

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Nataša VOGRIČ

***IN VITRO* BIOHIDROGENACIJA MAŠČOBNIH  
KISLIN VOLUMINOZNE KRME S TRAVINJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Nataša VOGRIČ

***IN VITRO* BIOHIDROGENACIJA MAŠČOBNIH KISLIN  
VOLUMINOZNE KRME S TRAVINJA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

***IN VITRO* BIOHYDROGENATION OF FATTY ACIDS FROM  
GRASSLAND FORAGE**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Z diplomskim delom končujem Univerzitetni študij kmetijstvo - zootehnika. Opravljeno je bilo na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kemijske analize so bile opravljene v laboratoriju na Katedri za prehrano.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Andreja Lavrenčiča in za somentorico asist. dr. Alenko Levart.

Recenzent: prof. dr. Janez Salobir

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. Andrej LAVRENČIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: asist. dr. Alenka LEVART  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Janez SALOBIR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Nataša VOGRIČ

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 636.084/.087(043.2)=163.6
KG	živinoreja/prehrana živali/voluminozna krma/maščobne kisline/ biohidrogenacija
KK	AGRIS L02
AV	VOGRIC, Nataša
SA	LAVRENČIČ, Andrej (mentor)/LEVART, Alenka (somentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2011
IN	IN VITRO BIOHIDROGENACIJA MAŠČOBNIH KISLIN VOLUMINOZNE KRME S TRAVINJA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 43 str., 10 pregl., 10 sl., 52 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen naloge je bil proučiti obseg biohidrogenacije voluminozne krme v vampovem soku ter ugotoviti, kako na biohidrogenacijo maščobnih kislin vplivata zrelost in način konzerviranja voluminozne krme. Za substrate smo izbrali štiri vrste voluminozne krme (sveža trava, seno, dobra in slaba silaža). Substrate smo različno dolgo (2, 4, 6, 8, in 96 ur) inkubirali v mešanici vampovega soka in pufra. Po inkubaciji smo substrate liofilizirali in s plinsko kromatografijo določili maščobnokislinsko sestavo. Ugotovili smo, da je voluminozna krma pred biohidrogenacijo vsebovala večinski delež večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) (trava 72,95 %, seno 71,37 %, dobra silaža 75,30 %, slaba silaža 73,64 %), med njimi pa n-3 VNMK (trava 54,27 %, seno 51,95 %, dobra silaža 56,06 %, slaba silaža 56,73 %). Po biohidrogenaciji so substrati vsebovali predvsem nasičene maščobne kisline (NMK) (trava 87,08 %, seno 86,80 %, dobra silaža 86,83 %, slaba silaža 86,36 %). Pri vseh substratih smo opazili, da je bila biohidrogenacija linolenske kisline hitrejša od linolne kisline. Po 96 urah inkubacije je biohidrogeniralo od 80 % (trava) do 84 % (dobra silaža) linolne kisline in od 92 % (seno) do 95 % (dobra silaža) linolenske kisline.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 636.084/.087(043.2)=163.6
- CX animal production/animal nutrition/forage/fatty acids/biohydrogenation
- CC AGRIS L02
- AU VOGRIČ, Nataša
- AA LAVRENČIČ, Andrej (supervisor)/LEVART, Alenka (co-supervisor)
- PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
- PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Animal Science
- PY 2011
- TI IN VITRO BIOHYDROGENATION OF FATTY ACIDS FROM GRASSLAND FORAGE
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 43 p., 10 tab., 10 fig., 52 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The purpose of the thesis was to examine the scope of biohydrogenation of roughage in tripe juice and to figure out how the maturity and method of preservation of roughage affect the biohydrogenation of fatty acids. For substrates, we selected four types of forage (fresh grass, hay, good and poor quality silage). Substrates were incubated in different lengths of time (2, 4, 6, 8, and 96 hours) in a mixture of tripe juice and buffer. After incubation the substrates were frozen and with gas chromatography we analysed fatty acid composition. We found that the forages before biohydrogenation contained a major proportion of polyunsaturated fatty acids (PUFA) (grass 72.95 %, hay 71.37 %, good silage 75.30 %, poor silage 73.64 %), among which n-3 PUFA dominated (grass 54.27 %, hay 51.95 %, good silage 56.06 %, poor silage 56.73 %). After the biohydrogenation the substrates contained mostly saturated fatty acids (SFA) (grass 87.08 %, hay 86.80 %, good silage 86.83 %, poor silage 86.36 %). For all substrates we have noticed that the biohydrogenation of linolenic acid was faster than biohydrogenation of linoleic acid. After the 96 hours of incubation, linoleic acid biohydrogenated from 80% (grass) to 84% (good silage), and linolenic acid from 92% (hay) to 95% (good silage).

## KAZALO VSEBINE

	str
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 MAŠČOBNE KISLINE	3
<b>2.1.1 Nasičene maščobne kisline</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2 Nenasičene maščobne kisline</b>	<b>4</b>
2.1.2.1 Konjugirane maščobne kisline	5
2.1.2.2 Esencialne maščobne kisline	7
2.2 VOLUMINOZNA KRMA	7
2.3 POSEBNOST PREBAVE PRI PREŽVEKOVALCIH	8
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>15</b>
3.1 SUBSTRATI	15
3.2 <i>IN VITRO</i> FERMENTACIJA	16
<b>3.2.1 Izvedba <i>in vitro</i> fermentacije</b>	<b>16</b>
<b>3.2.2 Določanje maščobnokislinske sestave s plinsko kromatografijo</b>	<b>18</b>
3.2.2.1 Analitska oprema in pogoji analize	18
3.2.2.2 Identificiranje kromatografskih vrhov	19
<b>3.2.3 Izračuni</b>	<b>19</b>
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>20</b>
4.1 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA VOLUMINOZNE KRME IN VZORCEV PO INKUBACIJI (BIOHIDROGENACIJI) V VAMPOVEM SOKU	20
4.2 NASIČENE MAŠČOBNE KISLINE	23
4.3 ENKRAT NENASIČENE MAŠČOBNE KISLINE	25
4.4 VEČKRAT NENASIČENE MAŠČOBNE KISLINE	26
4.5 PRODUKTI BIOHIDROGENACIJE	29

4.6	DELEŽI BIOHIDROGENIRANE LINOLNE IN LINOLENSKE KISLINE V <i>IN VITRO</i> POSKUSU PRI RAZLIČNIH SUBSTRATIH IN TRAJANJU	32
4.7	VAKCENSKA KISLINA	34
<b>5</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>39</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Pregled pogostih maščobnih kislin (Boyer, 2005; Lobb in Chow, 2008; Moate in sod., 2004)	3
Preglednica 2: Kemijska sestava uporabljenih substratov (g/kg SS)	15
Preglednica 3: Sestava raztopin A, B in C	16
Preglednica 4: Sestava resazurina, redukcijske raztopine in končnega pufra	17
Preglednica 5: Temperaturni pogoji in pretok plinov za kromatografijo	19
Preglednica 6: Masni deleži (%) NMK, ENMK, VNMK, n-3 VNMK, n-6 VNMK in razmerje med n-6/n-3 VNMK v maščobah substratov (0 h) in po inkubaciji (biohidrogenaciji) v <i>in vitro</i> poskusu po 2., 4., 6., 8. in 96 urah inkubacije	20
Preglednica 7: Masni deleži (%) NMK: lavrinske (C12:0), miristinske (C14:0), palmitinske (C16:0) in stearinske kisline (C18:0) v maščobah substratov (0 h) in po inkubaciji (biohidrogenaciji) v <i>in vitro</i> poskusu po 2., 4., 6., 8. in 96 urah inkubacije	23
Preglednica 8: Masni deleži (%) ENMK: C12:1, C14:1, C16:1 in vsota izomer C18:1 v maščobah substratov (0 h) in po inkubaciji (biohidrogenaciji) v <i>in vitro</i> poskusu po 2., 4., 6., 8. in 96 urah inkubacije	25
Preglednica 9: Masni deleži (%) VNMK: linolne (C18:2 n-6), linolenske (C18:3 n-3), KLK (cis-9 trans-11) in KLK (trans-10 cis-12) v maščobah substratov (0 h) in po inkubaciji (biohidrogenaciji) v <i>in vitro</i> poskusu po 2., 4., 6., 8. in 96 urah inkubacije	26
Preglednica 10: Vsebnosti linolenske in linolne MK in produktov biohidrogenacije (mg/100g SS vzorca) v substratih in vzorcih med inkubacijo	29



## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Cis in trans konfiguracija (Kimball, 2010)	5
Slika 2: Biološko najpomembnejše strukturne izomere linolne kisline: (A) trans-10, cis-12 oktadekadienojska kislina (konjugirana linolna kislina), (B) cis-9, trans-11 oktadekadienojska kislina (konjugirana linolna kislina), (C) cis-9, cis-12 oktadekadienojska kislina (linolna kislina) (Bauman in sod., 1999)	7
Slika 3: Štiridelni želodec prežvekovalcev (prirejeno po: Digestive Anatomy in Ruminants, 2003)	9
Slika 4: Shema biohidrogenacije linolenske in linolne kisline (prirejeno po: Harfoot in Hazlewood, 1997)	13
Slika 5: Biohidrogenacija linolne kisline in endogena sinteza cis-9 trans-11 KLK v tkivu (prirejeno po: Bauman in sod., 1999)	14
Slika 6: Delež biohidrogenirane linolne (C18:2 n-6) in linolenske kisline (C18:3 n-3) v travi	32
Slika 7: Delež biohidrogenirane linolne (C18:2 n-6) in linolenske kisline (C18:3 n-3) v senu	32
Slika 8: Delež biohidrogenirane linolne (C18:2 n-6) in linolenske kisline (C18:3 n-3) v dobri silaži	32
Slika 9: Delež biohidrogenirane linolne (C18:2 n-6) in linolenske kisline (C18:3 n-3) v slabi silaži	32
Slika 10: Delež vakuenske kisline (trans-11 C18:1) v voluminozni krmi (substratih) in različnem trajanju <i>in vitro</i> inkubacije voluminozne krme (trave, sena, dobre in slabe silaže) v mešanici vampovega soka in pufra	34

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

MK	maščobne kisline
NMK	nasičene maščobne kisline
ENMK	enkrat nenasičene maščobne kisline
VNMK	večkrat nenasičene maščobne kisline
KLK	konjugirana linolna kislina
BH	biohidrogenacija
LDL	low-density lipoprotein (lipoproteini nizke gostote)
HDL	high-density lipoprotein (lipoproteini visoke gostote)

## 1 UVOD

Zgodovinsko gledano je bil do pred nekaj desetletji cilj raziskav v kmetijstvu le povečanje pridelka in proizvodne zmogljivosti z le malo poudarka na izboljšanju sestave hranil živilskih proizvodov. Rezultati raziskav in ozaveščenost potrošnikov o možnih zdravju koristih različnih snovi v hrani, so povod vzpostavljanja za koncepte funkcionalnih živil in so pomagale ustvariti povpraševanje po živilih z izboljšano sestavo. Primer takšnega ravnanja je industrija mleka in njena nedavna prizadevanja za spremembo sestave mlečne maščobe (Lock in Bauman, 2004).

Mleko in mlečni izdelki predstavljajo pomemben vir hranljivih snovi v človeški prehrani, ki zagotavljajo energijo, visoko kakovostne beljakovine, kalcij ter vrsto različnih drugih mineralov in vitaminov (Bauman in Griinari, 2003). Mlečna maščoba je odgovorna za številne senzorične, fizikalne in predelovalne lastnosti mlečnih izdelkov (Lock in Bauman, 2004). Vendar pa so mlečne maščobe relativno bolj nasičene kot večina rastlinskih olj. In ravno to vzbuja pri potrošnikih negativa dojemanja ter skrb za javno zdravje v zvezi z čezmernim vnosom nasičenih maščob. Ker je poraba mlečnih proizvodov in mesa prežvekovalcev pogosto povezana z večjo pojavnostjo bolezni srca in ožilja, ter drugih civilizacijskih bolezni (Maia in sod., 2006), predstavlja končni produkt pretvorbe nenasičenih maščobnih kislin v bolj nasičene maščobne kisline velik zdravstveni problem. Proces biohidrogenacije je že dolgo znan kot posledica mikrobne aktivnosti v predželodcih prežvekovalcev.

Med maščobne kisline, ki imajo ugodni učinek na zdravje ljudi in živali, spadajo večkrat nenasičene maščobne kisline, predvsem n-3 maščobne kisline in konjugirana linolna kislina (KLK). Glavni vir KLK, za prehrano ljudi, so živilski proizvodi prežvekovalcev. KLK nastane pri procesu biohidrogenacije v predželodcih, s pretvorbo linolne kisline s pomočjo bakterij *Butyrivibrio fibrisolvens* ali pa se v tkivih sintetizira iz trans-11 C18:1 maščobne kisline (Bauman in sod., 1999). Najbolj proučena in glavna izomera v mleku je *cis-9 trans-11* C18:2 (MacDonald, 2000).

