/min. Po centrifugiranju smo s Pasteurjevimi pipetami previdno posesali zgornjo etrsko fazo, v kateri so prisotne kisline in jo prenesli v nove čiste in označene epruvete. Za izboljšanje izkoristka ekstrakcije smo postopek ponovili in oba etrska ekstrakta združili. Na koncu smo dodali še 0,3 g CaCl_2 (sušilno sredstvo). Pri delu smo stalno pazili, da so bile epruvete dobro zaprte, da ni prišlo do izgub kislin.

3.2.2.2 Priprava standardnih raztopin

Delovne standardne raztopine smo naredili iz osnovne raztopine (stock solution), ki je vsebovala naslednje hlapne maščobne kisline (Preglednica 6):

Preglednica 6: Sestava osnovne standardne raztopine (stock solution) (g/l)

IME KISLINE	KONCENTRACIJA (g/l)
ocetna	2,25
propionska	0,99
izo-maslena	0,95
n-maslena	0,96
krotonska	10,0

Za delovne standarde 1, 2, 3 in 4 smo naredili redčitve 5, 10, 15 in 20 ml osnovne raztopine na 100 ml deionizirane vode. Tako smo dobili naslednje koncentracije kislin:

Preglednica 7: Sestava delovnih standardnih raztopin (g/l)

IME KISLINE	KONCENTRACIJA (g/l)			
	ST1	ST2	ST3	ST4
ocetna	0,2625	0,5250	0,7875	1,50
propionska	0,0495	0,0990	0,1485	0,1980
izo-maslena	0,0475	0,0950	0,1425	0,1900
n-maslena	0,0480	0,0960	0,1440	0,1920
krotonska	0,50	1,00	1,50	2,00

3.2.2.3 Analitska oprema in pogoji analize

Za ločbo hlapnih maščobnih kislin smo uporabili plinski kromatograf Hewlett Packard 5890 A, proizvajalca Hewlett Packard (ZDA). Za ločbo kislin smo uporabili kapilarno kolono HP-20M (Carbowax 20M) 20 m x 0,32 mm x 0,3 µm, proizvajalca Hewlett Packard (ZDA).

Kromatografski pogoji:

TEMPERATURA INJEKTORJA: 185 °C

TEMPERATURNI PROGRAM:

začetna temperatura kolone: 75 °C

zadrževalni čas: 3,5 min

dvig temperature: 14 °C/min

končna temperatura kolone: 160 °C

končni zadrževalni čas: 5 min

TEMPERATURA DETEKTORJA: 290 °C

PRETOK PLINOV

Argon (nosilni plin): 2 ml/min

Dušik (make-up plin): 30 ml/min

Vodik (gorilni plin): 30 ml/min

Sintetični zrak: 300 ml/min

VOLUMEN INJICIRANJA: 1 µl; split 10:1;

ČAS ANALIZE: 15 min

3.2.3 Ugotavljanje vsebnosti maščobnih kislin v sirih s plinsko kromatografijo

3.2.3.1 Priprava metilnih estrov z metodo ISTE za določanje maščobnih kislin s plinsko kromatografijo

Metilne estre smo pripravili z metodo ISTE po Park in Goins (1994). V Hachove epruvete smo zatehtali 0,3 – 0,4 g vzorca in dodali 300 µl diklormetana, 3 ml 0,5M NaOH v metanolu, premešali in prepihali z N₂. Vse epruvete (A in B paralelki) smo nato segrevali 10 minut v termičnem bloku pri 90 °C. Sledilo je hlajenje v ledeni kopeli, nato smo dodali 3 ml 12 % BF₃ v metanolu, zopet premešali in prepihali z N₂. Ponovno smo epruvete segrevali 10 minut v termičnem bloku pri 90 °C in nato hitro ohladili v ledeni kopeli. V epruvete smo dodali še 3 ml deionizirane vode in 1,5 ml heksana. Sledilo je stresanje epruvet 1 minuto, pri čemer se metilni estri izločijo v heksan. Končno vzorce še 10 minut centrifugiramo na 2000 obratih/min. Po centrifugiranju prenesemo zgornjo heksansko fazo

v posodice za shranjevanje vzorcev in še zadnjič preprihamo z N₂. Tako pripravljene vzorce shranimo v zmrzovalniku pri -20 °C (do -30 °C).

3.2.3.2 Analitska oprema in pogoji analize

Za ločbo maščobnih kislin smo uporabili plinski kromatograf Agilent 6890 series, opremljen z avtomatskim vzorčevalnikom Agilent 7683 series in FID detektorjem. Za ločbo metilnih estrov maščobnih kislin smo uporabili polarno kapilarno kolono Varian CP 4720, dolžine 100 m in notranjega premera 250 µm. Debelina filma stacionarne faze je bila 0,25 µm.

Kromatografski pogoji:

TEMPERATURA INJEKTORJA: 250 °C

TEMPERATURNI PROGRAM:

začetna temperatura kolone: 100 °C

zadrževalni čas: 10 min

dvig temperature: 1 °C/min

končna temperatura kolone: 230 °C

končni zadrževalni čas: 30 min

TEMPERATURA DETEKTORJA: 250 °C

PRETOK PLINOV

Helij (nosilni plin): 1,2 ml/min

Dušik (make-up plin): 45 ml/min

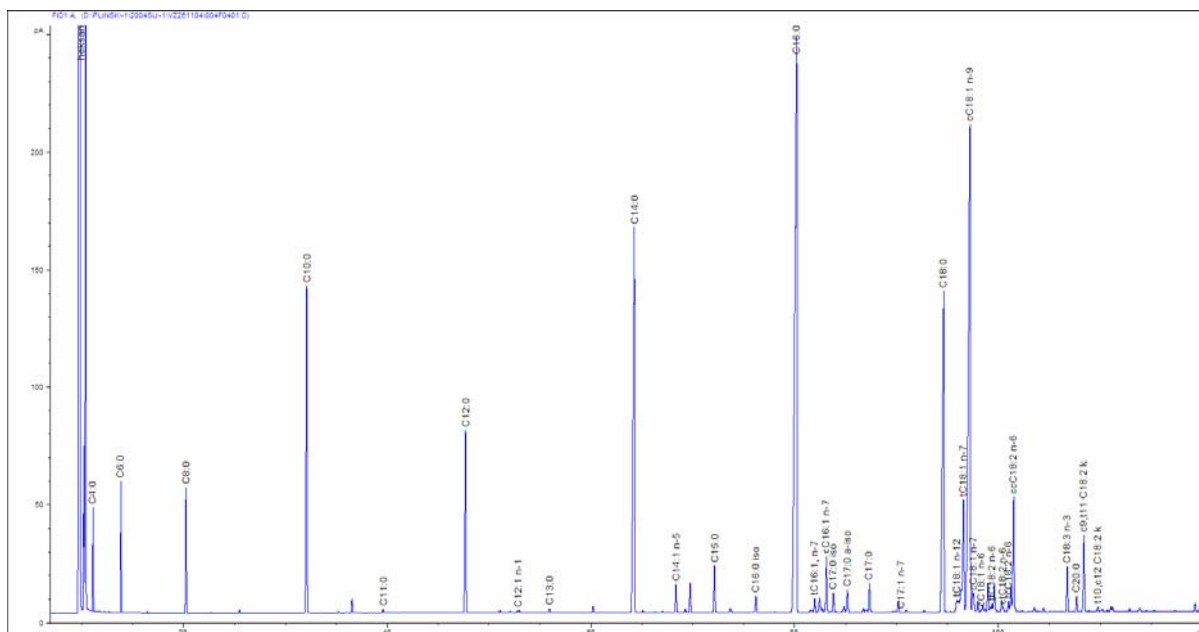
Vodik (gorilni plin): 40 ml/min

Sintetični zrak: 450 ml/min

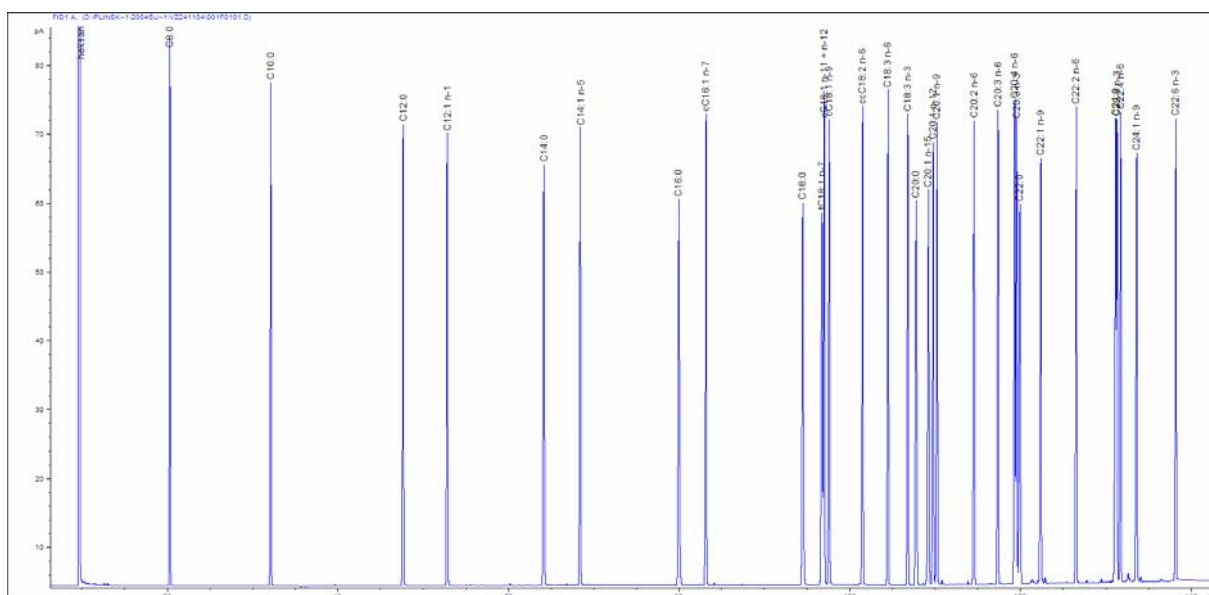
VOLUMEN INJICIRANJA: 1 µl; split 20:1;

ČAS ANALIZE: 238 min

Rezultat ločbe maščobnih kislin plinskega kromatografa je kromatogram. Slika 4 prikazuje kromatogram vzorca K35. Drugi kromatogram (Slika 5) prikazuje standard NuChek, GLC # 411, ki smo ga uporabili za identifikacijo in kvantitativno določitev metilnih estrov maščobnih kislin v vzorcih sirov.



Slika 4: Kromatogram vzorca K35



Slika 5: Kromatogram standarda (NuChek, GLC # 411)

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke, ki smo jih dobili v poskusu, smo uredili s programom Microsoft Excel. Tako pripravljene smo statistično obdelali s programskim paketom SAS/STAT. Za analizo smo uporabili proceduro MEANS (za izračun osnovnih statističnih parametrov) in proceduro GLM – general linear models (za ovrednotenje posameznih vplivov oz. testiranje modela).

Zaradi neugodne strukture vhodnih podatkov ni bilo mogoče ločiti vpliva paše in vpliva obdobja laktacije (sezona). Zato smo se pri razvijanju modela odločili za dva ločena modela. Prvi je vključeval vpliv paše, vpliv termične obdelave mleka in vpliv zorenja sira. Vsi vplivi so sistematski z nivoji. V drugi model pa smo vključili vpliv sezone, vpliv termične obdelave mleka in vpliv zorenja sira. Vpliv sezone smo obravnavali kot linearno regresijo, ostala pa kot sistematska vpliva z nivoji. Oba modela smo testirali s proceduro GLM. Bistvenih razlik med modeloma ni bilo, kar dokazuje močno prepletenost vpliva paše in vpliva sezone. Termična obdelava mleka ni imela statistično značilnega vpliva v nobenem modelu, zato smo ta vpliv zavrgli. Na koncu smo se odločili, da uporabimo drugi model tudi zato, ker je grafična ponazoritev rezultatov nazornejša. Uporabljeni model je prikazan v enačbi 1.

$$y_{ij} = \mu + Z_i + b(x_{ij} - \bar{x}) + e_{ij} \quad \dots (1)$$

y_{ij} opazovana lastnost
 μ srednja vrednost
 Z čas zorenja; $i = 1, 2$
 x dan laktacije
 e ostanek

Za preučitev vpliva paše na različnih nadmorskih višinah na maščobnokislinski profil vzorcev sira, smo uporabili tudi metodo glavnih osi (principal component analysis – PCA). Ta multivariacijska metoda je uporabna za preliminarno analizo in splošen pogled na določen problem. Rezultati PCA analize so predstavljeni kot dvodimenzionalni graf, ki prikazuje odnos med spremenljivkami, vplivi ali odnos med spremenljivkami in vplivi (Sevi in sod., 2001).

4 REZULTATI

4.1 UGOTAVLJANJE Hlapnih Maščobnih Kislin

Vsebnost hlapnih maščobnih kislin smo ugotavljali z modificirano metodo etrske ekstrakcije hlapnih maščobnih kislin (Holdeman in sod., 1977). Rezultati so podani v preglednici 8.

Preglednica 8: Vsebnosti hlapnih maščobnih kislin v posameznih vzorcih sirov (g/kg sira)

Oznaka vzorca	Kislina (g/kg sira)				
	ocetna	propionska	izo-maslena	n-maslena	krotonska
K1	0,87	<0,03	<0,02	0,09	0,32
K2	0,99	<0,03	0,02	0,06	0,39
K3	0,75	<0,03	<0,02	0,04	0,55
K4	1,19	<0,03	<0,02	0,06	0,87
K5	0,78	<0,03	<0,02	0,05	0,85
K6	0,12	<0,03	0,04	0,05	0,05
K9	0,06	<0,03	<0,02	<0,02	<0,05
K35	1,42	<0,03	<0,02	0,06	0,09
K11	1,44	0,03	<0,02	0,04	1,28
K36	1,06	<0,03	<0,02	0,06	0,80
K14	0,30	<0,03	<0,02	<0,02	<0,05
K37	1,35	<0,03	0,02	0,06	0,81
K15	1,22	<0,03	<0,02	0,03	0,17
K38	0,79	<0,03	<0,02	0,10	<0,05
K17	0,06	<0,03	<0,02	<0,02	0,22
K39	0,92	<0,03	<0,02	0,03	0,61
K45	0,15	<0,03	<0,02	0,03	0,33
K46	0,29	<0,03	<0,02	0,03	0,43
K47	0,39	<0,03	<0,02	0,02	0,45

Analizirali smo 19 vzorcev in prav vsi so vsebovali največ očetne kisline (Preglednica 8), katere razpon je segal od 0,06 do 1,44 g/kg sira. Sledi ji krotonska kislina, ki se je gibala v koncentracijah od 0,05 do 1,28 g/kg. Trije vzorci (K9, K14 in K38) so imeli koncentracijo krotonske kisline pod mejo detekcije ($< 0,05$ g/kg sira). Vsebnosti ostalih kislin so bile izjemno nizke. Propionsko kislino smo določili le v vzorcu K11, in sicer 0,03 g/kg sira. Izo-masleno kislino pa smo določili v vzorcu K6, ki je vseboval 0,04 g izo-maslene kisline/kg sira in vzorcu K37, ki je vseboval 0,02 g izo-maslene kisline/kg sira. Koncentracije n-maslene kisline so se gibale v razponu od 0,02 do 0,1 g/kg sira. Pri vzorcih K9, K14 in K17 so bile koncentracije n-maslene kisline pod mejo detekcije ($< 0,02$ g/kg sira).

4.2 UGOTAVLJANJE SKUPNIH MAŠČOBNIH KISLIN

V poskusu smo uspeli določiti in kvantificirati 61 maščobnih kislin, od katerih je bilo 22 nasičenih, 20 enkrat nenasičenih in 19 večkrat nenasičenih. V zelo majhnih koncentracijah ($< 0,1$ ut. %) se je nahajalo 27 maščobnih kislin, ki so skupaj predstavljale le 1,11 % od vseh maščobnih kislin (Preglednica 9).

Prevladujoči maščobni kislini v kraškem ovčjem siru sta palmitinska, s povprečno 24 % in oleinska, s povprečno 20,3 % od vseh maščobnih kislin. Sledijo jima stearinska, s povprečno 11 %, miristinska, s povprečno 10,8 % in kaprinska, s povprečno 6,7 % od vseh maščobnih kislin. Kot vidimo predstavljajo naštetje maščobne kisline kar 72,9 % od vseh maščobnih kislin. Vsebnosti vseh štirih maščobnih kislin v vzorcih močno variirajo. Tako je razpon palmitinske od 20,56 – 28,18 g/100g MK, oleinske od 17,02 – 27,84 g/100g MK, stearinske od 8,07 – 15,88 g/100g MK, miristinske od 7,57 – 13,01 g/100g MK in razpon kaprinske od 4,30 – 8,48 g/100g MK (Preglednica 9).

Preglednica 9: Osnovni statistični parametri posameznih maščobnih kislin (ut. %) določenih v kraškem ovčjem siru, N = 19

Maščobna kislina	Povprečje (ut.%)	STD	RSD (%)	MIN	MAX
C4:0	2,11	0,18	8,5	1,68	2,37
C6:0	2,06	0,24	11,7	1,62	2,42
C8:0	2,23	0,34	15,0	1,6	2,70
C10:0	6,70	1,35	20,1	4,30	8,48
C12:0	3,91	0,80	20,6	2,63	4,90
C14:0	10,80	2,10	19,5	7,57	13,01
C14:1 n-5	0,58	0,14	23,8	0,39	0,88
C15:0 a-iso	0,17	0,26	151,5	<0,01	0,59
C15:0	0,91	0,06	6,5	0,80	1,05
C16:0 iso	0,29	0,02	7,6	0,25	0,32
C16:0	24,05	2,53	10,5	20,56	28,18
tC16:1, n-7	0,23	0,04	15,5	0,16	0,28
cC16:1 n-7	1,08	0,29	26,4	0,68	1,72
C17:0 iso	0,42	0,04	8,5	0,37	0,49
C17:0 a-iso	0,47	0,03	6,9	0,40	0,52
C17:0	0,60	0,04	6,7	0,54	0,67
C18:0	11,08	2,93	26,4	8,07	15,88
tC18:1 n-12 petroselaidinska	0,33	0,06	19,6	0,20	0,45
tC18:1 n-9 elaidinska	0,26	0,03	11,5	0,21	0,33
tC18:1 n-8	0,48	0,12	24,5	0,30	0,75
tC18:1 n-7 vakcenska	2,45	0,52	21,1	1,61	3,21
cC18:1 n-9 (oleinska)	20,30	3,78	18,6	17,02	27,84
cC18:1 n-7 c-vakcenska	0,67	0,07	10,6	0,51	0,81
cC18:1 n-6	0,19	0,02	11,4	0,15	0,23
ttC18:2 n-6 (linoelaidinska)	0,15	0,04	26,8	0,03	0,19
tcC18:2 n-6	0,21	0,02	9,1	0,19	0,25
C19:0	0,47	0,12	25,2	0,24	0,64
ccC18:2 n-6 (linolna)	2,64	0,78	29,8	1,79	4,19
C18:3 n-3 (linolenska)	0,85	0,12	14,2	0,59	1,01
C20:0	0,32	0,05	14,3	0,25	0,43
c9,t11 C18:2 (CLA)	1,33	0,18	13,8	1,01	1,64
C20:4 n-6	0,21	0,01	6,8	0,20	0,24
C22:0	0,16	0,02	15,6	0,12	0,19
C22:5 n-3	0,16	0,02	15,4	0,11	0,20
Σ ostalih maščobnih kislin	1,11				

STD – standardni odklon; RSD (%) – koeficient variabilnosti (%); N – število vzorčenj

Ostale maščobne kisline: C11: 0; C12: 1 n-1; C13: 0; C17: 1 n-7; ct C18: 2 n-6; C19: 1 n-9; C18: 3 n-6; C19: 2 n-6; C20: 1 n-15; t10, c12 C18: 2 (CLA); C20: 1 n-12; C18: 4 n-3; C20: 1 n-9; C21: 0; C20: 2 n-6; C21: 1 n-9; C20: 3 n-6; C20: 3 n-3; C22: 1 n-9; C20: 5 n-3; C23: 0; C22: 2 n-6; C23: 1 n-9; C24: 0; C22: 4 n-6; C24: 1 n-9; C22: 6 n-3

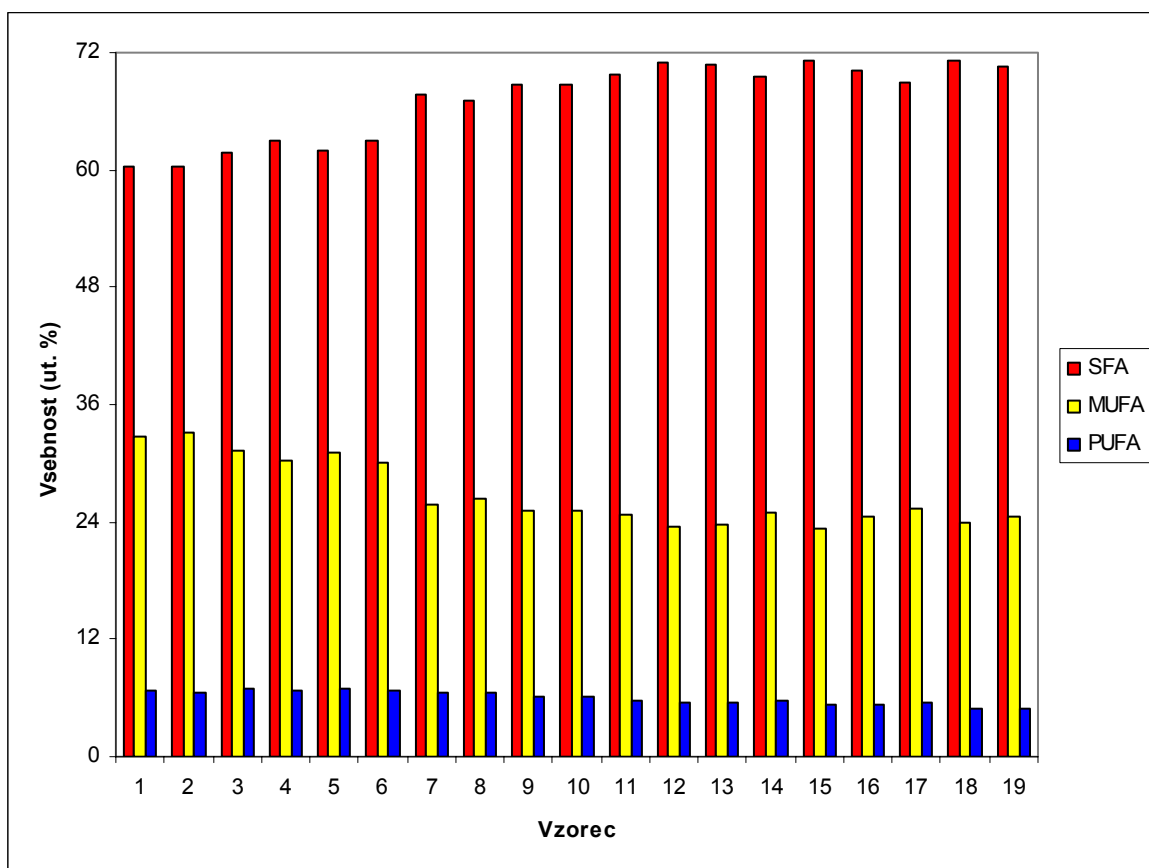
Rezultati, predstavljeni v preglednici 10, nam prikazujejo vsote in razmerja posameznih maščobnih kislin vseh 19 vzorcev. Izračunali smo vsoto kratkoverižnih, srednjeverižnih in dolgoverižnih maščobnih kislin. Vzorci so vsebovali v povprečju 13,11 % kratkoverižnih maščobnih kislin (C4 – C10), 43,69 % srednjeverižnih (C11 – C17) in 43,21 % dolgoverižnih maščobnih kislin (C18 in več). V drugem sklopu vsot smo sešteli nasičene in nenasičene maščobne kisline, slednje pa smo razdelili na enkrat- in večkrat nenasičene. Povprečna vsebnost nasičenih maščobnih kislin (SFA) je znašala 67,12 %, enkrat nenasičenih (MUFA) 26,83 % in večkrat nenasičenih (PUFA) 6,04 % (Preglednica 10). Vsebnosti SFA, MUFA in PUFA po posameznih vzorcih prikazuje slika 6, kjer je lepo vidna razlika vsebnosti SFA in MUFA prvih šestih vzorcev, napram ostalim vzorcem. To so vzorci sira izdelani iz mleka dolinske paše. V vsoti n-3 PUFA (1,17 %) predstavlja največji delež linolenska kislina z 0,85 % ostale n-3 PUFA pa prispevajo 0,32 %. Glavni delež n-6 PUFA, ki obsegajo 3,52 ut. % vseh maščobnih kislin, predstavlja linolna kislina z 2,64 ut. %. Vsota C18:1 trans maščobnih kislin (3,53 %) predstavlja seštevek vseh trans izomer C18:1 maščobnih kislin. Največji delež (63 %) predstavlja vakcenska kislina. K vsoti cis izomer C18:1 (21,16 %) pa največ doprinese oleinska kislina, ki predstavlja kar 96 % vseh cis izomer C18:1.

V preglednici 10 so predstavljena tudi razmerja med posameznimi maščobnimi kislinami in razmerje n-6 in n-3 maščobnih kislin. Le to je v povprečju znašalo 3,21 v korist n-6 maščobnih kislin. Zelo podobno je tudi razmerje linolna/linolenska maščobna kislina, saj vemo, da obe maščobni kislini predstavljata večinski del n-6 oz. n-3 maščobnih kislin. Razmerje tako znaša 3,26 v korist linolne kisline. Razmerji C14:1/C14:0 in C16:1/C16:0, ki kažeta dejavnost encima Δ^9 desaturaze, sta 0,05 oz. 0,04.