Namen diplomske naloge je bil proučiti obseg biohidrogenacije v vampovem soku ter preučiti, kako na biohidrogenacijo vplivata zrelost in način konzerviranja voluminozne krme. Za *in vitro* biohidrogenacijo smo izbrali svež vzorec krme (travo) in konzervirane vzorce (seno in silaža). Želeli smo ugotoviti tudi kakšne so vsebnosti skupin maščobnih kislin ter posameznih maščobnih kislin v substratih pred biohidrogenacijo in v različnih časih inkubacije vzorcev.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MAŠČOBNE KISLINE

Maščobne kisline (MK) so organske molekule, ki vsebujejo polarno karboksilno skupino (-COOH), vezano na nerazvejano alifatsko verigo. Te strukturne značilnosti jim dajejo dvojno naravo: en konec je polaren in včasih ionski (karboksilna skupina), medtem ko ima nasprotni konec (ogljikovodikova veriga) nepolarne lastnosti (Boyer, 2005).

Karboksilne kisline sestavlja od 2 do 30 ali več ogljikovih atomov. Večina maščobnih kislin, ki jih najdemo v naravi, vsebuje med 12 in 22 ogljikovih atomov, med katerimi so najpogostejše tiste s 16 in 18 C atomi (Lobb in Chow, 2008).

Glede na število ogljikovih atomov v verigi jih delimo na kratkoverižne (2 do 8 C atomov), srednjeverižne (10 do 16 C atomov) in dolgoverižne maščobne kisline (18 do 36 C atomov) (Orešnik in Kermauner, 2009).

Maščobne kisline, glede na stopnjo nasičenosti, razdelimo v tri glavne skupine, na nasičene maščobne kisline (NMK), enkrat nenasičene maščobne kisline (ENMK) in večkrat nenasičene maščobne kisline (VNMK) (Orešnik in Kermauner, 2009).

V preglednici 1 predstavljamo trivialna in kemijska imena maščobnih kislin, ki jih najpogosteje najdemo v rastlinskih in živalskih tkivih.

Preglednica 1: Pregled pogostih maščobnih kislin (Boyer, 2005; Lobb in Chow, 2008; Moate in sod., 2004)

Okrajšava	Trivialno ime	Kemijsko ime
C12:0	lavrinska kislina	dodekanojska
C14:0	miristinska kislina	tetradekanojska
C14:1 n-5	miristooleinska	cis-9-tetradecenojska
C16:0	palmitinska kislina	heksadekanojska
C16:1 n-7	palmitooleinska	cis-9-heksadecenojska
C18:0	stearinska kislina	oktadekanojska
C18:1 n-9	oleinska kislina	cis-9-oktadecenojska
t C18:1 n-7	vakcenska kislina	trans-11-oktadecenojska
C18:2 n-6	linolna kislina	cis-9,cis-12-oktadekadienojska
c-9, t-11 C18:2	KLK	cis-9, trans-11-oktadekadienojska
C18:3 n-3	linolenska kislina	cis-9,12,15-oktadekatrienojska
C18:3 n-6	$\gamma$ -linolenska kislina	cis-6,9,12-oktadekatrienojska
C20:4 n-6	arahidonska kislina	cis-5,8,11,14-eikozanotetraenojska
C20:5 n-3	EPA	cis-5,8,11,14,17-eikozapentaenojska
C22:6 n-3	DHA	cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenojska

### 2.1.1 Nasičene maščobne kisline

Nasičene maščobne kisline so tiste, v katerih so ogljikovi atomi med seboj povezani le z enojnimi vezmi. Večina nasičenih maščobnih kislin, ki se pojavljajo v naravi, ima sodo število ogljikovih atomov in nerazvejano strukturo. Glavni vir teh maščobnih kislin je predvsem hrana živalskega izvora (meso in mesni izdelki, mleko in mlečni izdelki) ter nekatere rastlinske maščobe (kokosovo in palmovo olje). Zaužitje nasičenih maščobnih kislin, predvsem tistih z manj kot 18 C atomi, povečuje raven slabega LDL holesterola v krvi (Wood in sod., 2008).

Najbolj pogoste nasičene maščobne kisline vsebujejo med 12 in 22 C atomov, med katerimi so najpomembnejše lavrinska (12:0), miristinska (14:0), palmitinska (C 16:0) in stearinska kislina (C 18:0) (Lobb in Chow, 2008).

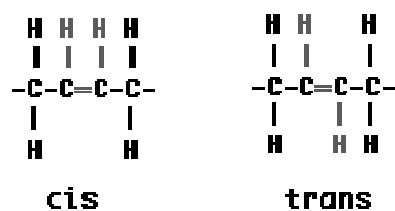
### 2.1.2 Nenasičene maščobne kisline

Nenasičene maščobne kisline imajo v verigi ogljikovih atomov eno ali več dvojnih vezi (Lobb in Chow, 2008). Enkrat nenasičene maščobne kisline so tiste, ki imajo eno dvojno vez. Če pa imajo dve ali več dvojnih vezi, jih imenujemo večkrat nenasičene maščobne kisline. V primerjavi z nasičenimi, le te znižujejo raven LDL holesterola v krvi (Wood in sod., 2008).

Ena najpomembnejših enkrat nenasičenih maščobnih kislin iz vrste n-9 (C18:1 n-9) je oleinska kislina, ki se pojavlja v ribjih oljih, živalskih maščobah ter oljih oreščkov (Lobb in Chow, 2008).

Nenasičene maščobne kisline so naravne komponente živalskih in rastlinskih maščob. Dvojna vez ima lahko *cis* ali *trans* konfiguracijo. Večina nenasičenih maščobnih kislin v naravi je v *cis*-konfiguraciji (Ascherio in Willent, 1997).

Izraz *cis* nam pove, da se vodikova atoma, ki sta pritrjena na ogljik ob dvojni vezi, nahajata na isti strani. Pri *trans* konfiguraciji pa je ravno obratno, vodikova atoma se nahajata na nasprotni strani (slika 1). Zaradi takšne orientacije okrog dvojne vezi imajo *trans* maščobne kisline ravno verigo, podobno kot NMK (Bauman, 2009).



Slika 1: Cis in trans konfiguracija (Kimball, 2008)

*Trans* maščobne kisline imajo status škodljivih MK, saj so dejavniki tveganja za nastanek bolezni srca in ožilja, ker povečujejo količino lipoproteinov z nizko gostoto (LDL) in zmanjšujejo količino lipoproteinov z visoko gostoto (HDL). V večji količini nastajajo *trans* izomere MK pri hidrogenaciji (Ascherio in Willent, 1997). *Trans* nenasičene maščobne kisline nastajajo tudi v predželodcih prežvekovalcev (govedo, drobnica) s pomočjo mikroorganizmov (Williams, 2000).

VNMK se glede na pozicijo dvojnih vezi delijo na konjugirane, nekonjugirane in alenske maščobne kisline. Dvojni vezi sta konjugirani takrat, kadar sta C atoma z dvojnima vezema ločena z enojno vezjo ( $-C=C-C=C-$ ). Kadar sta dvojni vezi ločeni z enim ali več C atomi, povezanimi z enojno vezjo, je kislina nekonjugirana ( $-C=C-(C)_n-C=C-$ ). Kislina je alenska, kadar ima en C atom dve dvojni vezi ( $-C=C=C-$ ) (Lobb in Chow, 2008).

#### 2.1.2.1 Konjugirane maščobne kisline

Konjugirana linolna kislina (KLK) je skupina pozicijskih in geometrijskih izomer oktadekadienojske kisline (C18:2 n-6) s konjugiranimi dvojnima vezema. Razlike obstajajo v konfiguraciji dvojne vezi, možne so vse štiri kombinacije *cis-trans*, *trans-cis*, *cis-cis*, ali *trans-trans*. Obstaja več kot 20 različnih geometrijskih in pozicijskih izomer KLK. Na sliki 2 so prikazane biološko najbolj pomembne strukturne izomere linolne kisline.

KLK se nahaja predvsem v mesu, mleku in mlečnih izdelkih prežvekovalcev. Rastlinska olja in margarine vsebujejo le malo KLK. Koncentracija KLK v maščobah mesa neprežvekovalcev in rastlinskih olj je navadno v območju med 0,6 in 0,9 mg/g maščobe. Majhno koncentracijo KLK najdemo tudi v človeški krvi in tkivih (Chin in sod., 1992, cit. po MacDonald, 2000; Pariza in sod., 1963, cit. po MacDonald, 2000). Višji delež KLK v maščobah prežvekovalcev je posledica biohidrogenacije prehranskih nenasičenih maščobnih kislin v predželodcih. To pomeni, da je za tvorbo KLK odgovorna mikroflora v

predželodcih. Glavni tvorci KKK so vampne bakterije iz rodu *Butyrivibrio fibrisolvens* (Bauman in sod., 2000, cit. po Čepeljnik in Devillard, 2006).

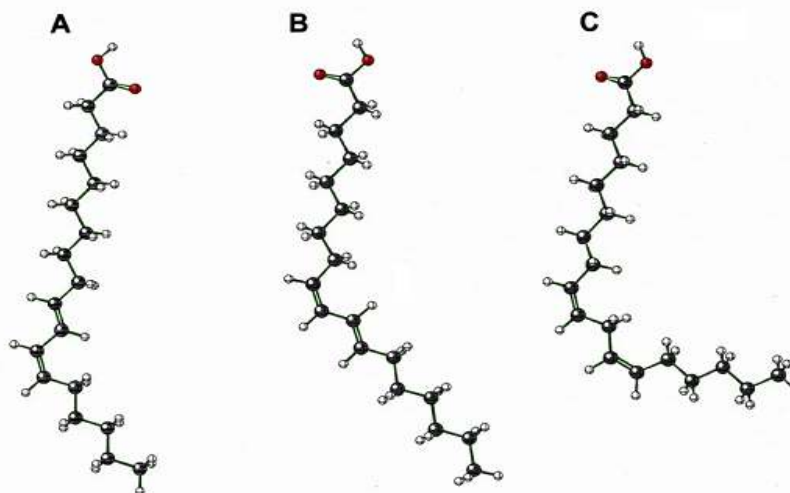
Mleko vsebuje več kot 20 izomer KKK. Koncentracija KKK v mlečnih proizvodih je navadno v območju med 2,9 in 8,92 mg/g maščobe (MacDonald, 2000). Prevladujoča izomera v mlečni maščobi je *cis-9, trans-11* C18:2 (n-6) in predstavlja od 73 % do 90 % od celotne KKK v mlečni maščobi (Bauman in sod., 1999; Lock in Bauman, 2004; MacDonald, 2000). Parodi (1977, cit. po Bauman in Griinari, 2003) je bil prvi, ki je dokazal prisotnost *cis-9, trans-11* KKK v mlečni maščobi.

Najbolj proučena izomera je *cis-9 trans-11*, ki ima dokazano, tako v *in vitro* kot v *in vivo* raziskavah, antikancerogeno delovanje (MacDonald, 2000). Poleg tega ima tudi druge vloge pri zdravju človeka: antiaterogene učinke, povečuje odpornost imunskega sistema, zavira razvoj ateroskleroze, zmanjšuje delež maščob v telesu (Bauman in sod., 1999; Mir in sod., 2004; MacDonald, 2000).

Za te učinke sta odgovorni predvsem dve izomeri KKK, *cis-9, trans-11* KKK in *trans-10, cis-12* KKK (Mir in sod., 2004). Objave Baumgarda (cit. po Bauman, 2002) so pokazale, da je *trans-10, cis-12* KKK izomera močan zaviralec sinteze mlečne maščobe.

KKK in enkrat nenasičene maščobne kisline so vmesni produkti biohidrogeniranja večkrat nenasičenih maščobnih kislin, predvsem linolne (C18:2 n-6) in linolenske kisline (C18:3 n-3) s pomočjo vampnih bakterij (Kramer in sod., 2004).





Slika 2: Biološko najpomembnejše strukturne izomere linolne kisline: (A) trans-10, cis-12 oktadekadienojska kislina (konjugirana linolna kislina), (B) cis-9, trans-11 oktadekadienojska kislina (konjugirana linolna kislina), (C) cis-9, cis-12 oktadekadienojska kislina (linolna kislina) (Bauman in sod., 1999).

### 2.1.2.2 Esencialne maščobne kisline

Večkrat nenasičene MK družin n-6 in n-3, so bistvenega pomena za življenje in zdravje. Živali jih same ne morejo sintetizirati, ampak jih morajo pridobiti iz rastlinskih virov, kot del prehrane. Linolna (C18:2 n-6) in linolenska kislina (C18:3 n-3), včasih imenovana tudi  $\alpha$ -linolenska kislina, sta pomembni komponenti za izgradnjo in normalno delovanje živalskih in rastlinskih celičnih membran. Obe kislini sta večkrat nenasičeni in sta prekursorja za nastanek ostalih VNMK. Linolna kislina se lahko pretvori v  $\gamma$ -linolensko (C18:3 n-6) in arahidonsko kislino (C20:4 n-6). Iz linolenske pa nastane eikozapentaenojska (EPA, C20:5 n-3) in dokozaheksaenojska kislina (DHA, C22:6 n-3) (Simopoulos, 1999).