Preglednica 10: Osnovni statistični parametri za nekatere vsote (ut. %) in razmerja maščobnih kislin, N = 19

Vsote in razmerja	povprečje	STD	RSD (%)	MIN	MAX
kratkoverižne MK (C4 - C10)	13,11 ut. %	1,92	14,66	9,66	15,87
srednjeverižne MK (C11 - C17)	43,69 ut. %	5,75	13,17	35,04	51,22
dolgoverižne MK (C18 in več)	43,21 ut. %	7,17	16,59	35,95	55,3
nasičene MK (SFA)	67,12 ut. %	3,97	5,91	60,31	71,25
nenasičene MK (UFA)	32,88 ut. %	3,97	12,07	28,75	39,69
enkrat nenasičene MK (MUFA)	26,83 ut. %	3,38	12,6	23,38	33,08
večkrat nenasičene MK (PUFA)	6,04 ut. %	0,69	11,5	4,87	6,93
n-3 PUFA	1,17 ut. %	0,18	15,2	0,78	1,35
n-6 PUFA	3,52 ut. %	0,8	22,6	2,61	5,11
LC PUFA*	0,59 ut. %	0,05	8,3	0,49	0,68
LC n-3 PUFA	0,29 ut. %	0,06	19,6	0,19	0,37
LC n-6 PUFA	0,30 ut. %	0,02	6,5	0,26	0,34
vsota trans C18:1	3,53 ut. %	0,58	16,4	2,52	4,31
vsota cis C18:1	21,16 ut. %	3,78	17,8	17,77	28,69
razmerje n-6:n-3	3,21	1,35	42,2	2,08	6,54
razmerje linolna/ linolenska	3,26	1,53	46,9	2,01	7,08
razmerje C14:1/C14:0	0,05	0,01	11,1	0,05	0,07
razmerje C16:1/C16:0	0,04	0,01	16,4	0,03	0,06
razmerje C18:1/C18:0	1,87	0,18	9,7	1,51	2,28

*LC – long chain (dolgoverižna); N – število vzorčenj



Slika 6: Vsebnosti nasičenih (SFA), enkrat- (MUFA) in večkrat nenasičenih (PUFA) maščobnih kislin (ut. %) v posameznih vzorcih

4.2.1 Statistične značilnosti vplivov sezone in časa zorenja

Statistične značilnosti smo ugotavljali za vpliv sezone (linearna regresija) in vpliv časa zorenja. V preglednici 11 so predstavljene p- vrednosti za oba vpliva, povprečja s standardno napako, izračunana po metodi najmanjših kvadratov, za svež in dva meseca zoren sir in razlike s standardno napako med povprečji. Maščobne kisline smo zaradi boljše preglednosti združili v večje skupine (vsote in razmerja), nekatere pomembnejše pa smo obdelali posamezno.

Preglednica 11: Statistične značilnosti vplivov sezone in časa zorenja sira na maščobnokislinsko sestavo sirov

Vsote in razmerja	SEZONA	SVEŽ		ZOREN 2 mes.	
	p- vrednost	LSM ± SEE	LSM ± SEE	razlika ± SEE	p- vrednost
kratkoverižne MK (C4 - C10)	0,0058	14,65 ± 0,57	12,55 ± 0,33	-2,09 ± 0,67	0,0066
srednjeverižne MK (C11 - C17)	<0,0001	43,90 ± 0,36	43,61 ± 0,42	-0,29 ± 0,42	0,4966
dolgoverižne MK (C18 in več)	<0,0001	41,44 ± 0,77	43,83 ± 0,45	2,39 ± 0,90	0,0176
nasičene MK (SFA)	<0,0001	68,10 ± 0,58	66,77 ± 0,34	-1,33 ± 0,69	0,0714
enkrat nenasičene MK (MUFA)	<0,0001	25,74 ± 0,53	27,21 ± 0,31	1,47 ± 0,62	0,0316
večkrat nenasičene MK (PUFA)	<0,0001	6,14 ± 0,16	6,00 ± 0,09	-0,14 ± 0,19	0,4795
n-3 PUFA	0,0004	1,23 ± 0,05	1,14 ± 0,03	-0,09 ± 0,06	0,1415
n-6 PUFA	<0,0001	3,44 ± 0,10	3,55 ± 0,06	0,11 ± 0,12	0,4124
LC PUFA (long chain)	0,0004	0,60 ± 0,01	0,59 ± 0,01	-0,01 ± 0,01	0,4463
LC n-3 PUFA	<0,0001	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	-0,01 ± 0,01	0,4907
LC n-6 PUFA	<0,0001	0,31 ± 0,01	0,30 ± 0,01	-0,01 ± 0,01	0,4388
razmerje n-6:n-3	<0,0001	2,92 ± 0,28	3,30 ± 0,16	0,38 ± 0,32	0,2591
vsota trans C18:1	0,4427	3,81 ± 0,26	3,42 ± 0,15	-0,38 ± 0,31	0,2391
vsota cis C18:1	<0,0001	19,87 ± 0,63	21,61 ± 0,37	1,74 ± 0,74	0,032
razmerje linolna/ linolenska	<0,0001	2,92 ± 0,31	3,38 ± 0,18	0,46 ± 0,37	0,2309
razmerje C14:1/C14:0	0,1402	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,0547
razmerje C16:1/C16:0	<0,0001	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,5591
Maščobne kisline					
C10:0	0,0002	7,58 ± 0,34	6,38 ± 0,02	-1,19 ± 0,41	0,0098
C12:0	<0,0001	4,31 ± 0,16	3,76 ± 0,09	-0,55 ± 0,19	0,0101
C14:0	<0,0001	11,28 ± 0,22	10,62 ± 0,13	-0,66 ± 0,25	0,0214
C16:0	<0,0001	23,57 ± 0,22	24,22 ± 0,13	0,65 ± 0,25	0,0214
C18:0	<0,0001	10,27 ± 0,32	11,37 ± 0,19	1,10 ± 0,37	0,0102
C18:1 n-9 (oleinska kislina)	<0,0001	18,99 ± 0,65	20,67 ± 0,38	1,77 ± 0,76	0,0336
linolna kislina	<0,0001	2,54 ± 0,09	2,67 ± 0,05	0,13 ± 0,11	0,2653
linolenska kislina	0,0101	0,91 ± 0,04	0,84 ± 0,02	-0,07 ± 0,05	0,1284
c9, t11 CLA	0,5499	1,41 ± 0,08	1,30 ± 0,05	-0,11 ± 0,10	0,2663
t10, c12 CLA	0,2276	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,01	-0,03 ± 0,02	0,1833

P < 0,0001 zelo statistično značilno

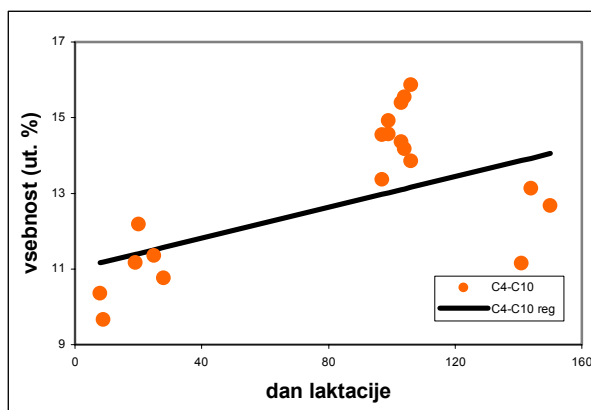
P < 0,05 statistično značilno

P > 0,05 statistično neznačilno

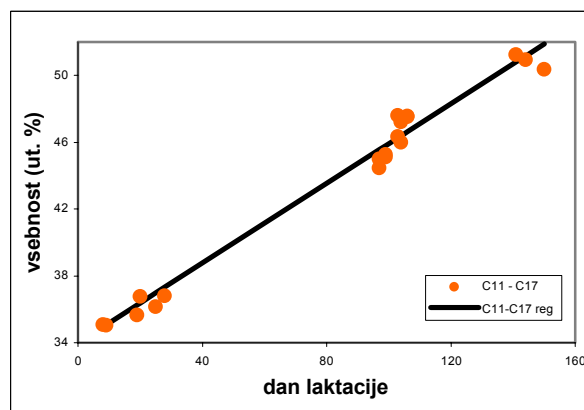
Vpliv sezone je bil statistično značilen za vsebnosti in razmerja skoraj vseh odvisnih spremenljivk. Statistična neznačilnost se je pokazala le pri vsoti trans izomer C18:1 in pri obeh konjugiranih linolnih kislinah. Statistično neznačilen vpliv je imela sezona tudi na razmerje C14:1/C14:0 (Preglednica 11).

Čas zorenja sira (svež oz. dva meseca zoren) se je pokazal kot statistično značilen vpliv pri vsebnosti kratkoverižnih in dolgoverižnih maščobnih kislin, vsoti enkrat nenasičenih maščobnih kislin in vsoti cis izomer C18:1. Čas zorenja sira je imel vpliv tudi na maščobne kisline, ki smo jih obravnavali posebej. To so bile vse nasičene maščobne kisline: kaprinska, lavrinska, miristinska, palmitinska, stearinska in oleinska kislina (Preglednica 11). Poudariti pa je potrebno, da so predstavljali sveži siri v celotnem številu analiziranih sirov le 26 %, poleg tega so bili vsi izdelani iz mleka živali na višinski paši, kar je vsekakor vplivalo na rezultate statistične obdelave.

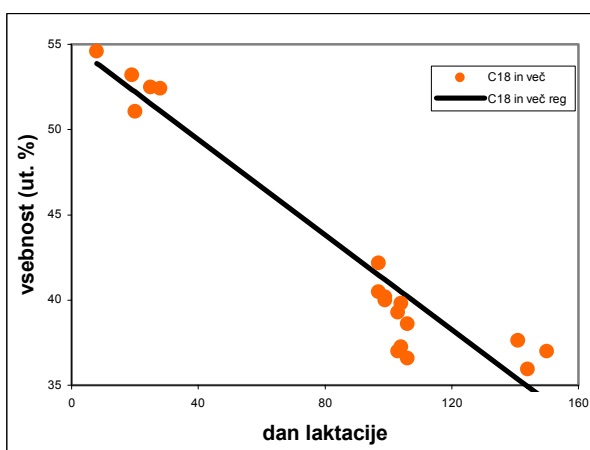
Vpliv sezone smo za boljšo predstavbo prikazali v grafični obliki. Slike od 7 do 18 prikazujejo grafe skupin in nekaj posameznih maščobnih kislin. Na grafih je jasno vidno, da je med vzorčenjem prve skupine sirov, ki so bili siri dolinske paše in druge skupine sirov (višinska paša), preteklo več kot dva meseca, med drugim in tretjim vzorčenjem pa več kot mesec dni. To za naš poskus sicer ni ugodno, a je trend vendarle nakazan z regresijsko premico.



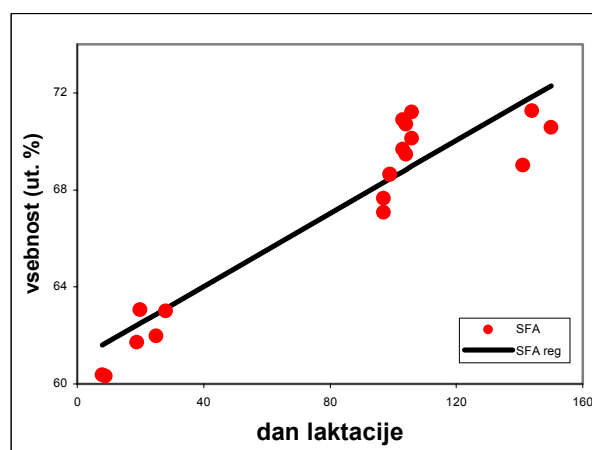
Slika 7: Vsebnost kratkoverižnih MK (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije



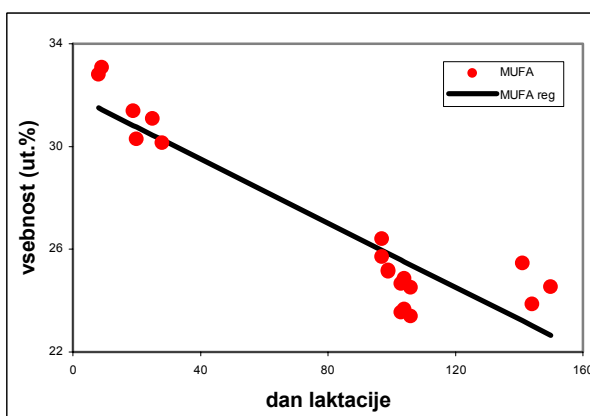
Slika 8: Vsebnost srednjeverižnih MK (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije



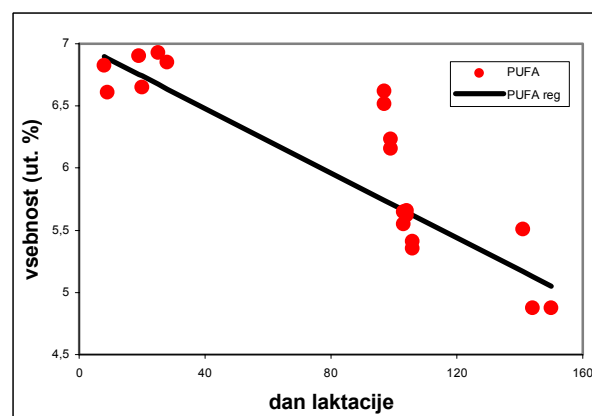
Slika 9: Vsebnost dolgoverižnih MK (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije



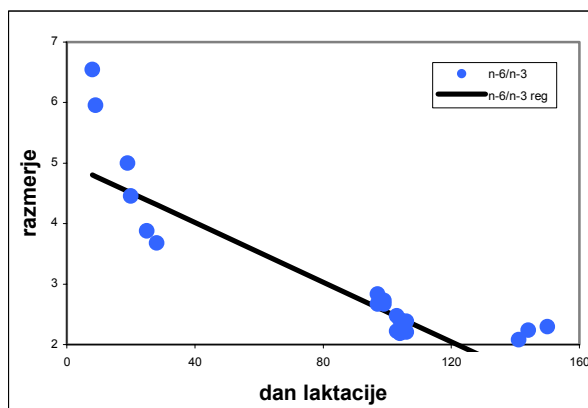
Slika 10: Vsebnost nasičenih MK (SFA) (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije



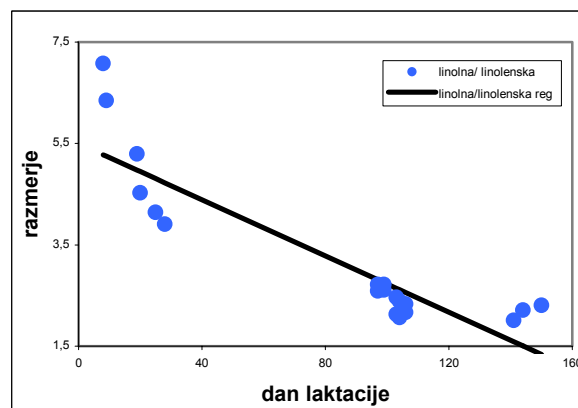
Slika 11: Vsebnost enkrat nenasičenih MK (MUFA) (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije



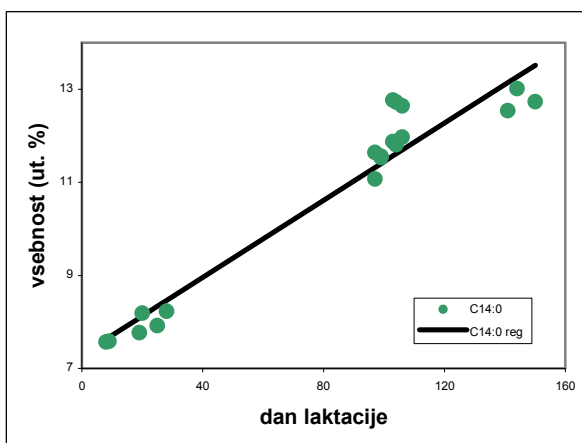
Slika 12: Vsebnost večkrat nenasičenih MK (PUFA) (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije



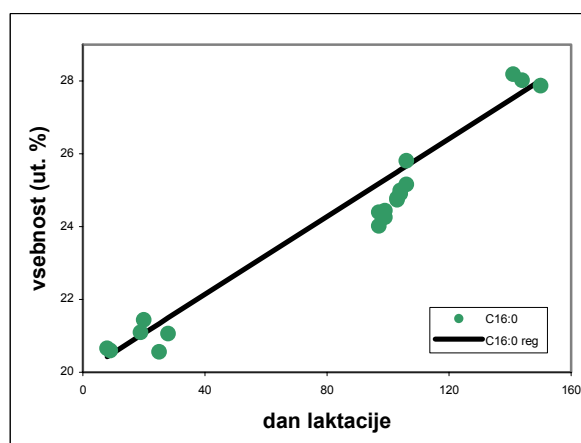
Slika 13: Razmerje n-6 in n-3 MK v odvisnosti od dneva laktacije



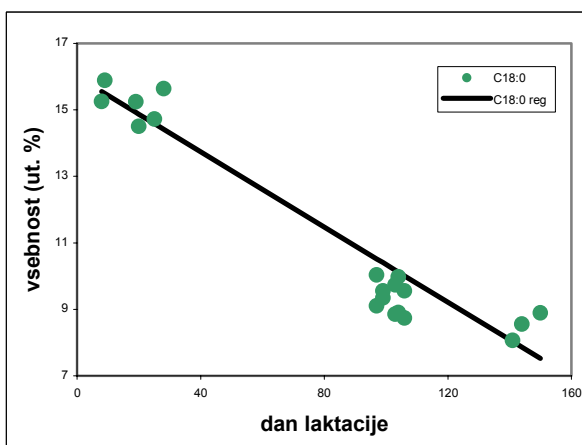
Slika 14: Razmerje linolne in linolenske kisline v odvisnosti od dneva laktacije



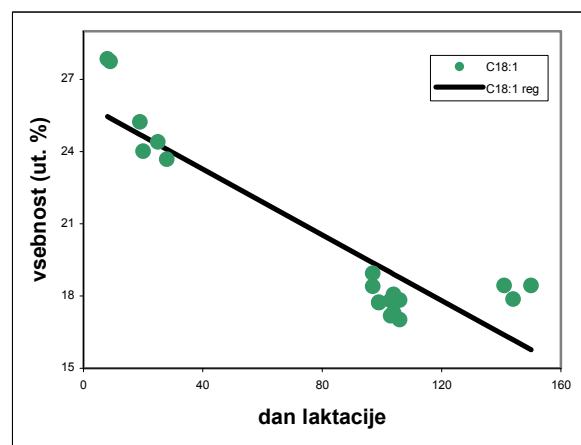
Slika 15: Vsebnost miristinske kisline (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije



Slika 16: Vsebnost palmitinske kisline (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije



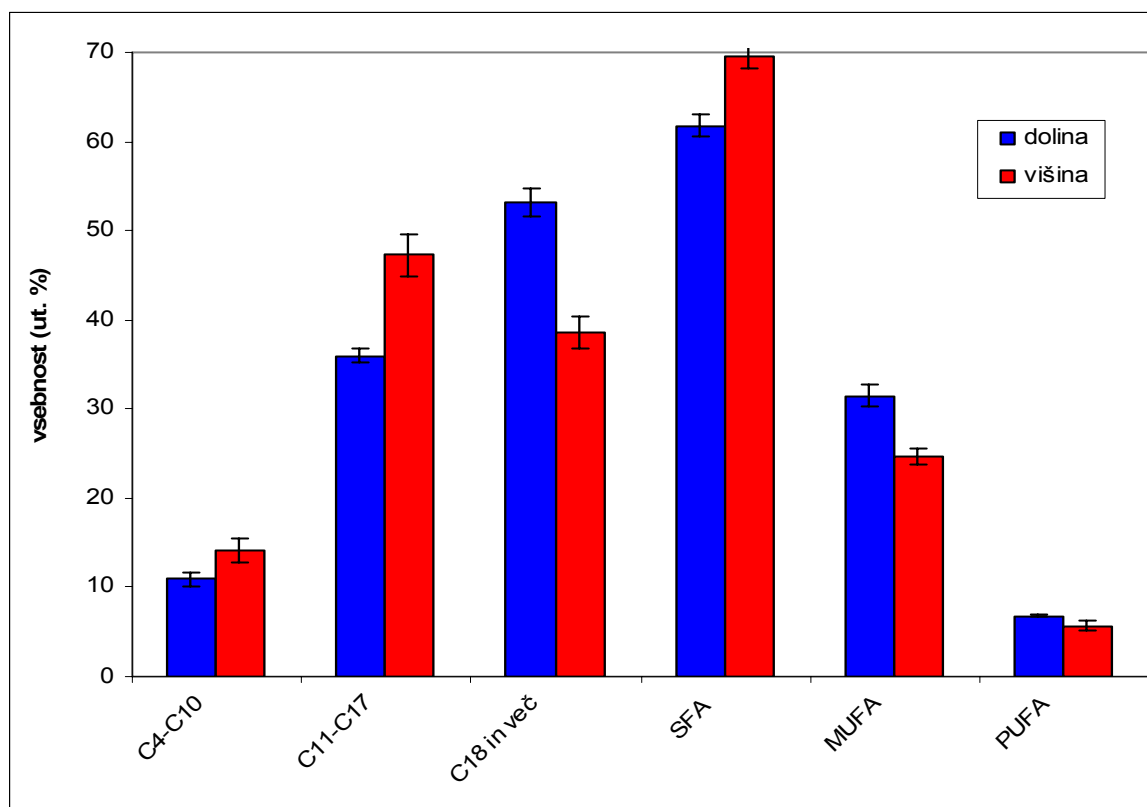
Slika 17: Vsebnost stearinske kisline (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije



Slika 18: Vsebnost oleinske kisline (ut. %) v odvisnosti od dneva laktacije

4.2.2 Vpliv paše na maščobnokislinsko sestavo sirov

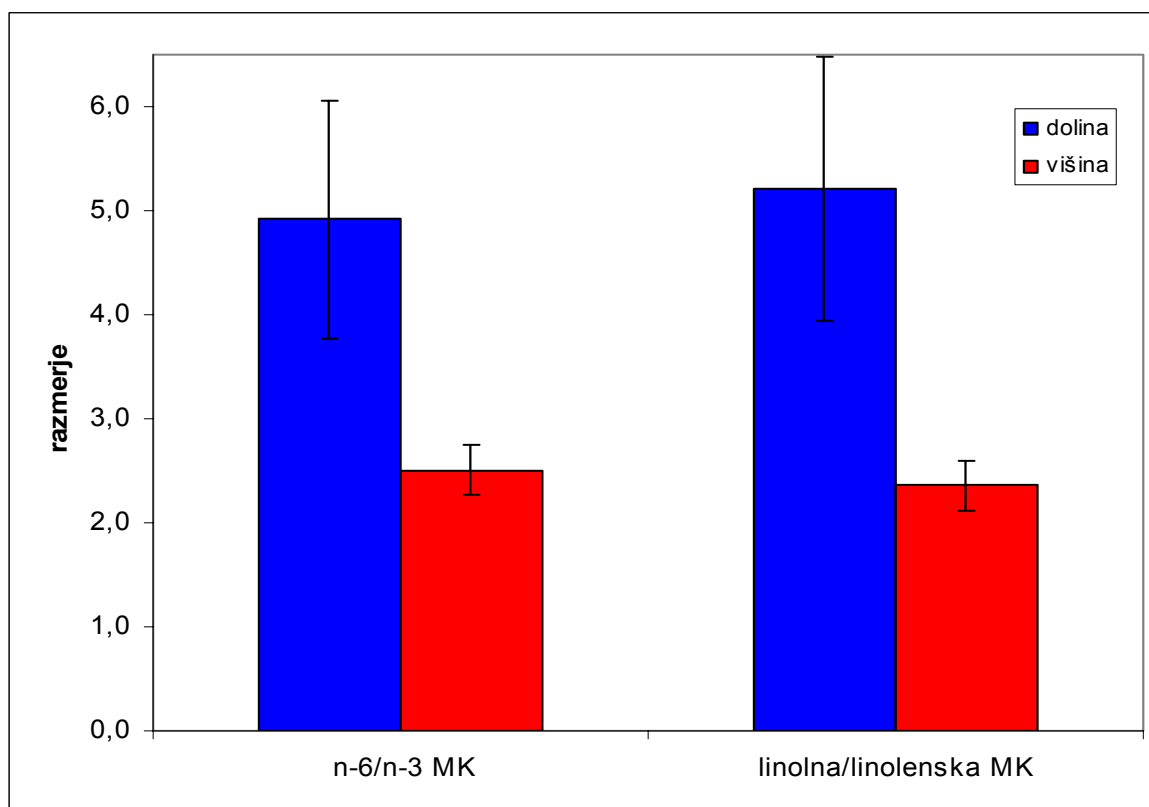
Eden od naših ciljev v nalogi je bil preučiti vpliv paše na dveh različnih nadmorskih višinah. Rezultati, ki smo jih dobili z enostavnim izračunom povprečij različnih skupin maščobnih kislin, so predstavljeni grafično na sliki 19. Modri stolpci označujejo povprečne vsebnosti maščobnih kislin dolinskih vzorcev, rdeči stolpci pa povprečne vsebnosti maščobnih kislin vzorcev z višinske paše. Povprečnim vsebnostim smo dorisali še standardne odklone.



Slika 19: Povprečne vsebnosti (ut. %) skupin maščobnih kislin dolinske in višinske paše

Kratkoverižnih in srednjeverižnih maščobnih kislin je bilo statistično značilno več v vzorcih višinske paše (14,12 % oz. 47,27 % proti 10,91 % oz. 35,92 %), dolgoverižnih maščobnih kislin pa več v dolinskih vzorcih (53,17 % proti 38,61 %; $P < 0,05$). Razlike so bile statistično značilne tudi pri povprečnih vsebnostih nasičenih (61,74 % proti 69,61 %), enkrat nenasičenih (31,46 % proti 24,69 %) in večkrat nenasičenih maščobnih kislinah (6,79 % proti 5,69 %) (Slika 19).