$\alpha$ -linolensko kislino (C18:3 n-3) najdemo v zelenih listnatih rastlinah, lanenem semenu, oljni ogrščici in oreh. Esencialne n-3 VNMK imajo pomembno vlogo pri preventivi in zdravljenju bolezni koronarnih arterij, hipertenziji, sladkorni bolezni, vnetnih in avtoimunskih boleznih ter zmanjšujejo pogostost raka (Simopoulos, 1999).

## 2.2 VOLUMINOZNA KRMA

Krmo, ki vsebuje nad 18 % surove vlaknine (SV), imenujemo voluminozna krma (Orešnik, Kermauner, 2000). Zanja je značilno, da zavzema v prebavilih precejšnjo prostornino

(volumen), vsebuje več vode (razen mrve) in več surove vlaknine, ima manjšo koncentracijo hranljivih snovi in slabšo prebavljivost. Voluminozna krma je lahko sveža ali konzervirana (Orešnik in Kermauner, 2000). Koncentracija MK v voluminozni krmi je odvisna od številnih dejavnikov: od vrste in zrelosti rastline (Harwood 1980, cit. po Boufaïed, 2003a; Harfoot in Hazlewood 1988, cit. po Boufaïed, 2003a), hitrosti rasti (Bauchart in sod., 1984, cit. po Boufaïed, 2003a), trajanja venenja in vremenskih pogojev siliranja (Dewhurst in King, 1998, cit. po Boufaïed, 2003a).

Med voluminozno krmo štejemo (Orešnik in Kermauner, 2000):

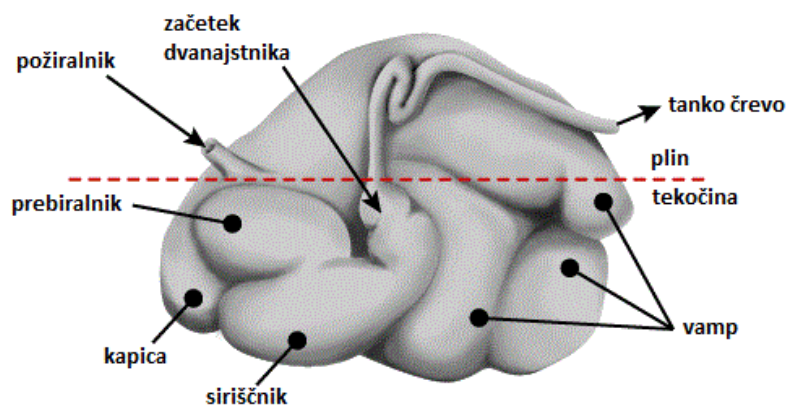
- zeleno krmo, kot je trava, travno deteljne mešanice, lucerna, detelja, zelena žita, zelena koruza, krmni ohrovt in druge krmne zelene rastline
- konzervirano voluminozno krmo, kamor uvrščamo mrvo (seno, otava, otavič in mrva poznejših košenj) in silirano krmo (travna silaža, silaža iz detelj ali lucerne, koruzna silaža, silaža iz listja in glav sladkorne pese)
- gomoljnice in korenovke (krompir, repa, pesa,...)

Silaža je krmilo, ki ga pripravimo tako, da zelene rastline konzerviramo v anaerobnih pogojih, v katerih anaerobni mikroorganizmi ob razgradnji ogljikovih hidratov krme proizvajajo hlapne maščobne kisline in mlečno kislino. Pod ugodnimi pogoji se v siliranem krmilu razvijajo predvsem mlečnokislinske bakterije. Ob neugodnih pogojih siliranja pa prihaja do maslenokislinskega vrenja (Orešnik in Kermauner, 2000).

### 2.3 POSEBNOST PREBAVE PRI PREŽVEKOVALCIH

Prežvekovalci spadajo med rastlinojede sesalce, ki prežvekujejo. Razvili so zelo učinkovit sistem prebave, ki temelji na poudarjenem simbiotskem odnosu med prežvekovalcem in mikroorganizmi v prebavilih. Prežvekovalci lahko zauživajo in s pomočjo mikroorganizmov izkoriščajo veliko količino voluminozne krme, ki vsebuje veliko surove vlaknine (Orešnik in Kermauner, 2009). Paša je osnovni vir krme tako za domače (govedo, drobnica) kot tudi za prostoživeče prežvekovalce (srnjad). Približno eno tretjino dneva porabijo za zauživanje krme (za pašo), tretjino za prežvekovanje in preostalo tretjino za počitek (Žgajnar, 1990).

Za prežvekovalce je značilno, da imajo štiridelni želodec. Sestavljajo ga trije predželodci, vamp (*rumen*), kapica (*reticulum*) in prebiralnik (*omasum*) ter pravi želodec ali siriščnik (*abomasum*) (slika 3). Vamp in kapica sta anatomsko sicer različna, funkcionalno pa sestavljata dokaj enoten prostor, ki ga označujemo kot *retikulo-rumen*. Najpomembnejši del prebavnega trakta pri prežvekovalcih je vamp, ki je razdeljen na dorzalne in ventralne vampe vreče. Notranjost vampa je porasla s papilami, ki močno povečajo njegovo absorpcijsko površino. Pri ovcah in govedu, vamp predstavlja od 64 do 71 % prostornine prebavnega trakta in od 9 do 13 % skupne prostornine telesa (van Soest, 1994, cit. po Flint, 1997). Prebiralnik je tretji predželodec, ki leži med kapico in siriščnikom. V njem se absorbira odvečna tekočina. Siriščnik, kot pravi želodec, je cevast organ, ki povezuje prebiralnik in tanko črevo. Njegove stene so nagubane v podolgovate brazde. Epitel pokrivajo sekretorne celice, ki izločajo enake sekrete kot želodci monogastričnih živali (Žgajnar, 1990).



Slika 3: Štiridelni želodec prežvekovalcev (prirejeno po: Digestive Anatomy in Ruminants, 2003)

Zauživanje in požiranje krme sta pomembni opravili, saj morajo prežvekovalci zaužiti veliko količino, običajne voluminozne krme, da zadovoljijo svoje potrebe (Žgajnar, 1990). Govedo zauživa krmo zelo hitro, jo navlaži s slino, le malo prežveči in požre. V predželodcih se krma pomeša z ostalo vsebino. Mešanje omogočajo močne kontrakcije stene vampa in kapice (ruminacije). Ob tem se na novo zaužiti krmi primešajo mikroorganizmi (Orešnik in Kermauner, 2009). Ko so veliki delci krme prežvečeni in s tem razdeljeni na manjše delce, se površina in hitrost fermentacije povečata (Russell in Rychlik, 2001).

Voluminozna krma je sestavljena iz strukturnih ogljikovih hidratov, ki jih sesalci s svojimi encimi niso sposobni razgraditi. Pri tem jim pomagajo številni vampni mikroorganizmi. Glavni produkti razgradnje ogljikovih hidratov so hlapne maščobne kisline, ki so zelo pomembne za preskrbo gostiteljevega organizma z energijo. Kar 65 do 80 % vse energije, ki se v predželodcih pojavi kot posledica mikrobne fermentacije, so hlapne maščobne kisline (predvsem očetna, propionska in maslena kislina) (Žgajnar, 1990). Če prežvekovalce krmimo s krmo, v katerih primanjkuje vlaknine, potem se zmanjša mešanje krme, prežvekovanje in posledično tudi tok sline. Kisline, nastale s fermentacijo, se kopičijo in pH v predželodcih se zniža (Russell in Rychlik, 2001).

Mikrobna populacija v predželodcih je kompleksna, mešana združba bakterij, arhej, praživali, anaerobnih gliv in bakteriofagov. Mikrobni ekosistem v predželodcih je stabilen in opravlja funkcijo biokonverzije krme v hlapne maščobne kisline. Hkrati pa je tudi dinamičen proces, kjer se mikrobna populacija prilagaja novim sestavinam krme, ki jo žival zaužije. Vampovi mikroorganizmi so prilagojeni, da preživijo v določenih pogojih, ki prevladujejo v predželodcih. Anaerobni pogoji v predželodcih se vzdržujejo s plini, ki nastajajo med fermentacijo (Kamra, 2005). Celotna masa svežih mikroorganizmov v predželodcih se giblje od 5 do 10 odstotkov mase vsebine vampa. Najštevilčnejši predstavnik vampove mikrobne združbe so bakterije (Žgajnar, 1990), katerih število se giblje od  $10^{10}$  do  $10^{11}$ /ml vampovega soka (Kamra, 2005). Bakterije imajo pri prežvekovalcih dominantno vlogo v procesu fermentacije (Russell in Rychlik, 2001). Približno polovica vseh bakterij deluje v predželodcih v vodni suspenziji, ostala polovica pa je aktivna na površini delcev krme (Žgajnar, 1990). Temperatura 39 °C in pH vrednost med 6,0 in 6,9 so idealni pogoji za rast vampnih bakterij (Kamra, 2005).

Glavna vira maščob v prehrani prežvekovalcev sta voluminozna krma in močna krmila oz. koncentracije (Bauman in sod., 2003). Maščobe voluminozne krme so sestavljene v glavnem iz glikolipidov in fosfolipidov. Krmne rastline, konzervirane ali sveže, v največjem deležu vsebujejo nenasičene maščobne kisline, linolensko (C18:3 n-3) in linolno kislino (C18:2 n-6). V nasprotju pa olja žit, ki jih uporabljajo za močna krmila, vsebujejo linolno (C18:2 n-6) in oleinsko kislino (C18:1 n-9), ki sta vezani v obliki trigliceridov (Harfoot in Hazlewood, 1997). Glavne vrste prehranskih maščob, ki vstopajo v predželodce so trigliceridi,

fosfolipidi, in glikolipidi (Jenkins in sod., 2008). Večina hidrolize glikolipidov in fosfolipidov je rezultat encimske aktivnosti mikroorganizmov pri prežvekovalcih (Dawson in Hemington, 1974. cit. po Jenkins in sod., 2008). Ko krma prispe v predželodce, vstopi v veliko fermentacijsko kad, kjer gre skozi široko paleto kemičnih sprememb, ki jih izvaja mikrobná populacija (Harfoot, 1978, cit. po Jenkins in sod., 2008). Ko prežvekovalci zaužijejo zeleno voluminozno krmo, sta linolna in linolenska kislina glavna substrata za mikrobnó biohidrogenacijo v predželodcih (Carriquiry in sod., 2007; Jenkins in sod., 2008, cit. po Ortega-Pérez in sod., 2010), iz katere nastajajo biološko pomembne izomere kot je KKK, cis-9, trans-11 KKK, znana kot vampova kislina in vâkvenska kislina (trans-11 C18:1) (Palmquist, 1988, cit. po Ortega-Pérez in sod., 2010).

Vampni mikroorganizmi razgradijo lipide, ki vstopajo v predželodce preko dveh pomembnih mikrobioloških procesov, lipolize in biohidrogenacije (Jenkins in sod., 2008).