Vpliv paše se je pokazal za statistično značilnega tudi pri razmerju n-6/n-3 maščobnih kislin in razmerju linolna/linolenska maščobna kislina (Slika 20). Vidimo, da sta razmerji maščobnih kislin v vzorcih dolinske paše dvakrat višji od razmerij vzorcev višinske paše. Razmerji vzorcev posameznih paš sta zelo podobni, kar potrjuje naša opažanja, da predstavljata linolna in linolenska kislina večinski delež n-6 oziroma n-3 skupin maščobnih kislin.

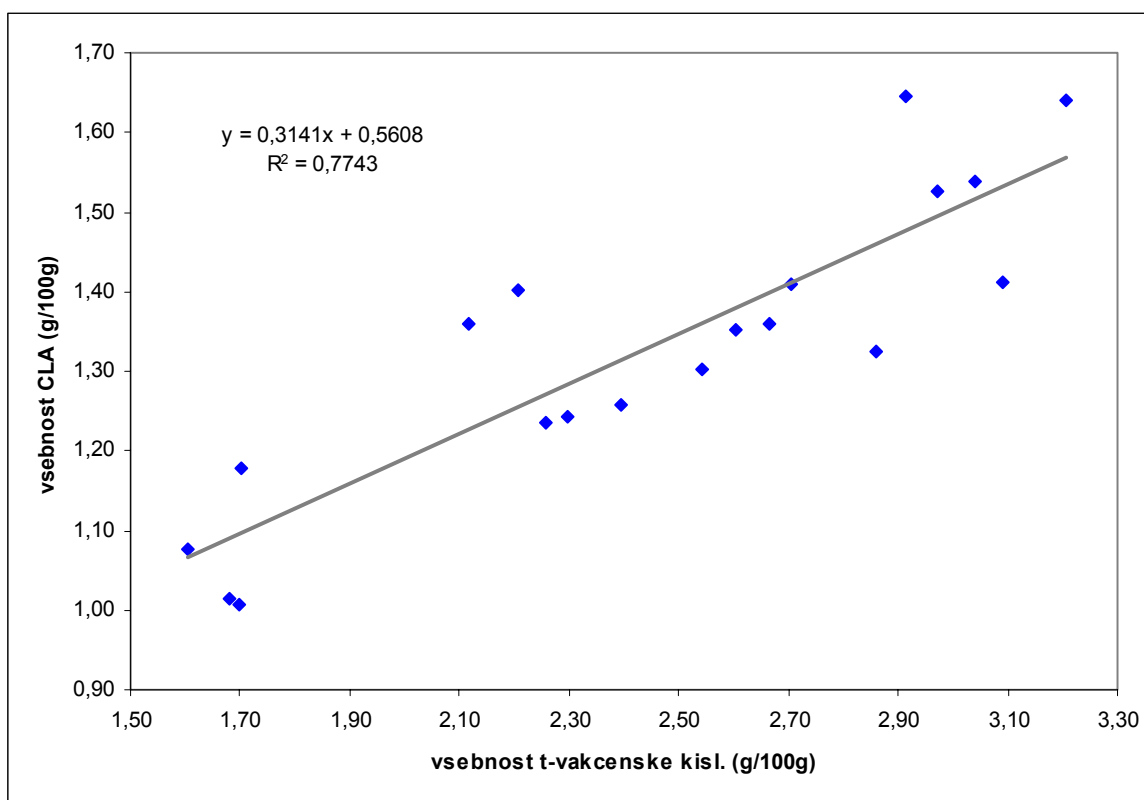


Slika 20: Vpliv paše na razmerji n-6/n-3 in linolna/linolenska MK

4.2.3 Konjugirana linolna kislina (CLA)

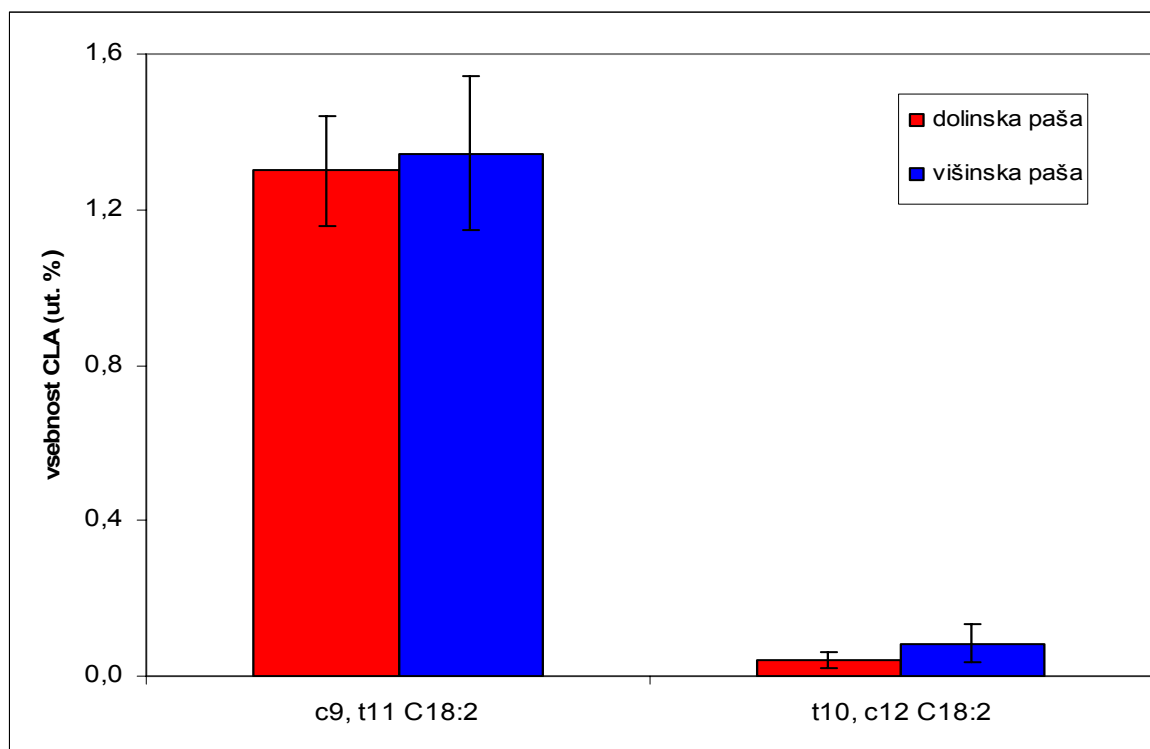
V vzorcih kraškega ovčjega sira smo določili dve izomeri konjugirane linolne kisline. Vsebnost v mlečnih izdelkih najbolj zastopane izomere cis-9, trans-11 C18:2 je v naših vzorcih variirala od 1,01 do 1,64 g/100g vseh maščobnih kislin (Preglednica 9). Vsebnost izomere trans-10, cis-12 C18:2 pa je znašala povprečno 0,07 g/100g vseh maščobnih kislin.

Kot vemo, se CLA v mlečni žlezi sintetizira iz trans vakcenske kisline, s pomočjo Δ^9 desaturaze. V našem primeru je znašal korelacijski koeficient med CLA in t- vakcensko kislino visokih 0,88. Povezava med kislinama je grafično prikazana v sliki 21. Uporabljeni model je pojasnil 77 % variabilnosti.



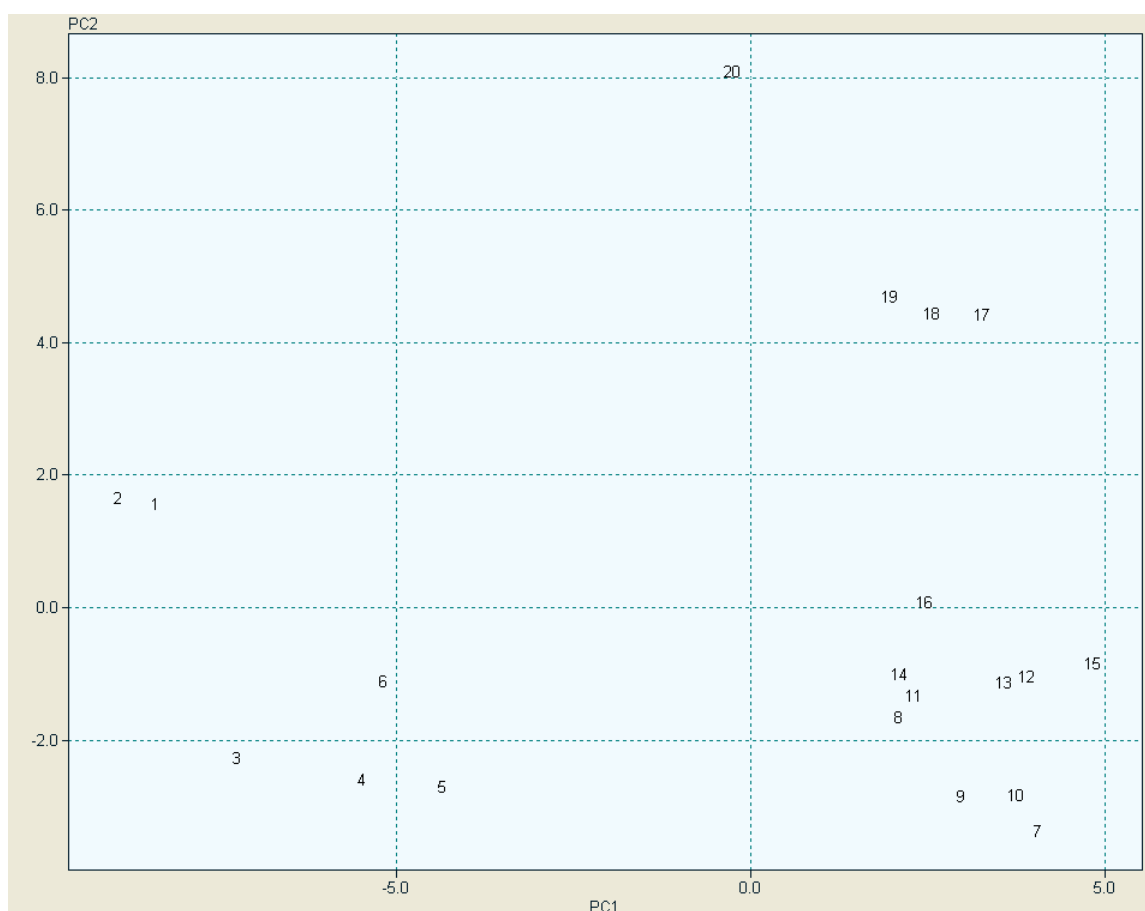
Slika 21: Odvisnost CLA (g/100g) od vsebnosti t- vakcenske kisline (g/100g)

Vzorci sirov višinske paše so vsebovali nekoliko več CLA, kot vzorci sirov nižinske paše, vendar razlike niso bile statistično značilne (Slika 22).



Slika 22: Povprečne vsebnosti dveh izomer CLA (ut. %) v sirih dolinske in višinske paše

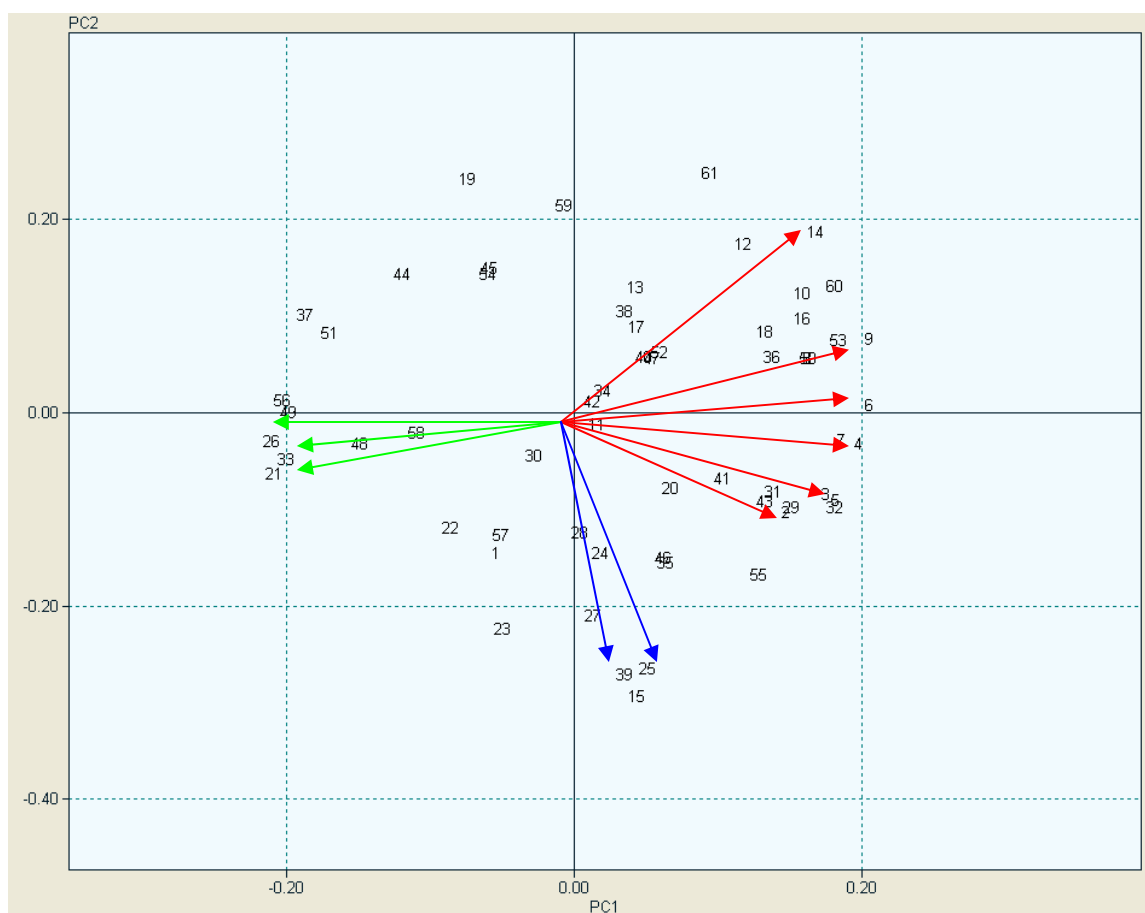
Podatke o vsebnostih skupnih maščobnih kislin, ki smo jih dobili v poskusu, smo uporabili tudi za PCA analizo. Vpliv paše se je razločno pokazal na grafu (Slika 23), kjer so vzorci sirov dolinske paše locirani v spodnjem levem kotu (vzorci 1 do 6), vzorci sirov višinske paše pa na desni strani (vzorci 7 do 19). Številka 20 predstavlja vzorec bovškega sira, ki smo ga imeli za primerjavo. Vidimo, da leži povsem ločen od vzorcev kraškega sira, torej ga na osnovi maščobnokislinske sestave lahko označimo kot sir drugega izvora.



Slika 23: PCA analiza vsebnosti maščobnih kislin v dolinskih in višinskih ovčjih sirih

Na sliki 24 so prikazane vse maščobne kisline, označene s pripadajočimi številkami (1 = maslena kisl., 2 = kaprilska kisl., itd). Čim bliže je točka oz. številka sredini koordinatnega sistema, manjši vpliv ima v ustrezni glavni osi.

S PCA analizo smo si ogledali tudi korelacije med glavnimi maščobnimi kislinami v naših vzorcih (Slika 24). Močne pozitivne korelacije obstajajo med nasičenimi C10-C16 maščobnimi kislinami (na sliki označene z rdečimi puščicami) in med stearinsko, oleinsko in linolno (zelene puščice). Lepo vidna je tudi korelacija med trans vakcensko kislino in konjugirano linolno kislino (c9, t11) (modri puščici).



Slika 24: Korelacije med glavnimi maščobnimi kislinami vzorcev sira

5 RAZPRAVA

5.1 Hlapne maščobne kisline

Hlapne maščobne kisline v sirih nastanejo z bakterijsko fermentacijo laktoze. Pričakovali smo, da se bodo razlike v vsebnosti hlapnih maščobnih kislin pokazale predvsem med svežimi in dva meseca zorenimi siri. Literaturni viri (Akin in sod., 2003; Partidario in sod., 1998; Mallatou in sod., 2003) poročajo o dvigu koncentracije hlapnih maščobnih kislin s časom zorenja. V našem poskusu so bile koncentracije propionske, izo- maslene in n-maslene maščobne kisline zelo nizke (večina pod mejo detekcije) tako v svežih kot zrelih sirih, koncentracije očetne in krotanske kisline pa so variirale premočno, da bi lahko prišli do kakršnihkoli razumnih zaključkov. Ugotovljene nizke vsebnosti hlapnih maščobnih kislin so lahko delno tudi posledica ravnanja z vzorci. Ti so bili do izvedbe samega poskusa večkrat zamrznjeni in ponovno odmrznjeni, kar povzroča izgube hlapnih komponent sira.

Vsebnost očetne kisline v naših vzorcih sira znaša povprečno 0,83 g/kg sira, kar je primerljivo z rezultati študij Mallatou in sod. (2003) in Kondyli in sod. (2003), ki so zabeležili 0,88 oz. 0,85 g očetne kisline/kg sira.

5.2 Skupne maščobne kisline

V nalogi smo analizirali devetnajst vzorcev kraškega ovčjega sira. Kvantitativno smo določili 61 maščobnih kislin. Od tega je bilo 22 nasičenih in so predstavljale povprečno 67,12 % vseh maščobnih kislin. Največji delež sta prispevali palmitinska kislina (C16:0), katere povprečna vsebnost je bila 24,05 utežnega odstotka in stearinska kislina (C18:0) z 11,08 % deležem. Nekoliko manjši odstotek kot stearinska predstavlja miristinska kislina (10,8 % od vseh MK). V sklopu nasičenih maščobnih kislin predstavljajo pomemben delež kratkoverižne maščobne kisline (kaprojska, kaprilska in kaprinska), in sicer 10,99 %. V literaturi se vsebnosti skupnih in posameznih nasičenih maščobnih kislin zelo razlikujejo. Tako navaja Posati (1992) za ovčji sir Roquefort 64,21 % skupnih nasičenih maščobnih kislin, Zlatanov in sod. (2002) pa za različne ovčje sire od 68,9 do 71,0 % skupnih

nasičenih maščobnih kislin. Na podobno variabilnost naletimo tudi, če pogledamo vsebnosti posameznih maščobnih kislin. Zanimiva je primerjava vsebnosti nasičenih maščobnih kislin mleka in mlečnih izdelkov različnih vrst živali, kjer opazimo, da prednjačijo kozji produkti, ki vsebujejo največ nasičenih maščobnih kislin (predvsem kratkoverižnih), sledijo pa jim ovčje in kravje mleko in njuni izdelki (Jandal, 1996). Seveda je pri interpretaciji vseh teh podatkov potrebno vedeti, da niso vedno znani pogoji vzreje, prehrane in drugi vplivi, ki bistveno prispevajo k različnim vsebnostim maščobnih kislin. Za sire v našem poskusu smo ugotovili, da posamezne nasičene maščobne kisline (C10:0, C12:0, C14:0, C16:0) med seboj izražajo močne pozitivne korelacije. Korelacijski koeficienti se gibljejo od 0,77 do 0,97. Vse našete maščobne kisline so močno povezane tudi s stearinsko kislino, kjer pa so korelacije negativne (koeficienti od -0,87 do -0,94). Podobne povezave opisujejo tudi drugi avtorji (Collomb in sod., 2002a; Sevi in sod., 2000).

Enkrat nenasičenih maščobnih kislin smo določili dvajset in so predstavljale 26,83 % vseh maščobnih kislin. Glavna predstavnik te skupine je nedvomno oleinska kislina, ki predstavlja 75 % delež vseh enkrat nenasičenih maščobnih kislin oz. 20,3 % od vseh maščobnih kislin. Ta odstotek se lepo ujema z literaturnimi podatki. Odstotkovno ji sledi vakcenska kislina (t-11 C18:1), ki je predstavljala povprečno 2,45 % vseh maščobnih kislin. Ostale izomere C18:1 (petroselaidinska, elaidinska, c- vakcenska) predstavljajo nekaj manj kot 2 % skupnih maščobnih kislin. Kar visoko vsebnost imata miristooleinska (C14:1) in palmitoleinska kislina (C16:1), kar kaže na relativno visoko aktivnost encima Δ^9 desaturaze.

Preostalih devetnajst maščobnih kislin je pripadlo skupini večkrat nenasičenih (PUFA) maščobnih kislin. Te so skupaj predstavljale 6,04 % vseh maščobnih kislin, kar se ujema s podatki iz literature, ki navajajo vsebnosti od 5 do 7 % (Cabiddu in sod., 2005; Addis in sod., 2002). Največji delež k skupni vsebnosti je prispevala linolna kislina, ki ima povprečno koncentracijo 2,64 g/100g maščobnih kislin. Navadno rejci zvišujejo vsebnost PUFA z različnimi olji ali oljnimi semeni, ki vsebujejo veliko večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Zelo dobra alternativa zviševanju vsebnosti PUFA z različnimi olji pa je paša živali. Sveža 'zelena' krma vsebuje namreč, odvisno od fenološke faze rastlin

(vegetativna oz. reproduktivna), kar 70 - 85 % delež PUFA, zato vsebuje mleko pašnih živali veliko več večkrat nenasičenih maščobnih kislin kot mleko vhlavljenih živali, krmljenih s senom in koncentrati. (Dhiman in sod., 1999).

5.3 VPLIVI SEZONE, ČASA ZORENJA IN PAŠE NA MAŠČOBNOKISLINSKO SESTAVO

V modelu, s katerim smo si ogledali statistične značilnosti različnih vplivov na maščobnokislinsko sestavo sirov, smo izpostavili dva vpliva. Prvi je bil vpliv sezone in drugi vpliv časa zorenja sira. Pri prvem moramo opozoriti, da vpliv ne vključuje striktno samo sezonskih vplivov (obdobje laktacije, temperatura...), ampak tudi vpliv paše. Za to so 'krivi' neugodni vhodni podatki (Preglednica 5), saj se čas izdelave sira (iz tega smo izračunali dan laktacije) in paša (dolinska) pokrivata. Zato ne moremo trditi, da je vpliv 'sezone' res samo vpliv sezone, enako velja za vpliv paše.

Sezona ima velik vpliv skoraj na vse maščobne kisline (Preglednica 11). Statistično neznačilen vpliv je imela sezona le na vsoto trans C18:1 maščobnih kislin in na razmerje C14:1/C14:0. Na slikah 7-18 lahko vidimo, kakšni so trendi vpliva sezone. Deleži kratkoverižnih in srednjeverižnih maščobnih kislin skozi sezono naraščajo, deleži dolgoverižnih pa padajo. Ti rezultati so ravno obratni od podatkov, ki sta jih objavila Nudda in sod. (2005) in Perea in sod. (2000). Tudi njihove živali so se pasle na dveh različnih področjih oziroma na dveh različnih višinah, zato so bile razlike v maščobnokislinski sestavi verjetno tudi povezane s kakovostjo paše. Vsebnosti večkrat nenasičenih in enkrat nenasičenih maščobnih kislin tekom laktacije padajo, zato pa naraščajo deleži nasičenih maščobnih kislin. Tudi tu je trend, glede na omenjena avtorja, ravno obraten. Nudda in sod. (2005) opažajo porast palmitinske kisline (C16:0) in miristinske kisline (C14:0) od marca do junija, kar pa se ujema z našimi rezultati (Sliki 15 in 16).

Vpliv časa zorenja sira je v literaturi obravnavan zelo različno. Mnogi avtorji (Ha in sod., 1989; Partidario in sod., 1998) v svojih študijah niso odkrili nobenih statistično značilnih razlik v maščobnokislinski sestavi med siri, ki so zoreli različno dolgo, drugi avtorji

(Zlatanov in sod., 2002; Jiang in sod., 1998) pa so prišli do zaključkov, da čas zorenja vpliva na maščobnokislinsko sestavo. Naši rezultati so sicer pokazali, da je imel čas zorenja statistično značilen vpliv na vsebnost kratkoverižnih, dolgoverižnih in enkrat nenasičenih maščobnih kislin (Preglednica 11), vendar pa je bil vpliv vzorčenja v tem primeru prevelik, da bi lahko smatrali te rezultate kot relevantne. Sveži siri so namreč predstavljali samo 26 % delež vseh vzorcev, poleg tega pa so bili vsi narejeni iz mleka višinske paše.

Vpliv paše, katerega nismo izrecno izpostavili, zaradi že omenjene strukture vhodnih podatkov, lahko obravnavamo zgolj opisno (Slika 19). Že enostavni izračuni povprečij maščobnih kislin prvih šest vzorcev (dolinska paša) in ostalih trinajst vzorcev (višinska paša), so nam pokazali velike razlike med pašama. Vzorci z višinske paše so vsebovali več kratkoverižnih, srednjeverižnih in skupnih nasičenih maščobnih kislin, manj pa dolgoverižnih, skupnih enkrat- in večkrat nenasičenih maščobnih kislin kot vzorci z dolinske paše. Pričakovali smo, da bo maščobnokislinsko razmerje vzorcev z višinske paše bolj ugodno (manj nasičenih in več večkrat nenasičenih maščobnih kislin), kot maščobnokislinsko razmerje vzorcev dolinske paše. Collomb in sod. (2002b) in Bugaud in sod. (2001) so v svojih raziskavah prišli do rezultatov, ki so ravno obratni od naših. Predvidevamo lahko, da sta kakovost in količina dolinske paše v našem primeru boljši od višinske. Vemo, da ima hribovsko – kraško travinje za svojo rast zelo slabe razmere (plitva plast slabo rodovitne zemlje, ki slabo zadržuje vodo, sušna obdobja poleti), kar zagotovo vpliva na botanično sestavo travinja in s tem na kakovost krme. Več o tej temi govori študija Collomb in sod. (2002b), kjer so ugotavljali povezave med posameznimi vrstami rastlin in maščobnokislinsko sestavo mleka krav.