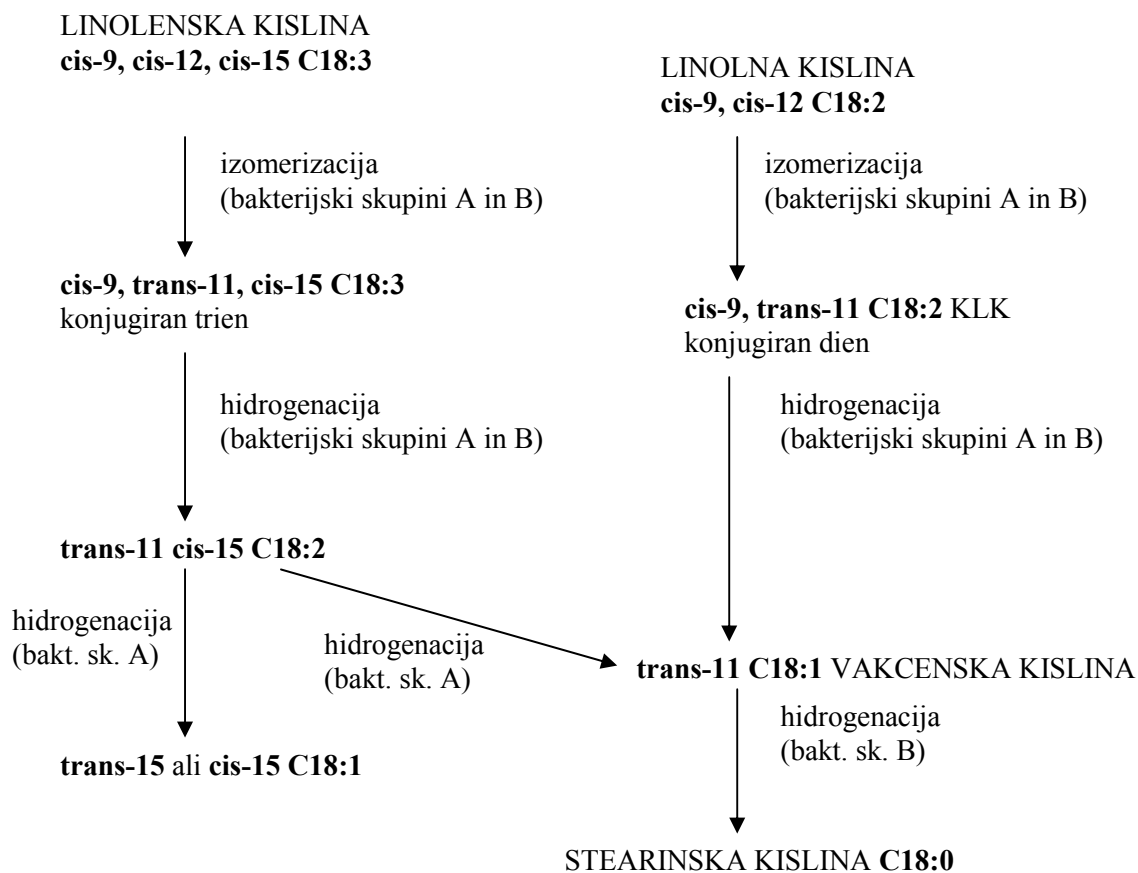
Maščobe, ki vstopajo v predželodce najprej razgradijo mikrobné lipaze v postopku, imenovanem lipoliza. Mikrobné lipaze hidrolizirajo esterske vezi v kompleksnih lipidih, kar povzroči sproščanje prostih maščobnih kislin (Garton in sod., 1961, cit. po Jenkins in sod., 2008; Dawson in sod., 1977, cit. po Jenkins in sod., 2008). *Anaerovibrio lipolytica* (Harfoot, 1978, cit. po Jenkins in sod., 2008) je vampova bakterija, ki proizvaja dva hidrolitična encima, esterazo in lipazo. Lipaza je ekstracelularni encim, pakiran v membranskih delcih, sestavljen iz beljakovin, maščob in nukleinskih kislin (Henderson in Hodgkiss, 1973, cit. po Jenkins, 1993). *Anaerovibrio lipolytica* hidrolizira trigliceride. Nenasičene maščobne kisline, ki se sprostijo pri lipolizi, kasneje biohidrogenirajo mikroorganizmi v predželodcih (Harfoot in Hazlewood, 1997, cit. po Bauman in sod., 2003).

Za biohidrogenacijo nenasičenih MK v predželodcih so v veliki meri odgovorne bakterije, protozoi so manj pomembni (Harfoot in Hazlewood, 1988, cit. po Bauman in sod., 1999). Že vrsto let je znano, da je *Butyrivibrio fibrisolvens* bakterija, ki je sposobna hidrogenacije MK (Kepler in sod., 1966, cit. po Bauman in sod., 1999), ki hidrolizira fosfolipide in glikolipide (Harfoot in Hazlewood, 1997, cit. po Bauman in sod., 2003). Kemp in Lander (1984, cit. po Čepļjenik in Devillard., 2006) sta bakterije na osnovi poteka biohidrogenacije razdelila v dve skupini. Bakterije (Harfoot in Hazlewood, 1997) skupine A (*Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, *Micrococcus*, *Borrelia*, *Eubacterium*) hidrogenirajo linolno in linolensko

kislino do vakcenske kisline (trans-11 C18:1). Bakterije skupine B (*Fusocillus* in nekatere Gram negativne bakterije) so sposobne hidrogenirati širok spekter maščobnih kislin z 18 ogljikovimi atomi, vključno z oleinsko (cis-9 C18:1) in vakcensko kislino (trans-11 C18:1), kakor tudi linolensko kislino, v stearinsko kislino.

Mikrobna biohidrogenacija (Mosley in sod., 2002) je proces pretvorbe nenasičenih maščobnih kislin v nasičene MK, preko izomerizacije, ki ji sledi hidrogenacija dvojne vezi (Harfoot in Hazlewood, 1988, cit. po Jenkins in sod., 2008). Je biološki proces, ki prevladuje v vampnem mikrobnem ekosistemu (Mosley in sod., 2002) in v nižjih predelih prebavnega trakta (Ward in sod., 1964, cit. po Wilde in Dawson, 1966). Proces vključuje več biokemičnih korakov (Bauman in sod., 1999). Prvi korak biohidrogenacije linolne kisline (slika 4) je izomerizacija cis-9, cis-12 dvojne vezi v cis-9, trans-11, pri čemer nastane konjugiran dien, konjugirana linolna kislina (KLK). Sledi hidrogenacija dvojne vezi, pretvorba KLK v trans-11 C18:1 (vakcenska kislina) za nastanek stearinske kisline (C18:0), ki je končni produkt biohidrogenacije (Harfoot in Hazlewood, 1988, cit. po Carriquiry in sod., 2007).

Biohidrogenacijska pot linolenske kisline (slika 4) vključuje izomerizacijo dvojne vezi, tvori se konjugiran trien (cis-9, trans-11, cis-15 C18:3), sledi hidrogenacija dvojne vezi na devetem C atomu, pri čemer nastane dien (trans-11, cis-15 C18:2). Sledi hidrogenacija ene od preostalih dvojnih vezi, pri čemer nastane monoen, ki je bodisi cis-15 ali trans-15 C18:1 in trans-11 C18:1 (vakcenska kislina). Končni produkt biohidrogenacije nenasičenih C18 MK je stearinska kislina, C18:0 (Harfoot in Hazlewood, 1988, cit. po Carriquiry in sod., 2007).

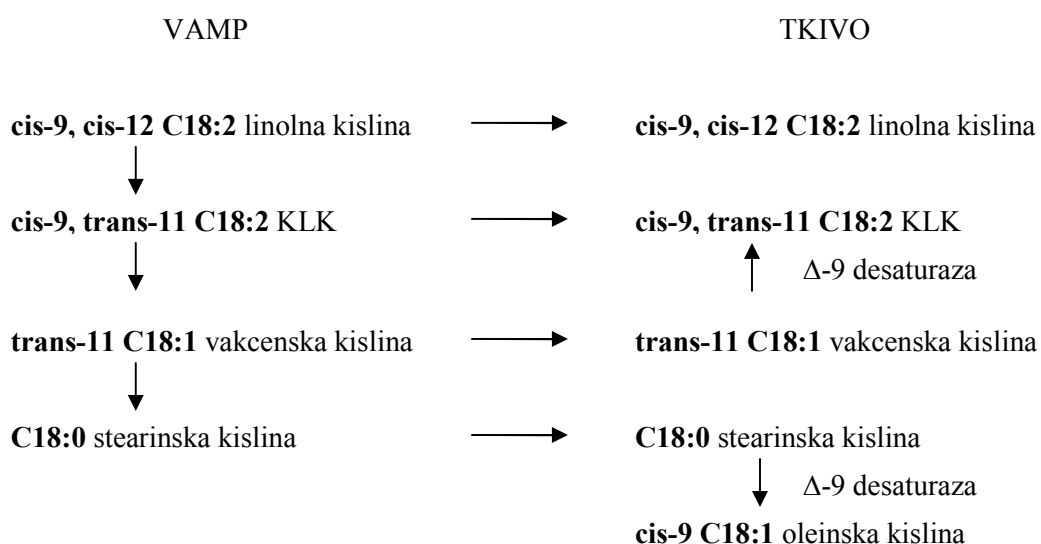


Slika 4: Shema biohidrogenacije linolenske in linolne kisline (prirejeno po: Harfoot in Hazlewood, 1997)

Intermediati, ki uidejo popolni biohidrogenaciji v predželodcih, dosežejo tanko črevo, kjer jih telo živali absorbira in prenese v mlečno žlezo, ki uporablja vakcensko kislino kot substrat za sintezo KLK cis-9, trans-11 v mleku (Kay in sod., 2004, cit. po Ortega-Pérez in sod., 2010).

Dva ključna intermediata biohidrogenacije sta vakcenska kislina (trans-11-oktadecenojska kislina C18:1), ki nastane iz linolne in linolenske kisline (Bauman in sod., 2003), in konjugirana linolna kislina (cis-9, trans-11 C18:2), ki jo najdemo v mlečni maščobi in mesu prežvekovalcev in izvira iz dveh različnih virov (Grinari in Bauman, 1999, cit. po Bauman in sod., 1999). Prvi vir je biohidrogenacija linolne kisline (Bauman in sod., 2003), kjer je KLK intermediat biohidrogenacije linolne kisline. Drugi pomemben vir KLK je desaturiranje vakcenske kisline, vmesne spojine v procesu biohidrogenacije z encimom  $\Delta$ -9 desaturazo, s pomočjo katerega se v mlečni žlezi sintetizira KLK (Muller in Dellahoy, 2004). Prva dva koraka biohidrogenacije linolne kisline sta hitra, medtem ko je tretja

reakcija počasnejša in s tem omogoča akumulacijo vakcenske kisline (Bauman, 2002). Edinstvenost KLK v živalskih proizvodih prežvekovalcev se nanaša na nepopolno biohidrogenacijo prehranskih nenasičenih maščobnih kislin v predželodcih (slika 5).



Slika 5: Biohidrogenacija linolne kisline in endogena sinteza cis-9 trans-11 KLK v tkivu (prirejeno po: Bauman in sod., 1999)



### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 SUBSTRATI

V nalogi smo za substrate izbrali štiri vzorce voluminozne krme (sveža trava, seno, dobra in slaba silaža).

Sveža trava je bila pokošena 4. maja 2006 (1. košnja) in bila shranjena v vrečke. Do začetka analize smo jo shranili v zamrzovalniku na  $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nato smo jo liofilizirali in zmleli (velikost delcev je manjša od 1 mm).

Seno smo pripravili s sušenjem sveže trave. Sušili smo ga dva dni v sušilni omari pri temperaturi  $< 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Do začetka poskusa smo ga skladiščili pri sobni temperaturi (60 dni).

Silaži, ki smo ju uporabili v poskusu, smo pripravili sami. Zeleno maso smo silirali v 5 l plastične posode. Posodo smo zaprli s plastično folijo in pokrovom. Fermentacija je potekala pri sobni temperaturi. Prvo silažo smo pred siliranjem ovenili pri temperaturi  $< 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (12 ur) v sušilni omari. Drugo silažo smo pripravili s siliranjem sveže trave.

Z weendsko analizo (preglednica 2) smo v silazah določili vsebnost suhe snovi (SS), surovih beljakovin (SB), surovih maščobe (SM), surove vlaknine (SV), surovega pepela (SP) in brezdušičnega izvlečka (BDI).

S kemijsko analizo smo določili vsebnost hlapnih maščobnih kislin v silaži. Oceno silaže smo dobili s pomočjo novega DLG ključa (Weißbach in Honig, 1996). Prva silaža (iz ovenjene trave) je dosegla 75 točk, kar pomeni dobro silažo, medtem ko je druga (iz sveže trave) dosegla 45 točk, kar pomeni, da je silaža slaba.

V preglednici 2 je prikazana kemijska sestava dobre in slabe silaže.

Preglednica 2: Kemijska sestava uporabljenih substratov

	Dobra silaža	Slaba silaža
Suha snov (g/kg)	218,72	95,23
Surove beljakovine (g/kg SS)	177,12	161,64
Surove maščobe (g/kg SS)	54,07	68,78
Surove vlaknine (g/kg SS)	301,25	347,89
Surov pepel (g/kg SS)	127,51	138,31
Brezdušični pepel (g/kg SS)	340,05	283,38

## 3.2 IN VITRO FERMENTACIJA

*In vitro* fermentacijo substratov smo izvedli s hohenheimskim plinskim testom (Menke in Steingass, 1988).

### 3.2.1 Izvedba *in vitro* fermentacije

Dan pred začetkom plinskega testa smo pripravili ustrezno število osušenih čistih steklenih brizgalk ter jih oštevilčili. Fermentacijo smo izvedli v dveh ponovitvah. V brizgalke smo na analitski tehtnici zatehtali približno 175 mg substrata. Vsak substrat smo zatehtali v pet brizgalk. Brizgalke smo neprodušno zaprli in jih postavili v stojalo. Vse skupaj smo postavili v kad z destilirano vodo, segreto na  $39 \pm 0,5$  °C.

Pripravljen pufer je vseboval destilirano vodo, raztopine A, B in C (preglednica 3) in resazurin, indikator prisotnosti kisika (preglednica 4).

Na dan plinskega testa smo steklenico s pripravljenim pufrom namestili v vodno kopel, ki smo jo segreli na  $39 \pm 0,5$  °C. Pufer smo mešali z magnetnim mešalom in ga ves čas preprihovali s CO<sub>2</sub> pod pritiskom od 1,8 do 2,0 bara. Medtem smo v sušilni omari ogreli 500 ml merilni valj na temperaturo okoli 40 °C.

Dobro preprihanemu in ogretemu pufri smo dodali redukcijsko raztopino (preglednica 4) in sicer pet do deset minut pred dodajanjem vampovega soka. Modrikasta raztopina se je najprej obarvala rdeče (prisotnost kisika), potem pa se je razbarvala.