5.4 RAZMERJE N-6 IN N-3 MAŠČOBNIH KISLIN IN Δ^9 DESATURAZNA AKTIVNOST

Razmerje n-6 in n-3 maščobnih kislin je pomembno predvsem s prehranskega stališča človeka. Vemo, da so n-3 maščobne kisline pomembne za ohranjanje dobrega zdravstvenega stanja človeka. Še pomembnejše pa je dejstvo, da sodelujejo pri pravilnem razvoju in delovanju možganov, srca in očesne mrežnice (Mozzon in sod., 2002).

Maščobne kisline iz skupine n-6 pa imajo vpliv na imunski sistem, krvni pritisk, strjevanje krvi in razna vnetja (Mozzon in sod., 2002). Bolj kot sama koncentracija posameznih maščobnih kislin iz skupin n-6 in n-3 je pomembno njihovo razmerje. Collomb in sod. (2002a) navajajo, da je s prehranskega stališča zaželeno razmerje n-6 in n-3 maščobnih kislin manjše od 5 : 1. Naš poskus je pokazal, da je razmerje n-6/n-3 maščobnih kislin v siru povprečno 3,2 : 1 in je statistično značilno odvisno od sezone (Preglednica 11, Slika 13). Ko smo primerjali povprečne vrednosti razmerja vzorcev sira dolinske in višinske paše, se je pokazalo, da je tako razmerje n-6/n-3 kot tudi razmerje linolna/linolenska maščobna kislina v vzorcih sirov višinske paše za polovico manjše od razmerij vzorcev dolinske paše (Slika 20). Vsebnost n-6 maščobnih kislin je skozi sezono padala (s 5,11 ut. % na 2,60 ut. %), vsebnost n-3 maščobnih kislin pa naraščala (z 0,78 ut. % na 1,35 ut. %).

Poznamo štiri glavne produkte Δ^9 desaturazne aktivnosti. To so C14:1 n-5, C16:1 n-7, C18:1 n-9 in CLA, ki nastanejo iz C14:0, C16:0, C18:0 in t-11 C18:1. Najboljši indikator aktivnosti Δ^9 desaturaze je razmerje C14:1/C14:0, saj poteka sinteza vse miristinske kisline (C14:0) v mlečni žlezi, kar pomeni, da je edini vir C14:1 desaturacija miristinske kisline. Ostali pari omenjenih kislin so lahko absorbirani neposredno iz krvi (Lock in Garnsworthy, 2002). Razmerja v naši študiji so precej višja od razmerij, ki so jih dobili Cabiddu in sod. (2005) in nekoliko nižja od razmerij dobljenih v raziskavi Lock in Garnsworthy (2002) (Preglednica 12).

Preglednica 12: Primerjava razmerij naše študije z literaturnimi viri

Razmerje	naša študija	Cabiddu in sod. (2005)*	Lock in Garnsworthy (2002)**
C14:1/C14:0	0,05	0,02	0,08
C16:1/C16:0	0,04	0,03	0,06
C18:1/C18:0	1,87	1,71	1,80
CLA/ t- vakcenska	0,55	0,60	0,31

* ovčje mleko, ** kravje mleko

5.5 KONJUGIRANA LINOLNA KISLINA

V vzorcih kraškega ovčjega sira smo določili dve izomeri CLA. Izomera c9, t11 C18:2, ki jo smatrajo kot najbolj učinkovito pri preprečevanju nastanka raka, predstavlja, sodeč po literaturi, več kot 82 % od celotne koncentracije CLA (Ha in sod., 1989). V naši študiji je predstavljala 95 % in je imela povprečno koncentracijo 1,33 g/100g vseh maščobnih kislin. Druga izomera, ki smo jo zasledili je t10, c12 C18:2. Pojavila se je v vseh vzorcih, a je bila koncentracija nizka (0,01- 0,13 g/100g). Koncentraciji obeh izomer se dobro ujemata s podatki iz literature (Nudda in sod., 2005; O'Shea in sod., 2000), čeprav vsebnosti močno variirajo.

Vsebnost CLA v mleku in mlečnih izdelkih je močno povezana z vsebnostjo trans vakcenske kisline. Slednja je prekurzor pri nastajanju CLA v mlečni žlezi, pod vplivom Δ^9 desaturaze. V našem primeru se kaže močna pozitivna korelacija ($r = 0,88$) med CLA in trans vakcensko kislino, podobno pa poročajo tudi drugi avtorji (Nudda in sod., 2005; Cabiddu in sod., 2005; Jahreis in sod., 1999).

Veliko variabilnosti v vsebnosti CLA gre pripisati sezonskim vplivom. Jahreis in sod., (1999) opažajo največjo sezonsko variabilnost ravno v ovčjem mleku. Vsebnost CLA poletnega mleka je v njihovi študiji znašala 1,28 utežnega %, vsebnost CLA v mleku s konca zimskega obdobja (marec) pa 0,54 %, medtem ko Nudda in sod. (2005) opažajo, da vsebnost CLA od marca do julija pada (z 2,2 mg/100 mg na 1,4 mg/100 mg). Bistvenega pomena pri interpretaciji teh dveh popolnoma obrnjenih rezultatov je najverjetneje drug klimat. Prva študija se je odvijala na severu Evrope (Nemčija), druga pa na otoku Sardinija, kjer je poletje najmanj ugodno za prirejo mleka (slaba paša, vročina, suša...). V naši nalogi se je vpliv sezone pokazal za statistično neznačilnega, vendar je potrebno pri tem ponovno poudariti, da v našem primeru vpliv sezone vključuje tudi različni paši (dolinska- pomlad, višinska- poletje, jesen).

Največji vpliv pa gre tudi pri CLA pripisati prehrani. O dodajanju različnih maščobnih dodatkov vhlavljenim mlečnim živalim, smo že govorili. Za našo nalogo pa je bistvenega pomena paša oziroma sprememba paše (krme) z nadmorsko višino. Literaturni viri

navajajo velike razlike v vsebnosti CLA v mleku in siru živali, ki so se pasle na različnih višinah. Najlepše to razliko prikaže raziskava Collomb in sod. (2002a), kjer se vsebnost CLA v kravjem mleku z nižin (0,81 g/100g maščob) povzpne prek 1,50 g/100g v mleku s sredogorja, na 2,18 g/100g v mleku z višinskih pašnikov. Zanimivi so tudi rezultati študije, ki so jo izvedli Hauswirth in sod. (2004), ko so med seboj primerjali različne vrste sirov. Siri narejeni iz kravjega mleka z visokogorskih pašnikov Alp so vsebovali neprimerno več CLA kot siri v komercialni prodaji (Ementalec, Čedar). Seveda je glavni razlog za te razlike botanična sestava travne ruše, ki se spreminja z nadmorsko višino (Collomb in sod., 2002b; Cabiddu in sod., 2005). Tudi v našem poskusu so siri, narejeni iz mleka višinske paše, v povprečju vsebovali nekoliko več CLA kot siri, narejeni iz mleka dolinske paše (slika 22), vendar razlike niso bile statistično značilne, kar je vsaj delno tudi posledica že omenjene narave podatkov in posledično statističnega modela, v katerem je bilo nemogoče izključiti vpliv sezone.

6 SKLEPI

Na osnovi opravljenih analiz in obdelave podatkov lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Maščobnokislinska sestava kraškega ovčjega sira je tipična za trdi tip ovčjega sira, z relativno visokim deležem kratkoverižnih maščobnih kislin.
- V sirih prevladuje palmitinska kislina (24,05 ut. %), sledijo pa ji oleinska kislina (20,30 ut. %), stearinska kislina (11,08 ut. %) in miristinska kislina (10,80 ut. %).
- Siri se v večini maščobnih kislin statistično značilno razlikujejo glede na stadij laktacije in nadmorsko višino paše.
- S prehranskega stališča velja poudariti, da siri vsebujejo relativno veliko CLA in imajo ugodno razmerje n-6/n-3 maščobnih kislin.
- Ugodnejšo maščobnokislinsko sestavo glede razmerja med nasičenimi in nenasičenimi maščobnimi kislinami smo sicer ugotovili v sirih dolinske paše, vendar pa so imeli višinski siri večji delež kratkoverižnih maščobnih kislin, boljše (nižje) razmerje n-6/n-3 maščobnih kislin in nekoliko višjo vsebnost CLA.

7 POVZETEK

Kraški ovčji sir se od leta 2000 poteguje za naziv označbe geografskega porekla. Za pridobitev tega naziva pa je potrebno podrobno opisati značilnosti in posebnosti sira. V naši nalogi smo se posvetili ugotavljanju maščobnokislinske sestave kraškega ovčjega sira, za katerega smo pričakovali, da bo imel maščobnokislinsko sestavo tipično za trdi tip sirov, da bo vseboval veliko konjugirane linolne kisline in da se bodo vzorci sirov razlikovali glede na kraj paše (dolina, višina) in stadij laktacije. V poskusu smo obravnavali devetnajst sirov, ki so bili izdelani v Centru za sonaravno rekultiviranje Vremščica. Ti so se razlikovali v sezoni izdelave, času zorenja, termični obdelavi mleka in paši živali. V vzorcih sira smo ugotavljali vsebnost hlapnih maščobnih kislin s plinsko kromatografijo. Za pripravo etrskih ekstraktov smo uporabili modificirano metodo etrske ekstrakcije hlapnih maščobnih kislin po Anaerobe laboratory manual, fourth edition (Holdeman in sod., 1977). Poleg hlapnih maščobnih kislin smo v vzorcih sira ugotavljali skupno maščobnokislinsko sestavo. Z metodo ISTE (*in situ* transesterifikacija) po Park in Goins (1994) smo pripravili metilne estre maščobnih kislin in jih analizirali s plinsko kromatografijo.

Rezultati za vsebnosti hlapnih maščobnih kislin so bili sledeči. Vsebnosti očetne kisline, ki smo jo ugotovili v vseh vzorcih in je bila najbolj zastopana hlapna maščobna kislina, so zelo variirale (0,06 – 1,44 g/kg sira). Vsebnosti propionske in izo-maslene kisline so bile izjemno nizke, večina celo pod mejo detekcije. Podobno nizke koncentracije smo ugotovili tudi za n-masleno (0,02 – 0,1 g/kg sira) in krotosko kislino (0,05 – 1,28 g/kg sira). Prav zaradi nizkih vsebnosti kislin in velike variabilnosti rezultatov nismo mogli podati konkretnjših zaključkov.

V kraškem ovčjem siru smo kvantitativno določili 61 maščobnih kislin. V povprečju so največji delež predstavljale nasičene maščobne kisline s 67,12 %, sledijo jim enkrat nenasičene maščobne kisline s 26,83 % in večkrat nenasičene maščobne kisline s 6,04 % od vseh maščobnih kislin. Od posameznih maščobnih kislin je imela največji delež palmitinska kislina, ki je predstavljala kar 24,05 utežnega odstotka. Od nasičenih

maščobnih kislin velja omeniti tudi stearinsko in miristinsko kislino, ki sta predstavljali povprečno 11,08 ut. % oz. 10,8 ut. %. Glavna predstavnica enkrat nenasičenih maščobnih kislin je oleinska kislina (20,3 ut. %), med večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami pa linolna kislina, ki predstavlja povprečno 2,64 ut. %.

Na maščobnokislinsko sestavo sirov je močno vplivala sezona (skupno s pašo). Vsebnosti kratkoverižnih in srednjeverižnih maščobnih kislin so skozi sezono padale, vsebnosti dolgoverižnih pa naraščale. Z dnevom laktacije so naraščale tudi vsebnosti nasičenih maščobnih kislin, medtem ko so vsebnosti enkrat- in večkrat nenasičenih maščobnih kislin tekom laktacije padale. Vpliv paše na različnih nadmorskih višinah je vplival na vse glavne maščobne kisline. Kratkoverižnih in srednjeverižnih maščobnih kislin je bilo statistično značilno več v vzorcih višinske paše (14,12 % oz. 47,27 % proti 10,91 % oz. 35,92 %), dolgoverižnih maščobnih kislin pa več v dolinskih vzorcih (53,17 % proti 38,61 %; $P < 0,05$). Razlike so bile statistično značilne tudi pri povprečnih vsebnostih nasičenih (61,74 % proti 69,61 %), enkrat nenasičenih (31,46 % proti 24,69 %) in večkrat nenasičenih maščobnih kislinah (6,79 % proti 5,69 %).

V vzorcih sira smo ugotovili prisotnost dveh izomer konjugirane linolne kisline, in sicer izomero cis-9, trans-11 C18:2 in izomero trans-10, cis-12 C18:2. Povprečna vsebnost prve izomere je znašala visokih 1,33 ut. %, druge izomere pa 0,07 ut. %. Ugotovili smo tudi močno povezavo med c9, t11 CLA in trans vakcensko kislino. S prehranskega stališča je, relativno visoka vsebnost CLA in nizko razmerje n-6/n-3 maščobnih kislin v kraškem ovčjem siru, zelo ugodno.

8 VIRI

- Addis M., Cabiddu A., Pinna G., Decandia M., Piredda G., Pirisi A., Molle G. 2005. Milk and cheese fatty acid composition in sheep fed Mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid cis-9, trans-11. *Journal of dairy science*, 88: 3443-3454
- Akin N., Aydemir S., Kocak C., Yildiz M.A. 2003. Changes of free fatty acid contents and sensory properties of white pickled cheese during ripening. *Food Chemistry*, 80: 77-83
- Beare- Rogers J., Dieffenbacher A., Holm J.V. 2001. Lexicon of lipid nutrition (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 73, 4: 685-744
- Bugaud C., Buchin S., Coulon J.B., Hauwuy A., Dupont D. 2001. Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk. *Le lait*, 81, 3: 401-414
- Cabiddu A., Decandia M., Addis M., Piredda G., Pirisi A., Molle G. 2005. Managing Mediterranean pastures in order to enhance the level of beneficial fatty acids in sheep milk. *Small Ruminant Research*, 59, 2-3: 169-180
- Carter S. 1996. Lipids: fats, oils, waxes, etc.. (2. nov. 2004).
<http://biology.clc.uc.edu/courses/bio104/lipids.htm> (15. jul. 2005)
- Chin S.F., Liu W., Storkson J.M, Ha Y.L., Pariza M.W. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5: 185-197
- Chouinard P.Y. 1999. An update on conjugated linoleic acid. (21. feb. 2005).
<http://www.ansci.cornell.edu/dm/nutrition/nutpub/html> (16. jul. 2005)
- Chow C.K. (Ed.) 1992. Fatty acids in foods and their health implications. New York, Marcel Dekker, INC.: 890 str.
- Colbert L.B., Decker E.A. 1991. Antioxidant activity of an ultrafiltration permeate from acid whey. *Journal of Food Science*, 56: 1248-1250
- Collomb M., Bütikofer U., Sieber R., Jeangros B., Bosset J.O. 2002a. Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. *International Dairy Journal*, 12: 649-659
- Collomb M., Bütikofer U., Sieber R., Jeangros B., Bosset J.O. 2002b. Correlation between fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland and botanical composition of the fodder. *International Dairy Journal*, 12: 661-666

- Dexheimer E. 1992. On the fat track. *Dairy Foods*, 93: 38-50
- Dhiman T.R., Anand G.R., Satter, L.D., Pariza M.W. 1999. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science*, 82: 2146-2156
- Dorđević J. 1982. Mleko - hemija i fizika mleka. Beograd, PKB – agroekonomik: 14-59
- Fischione A. 1998. Sirarstvo na Tolminskem, Kobariškem in Bovškem. Ljubljana, Kmečki glas: 33 str.
- Gerželj E., Perko B., Renčelj S. 2000. Elaborat o označbi porekla blaga kraški ovčji sir. Senožče, Društvo rejcev drobnice s Krasa: 11-19
- Grummer R.R. 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *Journal of Dairy science*, 74: 3244-3257
- Ha Y.L., Grimm N.K., Pariza M.W. 1989. Newly recognised antikarcinogenic fatty acid: identification and quantification in natural and processed cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 1: 75-81
- Hauswirth C.B., Scheeder M.R.L., Beer J.H. 2004. High ω -3 fatty acid content in Alpine cheese (The basis for an Alpine paradox). *Circulation*, 109: 103-107
- Holdeman L.V., Cato E.P., Moore W.E.C. 1977. Ether extraction of volatile fatty acids. V: *Anaerobe laboratory manual*. 4th edition. Virginia, Southern Printing Company: 132 str.
- IUPAC nomenklatura organskih spojin. 1984. Stanovnik B. (ur.). Ljubljana, DZS: 454 str.
- Jahreis G., Fritsche J., Mockel P., Schone F., Moller U., Steinhart H. 1999. The potential anticarcinogenic conjugated linoleic acid, cis-9, trans-11 C18:2, in milk of different species: cow, goat, ewe, sow, mare, woman. *Nutrition Research*, 19, 10: 1541-1549
- Jandal J.M. 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 22: 177-185
- Jenkins T.C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76: 3851-3863
- Jiang J., Björck L., Fonden R. 1998. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 95-102
- Kay J.K., Marckle T.R., Auldist M.J., Thompson N.A., Bauman D.E. 2004. Endogenous synthesis of cis- 9, trans- 11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. *Journal of Dairy Science*, 87, 2: 369-378

- Kelly M.L., Kolver E.S., Bauman M.E., Van Amburgh M.E., Muller L.D. 1998. Effect of intake of pasture on concentration of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 81:1630-1636
- Koman-Rajšp M., Stibilj V. 1998. Maščobnokislinska sestava jajc. *Sodobno kmetijstvo*, 31, 5: 248-252
- Kompan D. 1996. Pasma ovc in koz. V: Reja drobnice. Drev S. (ur.). Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 29-50
- Kondyli E., Massouras T., Katsiari M.C., Voutsinas L.P. 2003. Free fatty acids and volatile compounds in low-fat Kefalograviera type cheese made with commercial adjunct cultures. *International Dairy Journal*, 13: 47-54
- Lichtenstein A.H. 1995. Trans fatty acids and hydrogenated fat - what do we know. *Nutrition Today*, 30: 102-107
- Lin T.Y., Lee F.J. 1997. Conjugated linoleic acid as affected by food source and processing. *Scientific Agriculture*, 45, 9-10: 284-295
- Lobb K. 1992. Fatty acid classification and nomenclature. V: Fatty acids in food and their health implications. Chow C.K. (ed.). New York, Marcel Dekker: 1-16
- Lock A.L., Garnsworthy P.C. 2002. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cow's milk. *Animal Science*, 74: 163-176
- Malacarne M., Martuzzi F., Summer A., Mariani P. 2002. Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal*, 12, 11: 869-877
- Mallatou H., Pappa E., Massouras T. 2003. Changes in free fatty acids during ripening of Teleme cheese made with ewes', goats', cows' or a mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal*, 13, 2-3: 211-219
- McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. 1995. *Animal nutrition*. 5th edition. New York, Longman scientific & technical: 607 str.
- Middough R.P., Baer R.J., Casper D.P., Schingoethe D.J., Seas S.W. 1988. Characteristics of milk and butter from cows fed sunflower seeds. *Journal of Dairy Science*, 71: 3179-3185
- Miletič S. 1994. Mlijeko i mliječni proizvodi. Zagreb, Hrvatsko mljekarsko društvo: 273 str.

- Mir Z., Rushfeldt M.L., Mir P.S., Paterson L.J., Weselake R.J. 2000. Effect of dietary supplementation with either conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid rich oil on the CLA content of lamb tissues. *Small Ruminant Research*, 36: 25-31
- Mohamed O.E., Satter L.D., Grummer R.R., Ehle F.R. 1988. Influence of dietary cottonseed and soybean on milk production and composition. *Journal of Dairy Science*, 71: 2677-2688
- Molimard P., Spinnler H.E. 1996. Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheese: Origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79: 169-184
- Mozzon M., Frega N.G., Fronte B., Tocchini M. 2002. Effect of dietary fish oil supplements on levels of n-3 polyunsaturated fatty acids, trans acids and conjugated linoleic acid in ewe milk. *Food Technology and Biotechnology*, 40, 3: 213-219
- Nelson D.L., Cox M.M. 2000. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd edition. New York, Worth publisher: 363-388
- Nudda A., McGuire M.A., Battacone G., Pulina G. 2005. Seasonal variation in conjugated linoleic acid and vaccenic acid in milk fat of sheep and its transfer to cheese and ricotta. *Journal of Dairy Science*, 88: 1311-1319
- O'Shea M., Devery R., Lawless F., Keogh K., Stanton C. 2000. Enrichment of the conjugated linoleic acid content of bovine milk fat by dry fractionation. *International Dairy Journal*, 10: 289-294
- Park P.W., Goins R.S. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science*, 59, 6: 1262-1266
- Partidario A.M., Barbosa M., Vilas Boas L. 1998. Free fatty acids, triglycerides and volatile compounds in Serra da Estrela cheese - changes throughout ripening. *International Dairy Journal*, 8: 873-881
- Perea S., de Labastida, E.F., Najera A.I., Chavarri F., Virto M., de Renobales M., Barron L.J.R. 2000. Seasonal changes in the fat composition of Latxa sheep's milk used for Idiazabal cheese manufacture. *European Food Research and Technology*, 210: 318-323
- Pipero L.S., Sampugna J., Teter B.B., Kalscheur K.F., Yurawecz M.P., Ku Y., Morehouse K.M., Erdman R.A. 2002. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis- 9- containing CLA in lactating dairy cows. *Journal of Nutrition*, 132: 1235-1241
- Posati L.P., Orr M.L. 1992. Fatty acid composition of Feta, Blue and Roquefort cheeses. V: Fatty acids in food and their health implication. Chow C.K. (ed.). New York, Marcel Dekker: 118-119

- Pravilnik o zaščiti geografskih oznak in zaščiti oznak porekla kmetijskih in prehrabnenih izdelkov. 1992. Uredba Sveta (EGS) št. 2081/92 (21. dec. 2005)
http://zakonodaja.gov.si/rpsi/r00/predpis_prav3900.html (27. dec. 2005)
- Pravilnik o certifikatih o posebnih lastnostih za kmetijske proizvode in živila. 1992. Uredba Sveta (EGS) št. 2082/92 (21. dec. 2005)
http://zakonodaja.gov.si/rpsi/r00/predpis_prav3900.html (27. dec. 2005)
- Precht D., Hagemester H., Kanitz W., Voigt J. 2002. Trans fatty acids and conjugated linoleic acids in milk fat from cows fed a rumen-protected linoleic acid rich diet. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 54: 225-242
- Rogelj I. 1996. Lastnosti in predelava mleka. V: Reja drobnice. Drev S. (ur.). Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 207-231
- Saini A.L., Gill R.S. 1991. Goat milk: An attractive alternate. *Indian Dairyman*, 42: 562-564
- Sehat N., Kramer J.K.G., Mossoba M.M., Yurawecz M.P., Roach J.A.G., Eulitz K., Morehouse K.M., Ku Y. 1998. Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids*, 33: 963
- Sevi A., Rotunno T., Di Caterina R., Muscio A. 2001. Fatty acid composition of ewe milk as affected by solar radiation and high ambient temperature. *Journal of Dairy Research*, 69: 181-194
- Sevi A., Taibi L., Albenzio M., Muscio A., Annicchiarico G. 2000. Effect of parity on milk yield, composition, somatic cell count, renneting parameters and bacteria counts of Comisana ewes. *Small Ruminant Research*, 37: 99-107
- SIST EN ISO 707. Mleko in mlečni proizvodi - navodila za vzorčenje. 1997: 36 str.
- Slanovec T. 1982. Sirarstvo. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 23-27
- Tratnik L. 1998. Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Zagreb, Hrvatska mljekarska udruga: 21-25
- Turpeinen A.M., Mutanen M., Aro A., Salminen I., Basu S., Palmquist D.L., Griinari J.M. 2002. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *American Journal for Clinical Nutrition*, 76: 504-510
- Zeppa G., Giordano M., Gerbi V., Arlorio M. 2002. Fatty acid composition of Piedmont 'Ossolano' cheese. *EDP Sciences*, 83: 167-173

Zlatanov S, Laskaridis K., Feist C., Sagredos A. 2002. CLA content and fatty acid composition of Greek Feta and hard cheeses. Food Chemistry, 78: 471-477

Žgajnar J. 1990. Prehrana in krmljenje goved. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 564 str.

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Ireni Rogelj se iskreno zahvaljujem za strokovno vodenje in pomoč pri izdelavi diplomske naloge in izredno korekten odnos na najinih srečanjih.

Za vsestransko pomoč, somentorstvo pri opravljanju diplomskega dela in vspodbudne besede se toplo zahvaljujem dr. Alenki Levart.

Doc. dr. Bogdanu Perku gre zahvala za recenzijo diplomske naloge in pomoč pri pridobivanju literature.

Dr. Mojci Koman – Rajšp bi se zahvalil za pomoč pri uvajanju in realizaciji dela laboratorijske analize.

Zahvaljujem se doc. dr. Matevžu Pompetu, s Fakultete za kemijo, ki je izvedel PCA analizo.

Zahvaljujem se tudi celotni ekipi kemijskega laboratorija Katedre za prehrano za koristne nasvete in prijazno pomoč pri izvedbi analize.

Osebjem knjižnice Oddelka za zootehniko se zahvaljujem za pomoč pri iskanju literature in prijaznost.

Zahvalil bi se tudi Gregorju Gorjancu, ki mi je bil v pomoč pri obdelavi podatkov.

Tina, hvala za slehrni trenutek ...

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Rok NOVAK

**MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA KRAŠKEGA
OVČJEGA SIRA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