Preglednica 3: Sestava raztopin A, B in C

Raztopina A	Raztopina B	Raztopina C
13,2 g CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	35,0 g NaHCO <sub>3</sub>	5,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
10,0 g MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	4,0 g (NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub>	6,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,0 g CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	destilirana voda do 1000ml	0,6 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
0,8 g FeCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O		destilirana voda do 1000ml
destilirana voda do 100ml		

Preglednica 4: Sestava resazurina, redukcijske raztopine in končnega pufra

<b>Raztopina resazurina</b>	<b>Redukcijska raztopina</b>	<b>Pufer*</b>
100 mg resazurina	47,5ml destilirane vode	474 ml destilirane vode
destilirana voda do 100ml	2 ml 1 M NaOH	0,12 ml raztopine A
	285 mg Na <sub>2</sub> S x H <sub>2</sub> O	237 ml raztopine B
		237 ml raztopine C
		1,22 ml raztopine resazurina
		50,0 ml redukcijske raztopine

\* količina pufra zadošča za 50 ponovitev

Vampov sok smo dobili iz dveh fistuliranih kastriranih ovnov jezersko-solčavske pasme, dve uri po jutranjem krmljenju. Ovna sta bila krmljena s senom za pokrivanje potreb za vzdrževanje. Vampov sok smo, v predhodno ogreti (na 39 °C) in s CO<sub>2</sub> prepihani termos steklenici, prenesli v *in vitro* laboratorij. S tem smo poskušali zagotoviti čim bolj ugodne pogoje za vampne mikroorganizme (anaerobne pogoje).

Vampov sok smo filtrirali skozi štiri plasti gaze v predhodno ogret (40 °C) in prepihan 500 ml merilni valj. Potrebno količino prefiltriranega vampovega soka smo dodali v brezbarvno pufersko raztopino. Mešanico smo mešali in prepihovali s CO<sub>2</sub> še 15 minut pod pritiskom enega bara.

Ogrete brizgalke, z zatehtanim substratom (175 mg), smo napolnili s 30 ml mešanice vampovega soka in pufra. Pri vsaki polnitvi smo vsebino brizgalke premešali, iztisnili zrak, jo zaprli in postavili v vodno kopel ogreto na 39 °C. Poleg vzorcev smo v poskus vključili tudi slepe vzorce (brez substrata) in standardne vzorce. Prostornine nastalega plina smo odčitali po 2., 4., 6. in 8. uri inkubacije. V primeru da je prostornina plina v brizgalki narasla nad 80 ml, smo plin iztisnili, prostornino plina na novo odčitati in nadaljevali z inkubacijo.

Po določenem času inkubacije smo brizgalke vzeli iz kopeli ter jih postavili v mrzlo vodo, da smo zaustavili fermentacijo. Vsebinske brizgalke smo prelili na stehane in ustrezno označene plastične krožnike. Vzorce smo skupaj s krožniki shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C. Zamrznjene vzorce smo liofilizirali in jih shranili na -20 °C do analize maščobnokislinske sestave.

### 3.2.2 Določanje maščobnokislinske sestave s plinsko kromatografijo

Estrenje maščobnih kislin smo izvedli po postopku, ki sta ga razvila Park in Goins (1994) brez predhodne ekstrakcije maščob iz vzorca.

V epruvete z zamaškom smo zatehtali 0,2 g liofiliziranega substrata, dodali 300  $\mu$ l  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  in 3 ml sveže pripravljene 0,5 M NaOH v metanolu. Preden smo epruvete zaprli, smo jih prepihali z dušikom (inertna atmosfera, preprečimo oksidacijo iz zraka). Vsebino smo dobro premešali in segrevali 10 minut pri 90 °C v termičnem bloku. Po segrevanju smo epruvete na hitro ohladili pod tekočo mrzlo vodo in vanje dodali 3 ml 12 %  $\text{BF}_3$  v metanolu, prepihali z dušikom, zaprli in ponovno segrevali v termičnem bloku 10 minut pri 90 °C. Po končanem segrevanju smo epruvete ponovno ohladili na sobno temperaturo in vanje odpipetirali 3 ml deionizirane vode in 1,5 ml heksana. Metilne estre maščobnih kislin smo ekstrahirali v nepolarno topilo tako, da smo dobro zaprte epruvete stresali 1 minuto. Heksansko plast (vrhnja plast) smo od vodne faze ločili tako, da smo reakcijsko zmes centrifugirali 10 minut pri 2000 obratih na minuto.

S Pasteurjevo pipeto smo odvzeli zgornjo heksansko plast in jo prenesli v stekleničke. Stekleničke smo previdno prepihali z dušikom in jih do analize shranili v zamrzovalniku pri – 20 °C.

#### 3.2.2.1 Analitska oprema in pogoji analize

Maščobne kisline v vzorcu smo določili s plinsko kromatografijo. Uporabili smo plinski kromatograf Agilent 6890, opremljen z avtomatskim injektorjem in podajalnikom vzorcev ter FID detektorjem.

Za ločevanje metilnih estrov maščobnih kislin smo uporabili kapilarno kolono Omegawax 320 iz silike s kemijsko vezano (bonded) stacionarno fazo polietilenglikola, dolžine 30 m, notranjim premerom 0,32 mm in debelino filma stacionarne faze 0,25  $\mu$ m. V preglednici 5 sta navedena temperaturni program analize in pretok plinov.

Preglednica 5: Temperaturni pogoji in pretok plinov za kromatografijo

Temperaturni program		Pretoki plinov	
Začetna temperatura (°C)	185	Helij (nosilni plin) (ml/min)	1,5
Hitrost dviganja temperature (°C)	1	Dušik (make-up plin) (ml/min)	30
Končna temperatura (°C)	215	Vodik (gorilni plin) (ml/min)	30
Temperatura injektorja	250	Sintetični zrak (ml/min)	440
Temperatura detektorja (°C)	290	Čas analize (min)	54
		Volumen injiciranega vzorca (µl)	1
		Način injiciranja	split
		Split razmerje	30:1

### 3.2.2.2 Identificiranje kromatografskih vrhov

Posamezne metilne estre maščobnih kislin smo identificirali na osnovi retencijskih časov. Primerjali smo retencijske čase maščobnih kislin v vzorcu z retencijskimi časi maščobnih kislin v standardnih raztopinah posameznih maščobnih kislin.

### 3.2.3 Izračuni

Maščobnokislinsko sestavo substratov pred in po inkubaciji smo podali v masnih deležih, ki predstavljajo grame posamezne analizirane MK v 100 g vseh določenih MK (g/100 g MK) in v mg posamezne MK v 100 g vzorca (mg/100 g vzorca).

Delež biohidrogeniranih MK smo izračunali s pomočjo formule (Sinclair in sod., 2005):

$$\text{Biohidrogenacija (mg/mg MK)} = 1000 - 1000 \times \left( \frac{MK_{poBH}}{MK_{predBH}} \right) \quad \dots(1)$$

Podatke, ki smo jih dobili v poskusu, smo uredili s programom MS Excel. Prav tako smo v programu MS Excel pripravili tudi slike.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V poskusu nas je zanimalo, kako na biohidrogenacijo maščobnih kislin vplivata zrelost in način konzerviranja voluminozne krme. *In vitro* biohidrogenacijo smo opravili na svežem vzorcu krme in na konzerviranih vzorcih, kot sta seno in silaža. Zrelost trav in način konzerviranja vplivata na potek *in vitro* fermentacije, zato predvidevamo, da vplivata tudi na biohidrogeniranje maščobnih kislin. Z uporabo *in vitro* tehnike smo preverili sposobnost vampovih mikroorganizmov za biohidrogenacijo maščobnih kislin v voluminozni krmi.

### 4.1 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA VOLUMINOZNE KRME IN VZORCEV PO INKUBACIJI (BIOHIDROGENACIJI) V VAMPOVEM SOKU

V preglednici 6 so podani masni deleži NMK, ENMK in VNMK v maščobah substratov, pred in po inkubaciji v mešanici vampovega soka in pufra po posameznih urah inkubacije.

Preglednica 6: Masni deleži (%) NMK, ENMK, VNMK, n-3 VNMK, n-6 VNMK in razmerje med n-6/n-3 VNMK v maščobah substratov (0 h) in po inkubaciji (biohidrogenaciji) v *in vitro* poskusu po 2., 4., 6., 8. in 96 urah inkubacije

Substrat	Čas (h)	NMK	ENMK	VNMK	n-3	n-6	n-6 / n-3
<b>Trava</b>	0	22,82	4,24	72,95	54,27	18,68	0,34
	2	55,60	15,61	28,79	17,16	10,58	0,62
	4	60,89	20,23	18,88	9,31	8,88	0,95
	6	66,29	19,06	14,65	6,65	7,59	1,14
	8	75,91	14,79	9,30	3,96	5,26	1,33
	96	87,08	9,48	3,43	1,15	2,22	1,93
<b>Seno</b>	0	24,72	3,91	71,37	51,95	19,42	0,37
	2	55,19	14,02	30,78	18,02	11,45	0,64
	4	61,12	19,02	19,86	9,87	8,82	0,89
	6	63,49	19,61	16,90	8,39	7,64	0,91
	8	75,34	15,67	8,99	3,94	4,98	1,26
	96	86,80	9,90	3,30	1,32	1,98	1,50
<b>Dobra silaža</b>	0	21,42	3,28	75,30	56,06	19,25	0,34
	2	51,22	12,72	36,06	21,71	12,66	0,58
	4	55,47	19,28	25,25	13,40	9,84	0,73
	6	60,66	21,07	18,27	9,29	7,79	0,84
	8	75,43	16,03	8,54	3,89	4,55	1,17
	96	86,83	9,92	3,24	1,23	1,98	1,61
<b>Slaba silaža</b>	0	22,54	3,28	73,64	56,73	16,89	0,30
	2	51,03	12,49	36,48	22,88	12,16	0,53
	4	53,72	15,26	31,02	17,40	11,29	0,65
	6	56,69	18,04	25,27	13,38	9,36	0,72
	8	72,12	16,85	11,03	5,30	5,55	1,05
	96	86,36	9,12	4,52	1,41	3,11	2,21

Harfoot in Hazlewood (1988, cit. po Boufaïed in sod., 2003a) navajajo, da v voluminozni krmi prevladujejo večkrat nenasičene MK. Približno 51 % od vseh MK v voluminozni krmi naj bi bilo linolenske kisline (C18:3 n-3). Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi mi, saj so naši substrati voluminozne krme vsebovali največ VNMK, predvsem n-3 VNMK, katerih delež se je gibal med 51,95 % in 56,73 %, medtem ko je bil delež NMK in ENMK v voluminozni krmi manjši.

Nenasičene maščobne kisline, predvsem linolna in linolenska kislina, so občutljive na spremembe, ki se pojavijo med predelavo in skladiščenjem. Načini shranjevanja in konzerviranja krme lahko vplivajo na razpoložljivost MK (Chilliard in sod., 2001, cit. po Bernardini in sod., 2010), v primeru sušenja sena se med oksidacijo zmanjša vsebnost VNMK in povzroča ogromno izgubo C18:3 n-3 VNMK (Dewhurst in sod., 2002, cit. po Bernardini in sod., 2010). V našem primeru je seno pred inkubacijo vsebovalo manj večkrat nenasičenih MK kot drugi analizirani vzorci, npr. dobra (75,30 %) in slaba silaža (73,64 %), ki sta vsebovali največ VNMK.

Največji delež NMK pred inkubacijo smo zabeležili pri senu (24,72 %), najmanjšo pri dobri silaži (21,42 %). Po 96 urah inkubacije je trava vsebovala največji delež NMK (87,08 %), najmanjši delež pa slaba silaža (86,36 %). Pri vseh substratih se je delež NMK povečal zaradi biohidrogenacije nenasičenih MK.

Pred inkubacijo je bil delež ENMK v primerjavi z ostalimi skupinami MK v vseh substratih najmanjši in se je gibal med 3,28 % (dobra in slaba silaža) in 4,24 % (trava). Pri travi se je delež enkrat nenasičenih MK povečeval do 4. ure inkubacije (20,23 %) nato postopoma padal do končne vrednosti 9,48 %. Za razliko od trave, je bil delež enkrat nenasičenih MK pri senu, dobri in slabi silaži največji po šestih urah inkubacije. Slaba silaža je po 96 urah inkubacije vsebovala najmanjši delež enkrat nenasičenih MK (9,12 %).

Substrati so pred inkubacijo vsebovali, v primerjavi z drugimi MK, največji delež večkrat nenasičenih MK, katerih delež se je gibal med 71,37 % (seno) in 75,30 % (dobra silaža). Kot smo pričakovali, se je delež večkrat nenasičenih MK, zaradi biohidrogenacije, tekom inkubacije postopoma zmanjševal. Najmanjši delež VNMK (3,24 %) v inkubiranih vzorcih smo zabeležili pri dobri silaži po 96 urah inkubacije. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi

drugi raziskovalci (Jenkins in sod., 2008; Bauman in sod., 2003; Bauman in sod., 1999; Harfoot in Hazlewood, 1997), ki pravijo, da se zaradi biohidrogenacije linolne in linolenske kisline delež večkrat nenasičenih MK zmanjša.

Pred inkubacijo se je delež n-3 VNMK gibal med 51,95 % (seno) in 56,73 % (slaba silaža). Pri vseh substratih se je delež n-3 VNMK začel zmanjševati že po dveh urah inkubacije. Največji padec deleža n-3 VNMK zabeležimo pri travi in senu, saj se vrednost po 2. uri inkubacije trikratno zmanjša. Po 96 urah inkubacije je v substratih le še med 1,15 % (trava) in 1,41 % (slaba silaža) n-3 VNMK.

V času pred inkubacijo, opazimo pri n-6 VNMK ravno obratno dogajanje, kot pri deležu n-3 VNMK, kjer vsebuje seno (19,42 %) največji in slaba silaža (16,89 %) najmanjši delež n-6 VNMK. Tekom inkubacije se delež n-6 VNMK postopoma znižuje, in po 96 urah inkubacije zabeležimo končno vrednost med 1,98 % (seno in dobra silaža) in 3,11 % (slaba silaža).

Razmerja n-6/n-3 VNMK v voluminozni krmi pred inkubacijo so se gibala med 0,30 in 0,37:1. Med inkubacijo so se razmerja pri vseh substratih povečevala. Pri travi opazimo, da se je razmerje med inkubacijo povišalo za 5,5 krat (iz 0,34:1 na 1,93:1), pri slabi silaži pa za 7,4 krat (iz 0,30 na 2,21:1). Iz naraščajočega razmerja je razvidno, da so se n-3 VNMK biohidrogenirale hitreje od n-6 VNMK.



#### 4.2 NASIČENE MAŠČOBNE KISLINE

V preglednici 7 prikazujemo masne deleže posameznih NMK v maščobah substratov in po inkubaciji v *in vitro* poskusu po različnih časih inkubacije.

Preglednica 7: Masni deleži (%) NMK: lavrinske (C12:0), miristinske (C14:0), palmitinske (C16:0) in stearinske kisline (C18:0) v maščobah substratov (0 h) in po inkubaciji (biohidrogenaciji) v *in vitro* poskusu po 2., 4., 6., 8. in 96 urah inkubacije

Substrat	Čas (h)	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0
Trava	0	0,28	0,54	15,97	1,32
	2	0,65	2,22	20,47	19,87
	4	0,69	2,45	19,71	25,72
	6	0,67	2,64	19,15	31,22
	8	0,84	2,75	18,90	38,62
	96	0,83	3,76	22,37	44,79
Seno	0	0,37	0,83	16,58	1,63
	2	0,67	2,53	21,01	18,08
	4	0,71	2,62	20,50	23,63
	6	0,70	2,75	20,06	26,43
	8	0,89	3,02	18,99	36,47
	96	0,88	3,89	23,00	43,04
Dobra silaža	0	0,33	0,75	14,50	1,39
	2	0,59	2,10	19,91	17,50
	4	0,59	2,26	19,52	22,01
	6	0,55	2,37	19,15	26,61
	8	0,72	2,65	18,60	39,56
	96	0,73	3,35	21,54	45,75
Slaba silaža	0	0,35	0,61	15,54	1,45
	2	0,56	2,12	20,38	16,57
	4	0,59	2,26	20,97	19,23
	6	0,56	2,23	20,22	21,74
	8	0,75	2,61	19,06	34,46
	96	0,73	3,24	21,49	46,23

Nekateri avtorji (McDonald in sod., 1988, cit. po Boufaïed in sod., 2003a) so zapisali, da vsebuje voluminozna krma izmed NMK največ palmitinske kisline (C16:0). Tudi v našem primeru zabeležimo med opazovanimi NMK največ palmitinske kisline v razponu med 14,50 % (dobra silaža) in 16,58 % (seno).

Pred inkubacijo je seno vsebovalo največji delež vseh opazovanih nasičenih MK, C12:0 (0,37 %), C14:0 (0,83 %), C16:0 (16,58 %) in C18:0 (1,63 %). Prav tako, je po 96 urah inkubacije seno vsebovalo največji delež C12:0 (0,88 %), C14:0 (3,89 %) in C16:0 (23,00 %), slaba silaža pa največji delež C18:0 (46,23 %).

Pred inkubacijo se je delež C12:0 NMK gibal med 0,28 % (trava) in 0,37 % (seno). Tekom inkubacije se je delež C12:0 NMK pri vseh substratih povečeval. Ravno tako se je pri vseh

substratih tekom inkubacije povečeval tudi delež C14:0 NMK. Delež miristinske kisline (C14:0) naše trave (0,54 %) je primerljiv z deležem miristinske kisline (C14:0) trave Baumana in sod. (2003) (1 %).

Delež palmitinske kisline v travi (15,97 %) iz naše raziskave je primerljiv z deležem, ki ga navajajo Bauman in sod. (2003) (16 %). Nekoliko večji delež palmitinske kisline v senu, v primerjavi z našim (16,58 %) je opaziti v raziskavi Ribeiro in sod. (2005) (30,9 %). Pri travi, senu in dobri silaži se je delež C16:0 nasičene MK nekoliko povečeval po dveh urah, pri slabi silaži pa po štirih urah inkubacije, nato je do 8. ure počasi padal in se po 96 urah delež ponovno povečal in dosegel vrednost med 21,49 % (slaba silaža) in 23,00 % (seno).

Stearinska kislina je končni produkt biohidrogenacije linolne in linolenske kisline (slika 4). Delež stearinske kisline se je med inkubacijo vseh substratov pričakovano močno povečal.

Ribeiro in sod. (2005) so pri travi zabeležili 3,40 % stearinske kisline, v našem primeru pa je trava vsebovala manjši delež te kisline 1,32 % in je primerljiva z deležem, ki ga navaja Bauman in sod. (2003) (2 %). Začetni delež C18:0 v voluminozni krmi je bil precej majhen, od 1,32 % (trava) do 1,63 % (seno). Največje povečanje deleža stearinske kisline smo opazili pri vseh substratih v prvih 2 urah inkubacije. Med drugo in 96 uro inkubacije se je delež C18:0 povečal do največ 46,23 % pri slabi silaži, najmanj (43,04 %) pa smo zabeležili pri senu.

#### 4.3 ENKRAT NENASIČENE MAŠČOBNE KISLINE

V preglednici 8 prikazujemo masne deleže posameznih ENMK in vsote izomer C18:1 v maščobah substratov in po različnih časih inkubacije.

Preglednica 8: Masni deleži (%) ENMK: C12:1, C14:1, C16:1 in vsota izomer C18:1 v maščobah substratov (0 h) in po inkubaciji (biohidrogenaciji) v *in vitro* poskusu po 2., 4., 6., 8. in 96 urah inkubacije

Substrat	Čas (h)	C 12:1	C 14:1	C 16:1	C 18:1*
Trava	0	< 0,01	< 0,01	0,25	3,52
	2	0,11	0,28	0,38	12,84
	4	0,12	0,29	0,34	17,68
	6	< 0,01	0,35	0,32	16,93
	8	0,14	0,26	0,29	11,73
	96	0,17	0,34	0,12	6,96
Seno	0	< 0,01	< 0,01	0,15	3,36
	2	0,13	0,27	0,36	11,17
	4	0,12	0,28	0,36	16,37
	6	< 0,01	0,35	0,35	17,20
	8	0,16	0,18	0,29	12,62
	96	0,19	0,38	0,20	7,18
Dobra silaža	0	< 0,01	< 0,01	0,15	2,79
	2	0,11	0,25	0,33	10,56
	4	0,10	0,40	0,32	16,57
	6	0,10	0,32	0,31	18,24
	8	0,15	0,16	< 0,01	13,85
	96	0,18	0,27	0,12	7,99
Slaba silaža	0	< 0,01	< 0,01	0,17	3,26
	2	0,11	0,22	0,33	10,04
	4	0,11	0,26	0,32	13,11
	6	0,05	0,32	0,32	15,37
	8	0,14	0,19	0,29	14,25
	96	0,17	0,43	0,17	5,99

\* vsota izomer (cis in trans) C18:1

Kot vidimo, so vsi substrati pred inkubacijo vsebovali manj kot 0,01 % C12:1 in C14:1 ENMK. Med inkubacijo substratov v mešanici vampovega soka in pufra je delež C12:1 sicer naraščal, vendar tudi po 96 urah inkubacije ni dosegel več kot 0,2 %.

Tudi pri vsebnosti C14:1 je bilo le malo sprememb in po 96 urah inkubacije je bil delež C14:1 med 0,27 % (dobra silaža) in 0,43 % (slaba silaža).

Začetni delež C16:1 se je gibali med 0,15 % (seno in dobra silaža) in 0,25 % (trava). Tekom inkubacije ni bilo zaznati posebnosti, po 96 urah inkubacije je bil delež podoben deležu pred inkubacijo, od 0,12 % (trava in dobra silaža) do 0,20 % (seno).

Izomere C18:1 so vmesni produkti biohidrogenacije VNMK (Boufaïed in sod., 2003a).

Pred inkubacijo so naši vzorci vsebovali od 2,79 % (dobra silaža) do 3,52 % (trava) izomer C18:1. Tekom inkubacije se je delež izomer C18:1 pri vseh substratih povečeval in nekje med 4. in 6. uro inkubacije je dosegel največji delež. Največ kopičenja izomer C18:1 smo opazili pri travi (17,68 %) v prvih štirih urah inkubacije ter pri dobri silaži (18,24 %) pri šestih urah inkubacije. Med 8. in 96 urami inkubacije je prišlo do zmanjšanja deleža izomer C18:1, saj je po inkubaciji bil delež C18:1 med 5,99 % (slaba silaža) in 7,99 % (dobra silaža).

#### 4.4 VEČKRAT NENASIČENE MAŠČOBNE KISLINE

Prehrana prežvekovalcev temelji na voluminozni krmi, ki vsebuje precej linolne in linolenske kisline. Obe kislini sta glavna substrata za mikrobnio biohidrogenacijo. Izomeri cis-9 trans-11 KLK in trans-10 cis-12 KLK sta vmesna produkta biohidrogenacije VNMK.

V preglednici 9 prikazujemo masne deleže linolne in linolenske kisline ter vmesna produkta biohidrogenacije, izomeri cis-9 trans-11 in trans-10 cis-12 KLK.

Preglednica 9: Masni deleži (%) VNMK: linolne (C18:2 n-6), linolenske (C18:3 n-3), KLK (cis-9 trans-11) in KLK (trans-10 cis-12) v maščobah substratov (0 h) in po inkubaciji (biohidrogenaciji) *in vitro* poskusu po 2., 4., 6., 8. in 96 urah inkubacije

Substrat	Čas (h)	C18:2 n-6	C18:3 n-3	cis-9 trans-11 KLK	trans-10 cis-12 KLK
<b>Trava</b>	0	18,29	54,03	< 0,01	< 0,01
	2	9,81	17,11	0,60	0,45
	4	8,00	9,23	0,20	0,49
	6	6,94	6,59	0,13	0,28
	8	4,65	3,88	0,08	< 0,01
	96	1,54	1,10	0,05	< 0,01
<b>Seno</b>	0	19,18	51,64	< 0,01	< 0,01
	2	10,47	17,97	0,82	0,50
	4	8,05	9,77	0,41	0,76
	6	7,11	8,26	0,27	0,61
	8	4,43	3,87	0,08	< 0,01
	96	1,36	1,24	< 0,01	< 0,01
<b>Dobra silaža</b>	0	18,83	55,75	< 0,01	< 0,01
	2	11,49	21,58	1,06	0,63
	4	8,77	13,28	0,72	1,29
	6	7,05	9,07	0,36	0,83
	8	4,11	3,83	0,09	< 0,01
	96	1,42	1,17	0,04	< 0,01
<b>Slaba silaža</b>	0	16,51	56,46	0,02	< 0,01
	2	10,91	22,64	0,76	0,68
	4	9,91	17,01	0,91	1,42
	6	8,39	13,02	0,65	1,62
	8	4,34	5,11	0,18	< 0,01
	96	1,22	1,30	< 0,01	< 0,01

Hawke (1973, cit. po Boufaïed in sod., 2003a) in McDonald in sod. (1988, cit. po Boufaïed in sod., 2003a) navajajo, da je delež linolenske kisline v sveži travi v razponu med 50 in 75 % od skupnih MK. Buccioni in sod. (2008) poročajo o tem, da vsebuje sveža trava od 1 do 3 % MK in približno 55 do 65 % od skupnih MK predstavlja linolenska kislina. Tudi v našem primeru je bil delež linolenske kisline v travi v tem razponu, zabeležili smo 54,03 %.

Že v prvih dveh urah smo opazili pričakovane spremembe v vsebnosti MK s časom inkubacije, zmanjšanje deleža linolenske in linolne kisline kot posledica biohidrogenacije. Najhitreje se je biohidrogenirala linolenska kislina.

Buccioni in sod. (2006) navajajo, da se je najpomembnejši del biohidrogenacije pojavil v prvih 24. urah.

Ribeiro in sod. (2005) navajajo delež linolne kisline v travi (17,0 %) in v senu (19,7 %). Naš delež je bil primerljiv in znaša za travo 18,29 % in za seno 19,18 %. V voluminozni krmi, ki smo jo vključili v *in vitro* poskus, se je delež linolne kisline gibal med 16,51 % (slaba silaža) in 19,18 % (seno). S časom inkubacije se je delež linolne kisline pri vseh substratih zmanjševal in po 96 urah dosegel vrednost med 1,22 % (slaba silaža) in 1,54 % (trava).

V primeru linolenske kisline, sta trava (54,03 %) in seno (51,64 %) v naši raziskavi vsebovala več te kisline kot v raziskavi Ribeiro in sod. (2005), ki navajajo, da je delež pri travi znašal 48,6 % pri senu pa 24,1 %. Največji delež linolenske kisline v voluminozni krmi (substratih), ki smo jo vključili v poskus, smo ugotovili pri slabi silaži (56,46 %), najmanjšega pa pri senu (51,64 %). Chalupa in sod. (2002) navajajo, da vsebuje krma veliko linolenske kisline, vendar se je le malo absorbira zaradi hitre biohidrogenacije v predželodcih. Tudi mi smo opazili, da je potek biohidrogenacije linolenske kisline hiter, saj se je tekom inkubacije delež C18:3 n-3 pri vseh substratih najbolj zmanjšal že v prvih dveh urah inkubacije. Pri inkubaciji silaže smo opazili nekoliko počasnejše zmanjševanje deleža C18:3 n-3 kot pri travi in senu. Po 96 urah inkubacije je v substratih ostalo le še od 1,10 % (trava) do 1,30 % (slaba silaža) C18:3 n-3 VNMK.

Chilliard in sod. (2001, cit. po Buccioni, 2008) poročajo, da ni razlik v sintezi KKL med različnimi vrstami trav, ampak je spremembe mogoče opaziti zaradi sezonske

razpoložljivosti ali zrelosti trav in v maščobno kislinski sestavi svežih krmnih rastlin, zlasti vsebnosti linolenske kisline.

Vidimo, da je bila vsebnost cis-9 trans-11 in trans-10 cis-12 KLK, pred inkubacijo, pri vseh substratih manjša od 0,01 % (pod mejo zaznavnosti metode, s katero smo kisline določali). Prva faza biohidrogenacije linolne kisline je izomerizacija C18:2 n-6 do cis-9 trans-11 KLK, katere delež se je v prvih dveh urah inkubacije povečal na račun zmanjšanja deleža linolne in linolenske kisline zaradi njune intenzivne biohidrogenacije. Največji delež cis-9, trans-11 izomere KLK pri travi (0,60 %), senu (0,82 %) in dobri silaži (1,06 %) smo določili v vzorcih, ki smo jih inkubirali 2 uri, medtem ko je bil pri slabi silaži (0,91 %) delež cis-9 trans-11 KLK v vzorcih največji po štirih urah inkubacije. Po 96 urah inkubacije je bil delež cis-9 trans-11 KLK pri senu in slabi silaži manj kot 0,01 %, medtem ko je bil delež pri travi in dobri silaži nekoliko višji, 0,05 % in 0,04 %.

Po dveh urah inkubacije je pri vseh substratih prišlo do akumulacije izomere trans-10 cis-12 KLK. Pri travi, senu in dobri silaži je dosegla ta izomera največji delež po štirih urah inkubacije, pri slabi silaži smo opazili največji delež (1,62 %) trans-10 cis-12 KLK po šestih urah inkubacije. Po osmih urah inkubacije je v vseh substratih ostalo manj kot 0,01 % trans-10 cis-12 KLK.

#### 4.5 PRODUKTI BIOHIDROGENACIJE

Glavna substrata biohidrogenacije sta linolna in linolenska kislina. Ključni intermediati biohidrogenacije so cis-9 trans-10 KLK, trans-10 cis-12 KLK in vakcenska kislina (trans-11 C18:1). Cis-9 trans-11 KLK je le prehodni intermediat, medtem ko se vakcenska kislina v predželodcih akumulira. Trans C18:1 MK je vmesni proizvod biohidrogenacije tako linolne kot linolenske kisline, medtem ko je cis C18:1 MK vmesni proizvod biohidrogenacije linolenske kisline. Stearinska kislina (C18:0) je NMK in je končni produkt biohidrogenacije.

Preglednica 10: Vsebnosti linolenske in linolne MK in produktov biohidrogenacije (mg/100g SS vzorca) v substratih in vzorcih med inkubacijo

Substrat	Čas (h)	C18:3 n-3	C18:2 n-6	c9 t11 KLK	t10 c12 KLK	C18:1 cis	C18:1 trans	C18:0
<b>Trava</b>	0	1331,92	450,74	< 1,00	< 1,00	86,66	< 1,00	32,42
	2	241,07	138,22	8,47	6,36	95,8	85,0	279,95
	4	135,07	117,06	2,99	7,13	122,2	136,6	376,38
	6	104,60	110,18	2,04	4,52	128,7	140,2	495,80
	8	73,61	87,34	1,49	< 1,00	118,6	103,0	725,99
	96	25,76	36,28	1,60	< 1,00	76,5	91,6	1115,28
<b>Seno</b>	0	1102,70	409,59	< 1,00	< 1,00	71,82	< 1,00	34,86
	2	253,78	147,99	11,62	7,03	83,8	74,2	255,75
	4	142,75	117,52	5,92	11,17	104,6	134,5	345,15
	6	127,90	110,09	4,21	9,41	113,0	153,3	409,34
	8	66,92	76,09	1,28	< 1,00	97,8	119,6	624,06
	96	27,28	30,36	1,05	< 1,00	54,8	107,3	962,15
<b>Dobra silaža</b>	0	1746,16	589,68	< 1,00	< 1,00	87,41	< 1,00	43,43
	2	372,83	198,54	18,30	10,88	102,5	79,9	302,41
	4	235,70	155,64	12,78	22,88	127,1	167,0	390,49
	6	162,98	126,77	6,49	14,98	141,6	186,4	478,50
	8	74,48	80,52	1,94	< 1,00	122,0	146,8	755,09
	96	30,21	36,76	2,58	< 1,00	77,4	131,3	1179,50
<b>Slaba silaža</b>	0	1557,17	455,41	< 1,00	< 1,00	89,86	< 1,00	40,05
	2	401,22	193,29	13,42	12,02	106,0	71,6	293,14
	4	287,57	167,55	15,33	24,07	112,9	108,6	324,66
	6	236,57	152,47	11,81	29,43	128,7	150,5	394,78
	8	102,52	86,37	3,96	< 1,00	113,9	166,9	656,59
	96	31,87	29,38	< 1,00	< 1,00	62,2	81,3	1115,28

Vakcenska kislina (trans11-18:1) in konjugirane linolne kisline (KLK), predvsem cis-9, trans-11 in trans-10, cis-12 v mesu in mleku, so primeri intermediatov biohidrogenacije, ki imajo lahko koristni vpliv na zdravje ljudi (Loor in sod., 2004).

Vsebnosti linolne (C18:2 n-6) in linolenske kisline (C18:3 n-3) sta se s časom inkubacije stalno in močno zmanjševali. Pri travi, senu in dobri silaži je bila biohidrogenacija linolne

kislina manjša v primerjavi z linolensko. Boufaïed in sod., (2003b) poročajo o večji biohidrogenaciji C18:2 n-6 in C18:3 n-3 pri sveži travi v primerjavi s senom.

Druga faza vavnne BH linolne kisline je hidrogenacija cis-9 trans-11 izomere do vakcenske kisline (trans-11 C18:1). Buccioni in sod. (2006) so zapisali, da se po 24. urah inkubacije vsebnost cis-9, trans-11 KKK zmanjšuje, medtem ko se vsebnost trans-11 C18:1 MK ves čas povečuje. Tudi v našem primeru smo opazili, kljub drugačnemu trajanju inkubacije, da se je vrednost cis-9, trans-11 KKK po dveh urah inkubacije zmanjševala, medtem ko se je vsebnost trans-11 C18:1 po dveh urah inkubacije povečevala.

Tudi Martin in Jenkins (2002) sta pokazala, da se koncentracija trans-11 C18:1 sčasoma poveča. Rezultati različnih študij (Griinari in sod., 2000, cit. po Bauman in Griinari, 2003; Corl in sod., 2000, cit. po Bauman in Griinari, 2003; Lock in Garnsworthy, 2002, cit. po Bauman in Griinari, 2003) so pokazali, da endogena sinteza preko  $\Delta 9$ -desaturaze predstavlja prevladujoči vir cis-9, trans-11 KKK v mlečni maščobi. V primeru paše, endogena sinteza cis-9, trans-11 KKK v mlečni žlezi predstavlja več kot 90 % skupne vsebnosti maščob te izomere KKK (Kay in sod., 2002, cit. po Bauman in Griinari, 2003). Harfoot in Hazlewood (1988, cit. po Kay in sod., 2004) in Griinari in Bauman (1999, cit. po Kay in sod., 2004) navajajo, da imajo maščobe v paši veliko vsebnost linolenske kisline, a biohidrogenacija linolenske kisline poteka preko cis-9 trans-11 KKK kot vmesnega produkta. S tem se strinjamo, saj smo tudi sami ugotovili, da je voluminozna krma vsebovala velik delež VNKK, predvsem linolenske kisline.

Koncentracija trans-10, cis-12 KKK je bila med drugo in šesto uro inkubacije pri travi in senu nižja, kot pri dobri in slabi silaži. Največjo vsebnost smo po šestih urah inkubacije zabeležili pri slabi silaži (29,43 mg/100g SS vzorca). Po šesti uri inkubacije je vrednost trans-10, cis-12 KKK v vseh substratih padla pod mejo detekcije (<1,00 mg/100g SS vzorca).

Številni raziskovalci poročajo, da je vsebnost KKK več v mleku pašnih živali, kot pri živalih, ki so krmljene z močnimi krmili (Jahreis in sod., 1997, cit. po Ribeiro in sod., 2005; Kelly in sod., 1998, cit. po Ribeiro in sod., 2005; Dhiman in sod., 1999, cit. po Ribeiro in sod., 2005; French in sod., 2000, cit. po Ribeiro in sod., 2005). Večja koncentracija KKK v



mlečni maščobi živali na paši je lahko posledica velike koncentracije oktadekatrienojske kisline (C18:3) v sveži krmi (Lee in sod., 2003, cit. po Ribeiro in sod., 2005) ali večji koncentraciji topnih sladkorjev v sveži rastlini v primerjavi z konzervirano voluminozno krmo (Kelly in sod., 1998, cit. po Ribeiro in sod., 2005).

Mosley in sod. (2002) omenjajo, da je oleinska kislina (cis C18:1) prav tako značilna kislina v krmi prežvekovalcev. Pred inkubacijo se je vsebnost cis C18:1 MK gibala med 71,82 mg/100g SS vzorca (seno) in 89,86 mg/100g SS vzorca (slaba silaža). Pri vseh substratih se je koncentracija tekom inkubacije povečevala in dosegla največjo vsebnost po šestih urah inkubacije. Največjo koncentracijo smo ugotovili pri slabi silaži (141,6 mg/100g SS vzorca).

Chalupa in sod. (2002) navajajo, da vsebuje krma le malo trans C18:1 MK, ki pa se, zaradi biohidrogenacije linolne in linolenske kisline ter nepopolne biohidrogenacije trans C18:1 do C18:0, lahko akumulira v predželodcih. Z njihovimi ugotovitvami se strinjamo, saj so vsi naši substrati pred inkubacijo vsebovali manj kot 1,00 mg trans nenasičenih izomer oktadecenojske kisline v 100 g SS vzorca. Vакcenska kislina (trans C18:1) se je med šesto in osmo uro inkubacije pri vseh substratih povečevala, kar kaže na to, da je ta (drugi) korak biohidrogenacije do stearinske kisline počasnejši, zaradi česar se vакcenska kislina (trans C18:1) akumulira.

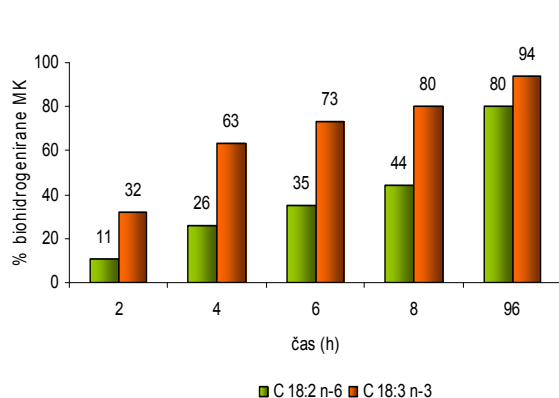
Končna faza biohidrogenacije, tako linolne kot linolenske kisline, pripelje do stearinske kisline (C:18:0) (Bauman in sod., 1999; Harfoot in Hazlewood, 1997) katere vsebnost se je neprestano in občutno povečevala tudi v našem primeru (preglednica 11).

Vsebnost C18:0 MK, ki je končni produkt biohidrogenacije, se je med inkubacijo pri vseh substratih ves čas povečevala. Največja koncentracija stearinske kisline (C18:0), se je v zadnji fazi biohidrogenacije oblikovala pri dobri silaži (1179,59 mg/100g SS vzorca), najmanj pri senu (926,15 mg/100g SS vzorca).

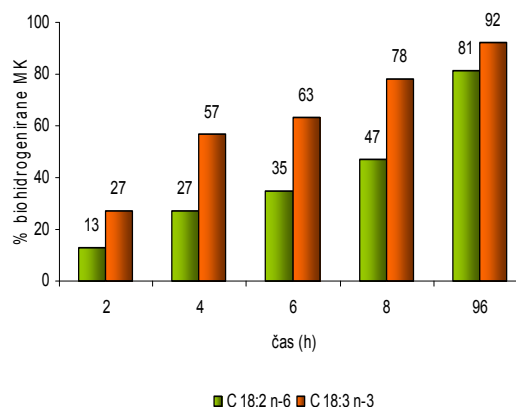
Ob predpostavki, da pride do pomembnih sprememb v biohidrogenaciji v času med 12. in 48. uro inkubacije, bi bilo smiselno, da bi v raziskavo vključili tudi takšno trajanje.

#### 4.6 DELEŽI BIOHIDROGENIRANE LINOLNE IN LIOLENSKE KISLINE V *IN VITRO* POSKUSU PRI RAZLIČNIH SUBSTRATIH IN TRAJANJU

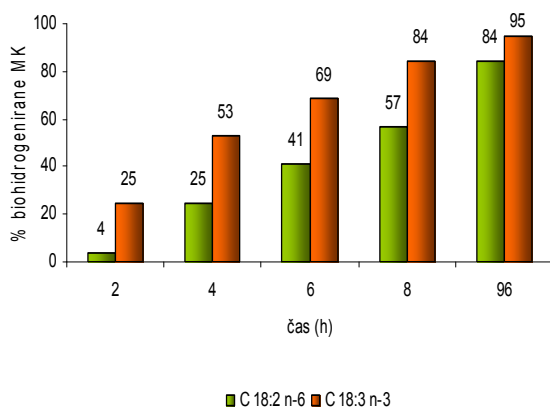
Na slikah 6 do 9 prikazujemo deleže *in vitro* biohidrogenirane linolne in linolenske kisline v travi, senu, dobri in slabi silaži po različnih časih inkubacije.



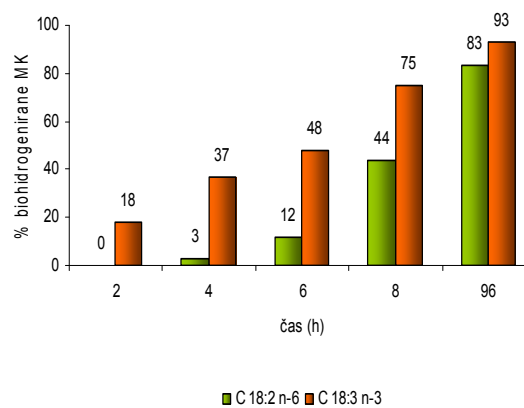
Slika 6: Delež biohidrogenirane linolne (C18:2 n-6) in linolenske kisline (C18:3 n-3) v travi



Slika 7: Delež biohidrogenirane linolne (C18:2 n-6) in linolenske kisline (C18:3 n-3) v senu



Slika 8: Delež biohidrogenirane linolne (C18:2 n-6) in linolenske kisline (C18:3 n-3) v dobri silaži



Slika 9: Delež biohidrogenirane linolne (C18:2 n-6) in linolenske kisline (C18:3 n-3) v slabi silaži

Prevladujoči MK v krmi sta linolna in linolenska kislina (preglednica 11). Bauman in sod. (2003) navajajo, da je biohidrogenacija MK običajno hitrejša z naraščajočo nenasičenostjo. Nekateri avtorji (Bauman in sod., 2003; Fellner in sod., 1995; Buccioni in sod., 2006) ocenjujejo, da je obseg biohidrogenacije linolne in linolenske kisline pri prežvekovalcih

odvisen od njune vsebnosti v krmilih. Iz slik 6, 7, 8 in 9 je razvidno, da je pri vseh substratih biohidrogenacija linolenske kisline (C18:3 n-3) hitrejša od linolne kisline (C18:2 n-6).

Delež biohidrogenirane linolne kisline (C18:2 n-6), je bil v travi in senu pri različnem trajanju inkubacije zelo podoben. Med njima ni bilo bistvenih razlik. Po 6. uri inkubacije je bil delež biohidrogenirane linolne kisline v travi in senu celo enak, 35 %. Do 6. ure inkubacije je bil potek biohidrogenacije linolenske kisline (C18:3 n-3) v travi hitrejši kot v senu, kasneje pa so bile razlike minimalne.

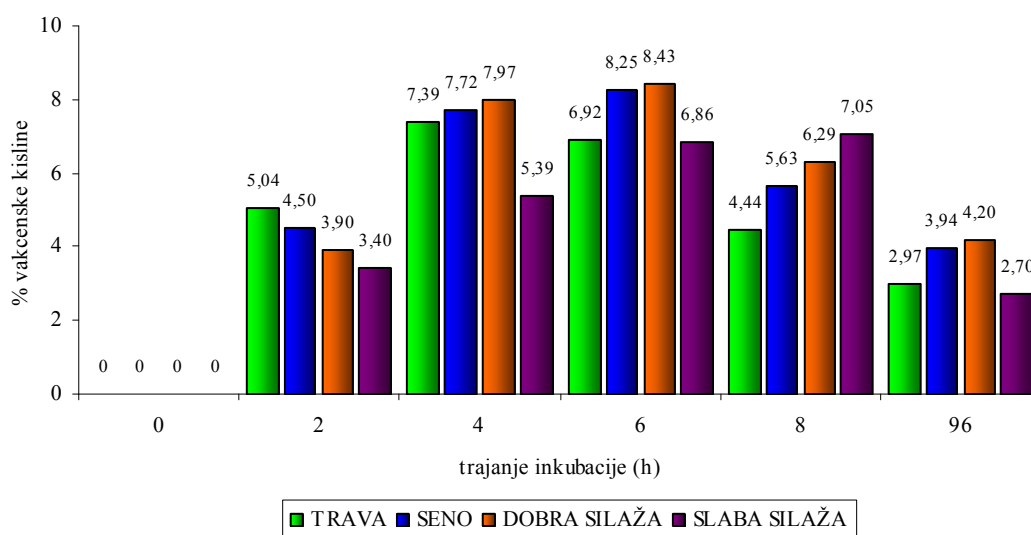
Tako pri dobri kot pri slabi silaži je bila med 2. in 8. uro inkubacije biohidrogenacija linolne in linolenske kisline počasnejša, kot pri travi in senu. V dobri silaži se je v prvih dveh urah biohidrogeniralo le 4 % linolne kisline. S podaljševanjem trajanja inkubacijskega časa se je delež biohidrogenirane linolne kisline povečeval in po 96 urah inkubacije se je biohidrogeniralo 84 % linolne kisline. Delež biohidrogenirane linolenske kisline pri dobri silaži se je tekom inkubacije linearno povečeval. Pri slabi silaži se je biohidrogenacija linolne kisline v večjem obsegu začela šele po štirih urah inkubacije, saj se je do takrat biohidrogeniralo le 3 % linolne kisline.

V prvih dveh urah inkubacije se je biohidrogeniralo največ linolne kisline v senu (13 %), najmanj v slabi silaži (0 %). Največji delež biohidrogenirane linolenske kisline v prvih dveh urah smo opazili v travi (32 %), najmanjši pa v slabi silaži (18 %).

Chilliard in Ferlay (2004) ocenjujeta, da se v vampu biohidrogenira v povprečju 80 % linolne (C18:2 n-6) in 92 % linolenske kisline (C18:3 n-3) ter, da je biohidrogenacija odvisna predvsem od deleža koncentratov v obroku. Bauman in sod. (2003) pa navajajo nekoliko večji delež biohidrogenacije linolne in linolenske kisline, od 70 do 95 % za linolno in od 85 do 100 % za linolensko kislino. V našem primeru smo ugotovili, da se je po 96 urah inkubacije biohidrogeniralo od 80 % (trava) do 84 % (dobra silaža) linolne kisline (C18:2 n-6) in od 92 % (seno) do 95 % (dobra silaža) linolenske kisline (C18:3 n-3).

#### 4.7 VAKCENSKA KISLINA

Vakcenska kislina (trans-11 C18:1) je prevladujoča *trans* maščobna kislina v mlečni maščobi prežvekovalcev (Turpeinen in sod., 2002) in običajno prevladujoča *trans* izomera, ki jo najdemo v predželodcih (Harfoot 1981, cit. po Boufaïed in sod., 2003b; Kemp in Lander 1984, cit. po Boufaïed in sod., 2003b) in predstavlja najmanj 80 % vseh *trans* C18:1 MK v predželodcih (Demeyer in Doreau 1999, cit. po Boufaïed in sod., 2003b). Je vmesni produkt biohidrogenacije večkrat nenasičenih MK v predželodcih, tako linolenske kot linolne kisline (slika 4). Deluje kot substrat za nastanek cis-9, trans-11 KLK v živalskih tkivih (Griinari in sod., 2000, cit. po Jenkins in sod., 2008). V predželodcih se reducira, pri čemer nastane stearinska kislina (Griinari in Bauman 1999, cit. po Mosley in sod., 2002).



Slika 10: Delež vakcenske kisline (trans-11 C18:1) v voluminozni krmi (substratih) in različnem trajanju *in vitro* inkubacije voluminozne krme (trave, sena, dobre in slabe silaže) v mešanici vampovega soka in pufra

Kadar je biohidrogenacija v predželodcih nepopolna, se del KKL in vakcenske kisline lahko izogne biohidrogenaciji in se pojavi v živalskih tkivih. Sinteza KKL lahko poteka tudi iz vakcenske kisline v tkivih, preko reakcije z  $\Delta^9$ -desaturazo (Griinari in sod., 2000, cit. po Banni in sod., 2001) (slika 5). Vsebnosti maščobnih kislin se lahko močno povečajo v mleku in mlečnih izdelkih, če krave krmimo z rastlinskimi olji, ki vsebujejo veliko linolenske kisline (Kelly in sod., 1998, cit. po Banni in sod., 2001). Krma vsebuje le malo vakcenske kisline, vendar se le ta zaradi biohidrogenacije linolenske in linolne kisline ter

nepopolne biohidrogenacije vakcenske do stearinske kisline, akumulira v predželodcih (Chalupa in sod., 2002).

Kot je razvidno iz slike 10, substrati pred inkubacijo niso vsebovali vakcenske kisline. Ta se je začela akumulirati že v prvih dveh urah inkubacije. Največji delež smo zabeležili v travi (5,04 %) najmanjši pa pri slabi silaži (3,40 %).

Največ vakcenske kisline se je ob inkubaciji v travi akumuliralo po štirih urah inkubacije, in sicer 7,39 % nato pa se je delež postopoma zmanjševal in po 96 urah inkubacije smo zabeležili le še 2,97 % vakcenske kisline. Po šestih urah inkubacije se je akumuliralo največ vakcenske kisline v senu (8,25 %) in dobri silaži (8,43 %). V slabi silaži se je delež vakcenske kisline najbolj povečal po osmih urah inkubacije ko je dosegel 7,05 %. Po 96 urah inkubacije se je delež vakcenske kisline v vseh inkubiranih vzorcih zmanjšal, ter dosegel vrednost med 4,20 % (dobra silaža) in 2,70 % (slaba silaža).

## 5 SKLEPI

- Voluminozna krma vsebuje predvsem VNMK, med katerimi prevladujejo n-3 VNMK (51,95 % in 56,73 %).
- Izmed NMK je voluminozna krma vsebovala največ palmitinske kisline (C16:0) (od 14,50 % do 16,58 %).
- Pri inkubaciji vseh vrst voluminozne krme v vampovem soku, se je po 96 urah inkubacije delež NMK povečal zaradi biohidrogenacije nenasičenih MK.
- Delež stearinske kisline, končni produkt biohidrogenacije linolne in linolenske kisline, se je med inkubacijo vseh substratov močno povečeval.
- Biohidrogenacija n-3 VNMK je hitrejša od biohidrogenacije n-6 VNMK.
- Po 96 urah inkubacije je biohidrogeniralo od 80 % (trava) do 84 % (dobra silaža) linolne kisline in od 92 % (seno) do 95 % (dobra silaža) linolenske kisline.
- Pri vseh substratih smo opazili, da je bila biohidrogenacija linolenske kisline (C18:3 n-3) hitrejša od linolne kisline (C18:2 n-6).
- Ključni intermediati biohidrogenacije so cis-9 trans-11 KLK, trans-10 cis-12 KLK in vakcenska kislina. Največjo vsebnost akumulirane cis-9 trans-11 KLK smo po 96 urah inkubacije opazili pri dobri silaži (2,58 mg/100g SS vzorca). Trans-10 cis-12 KLK se je pri vseh opazovanih substratih voluminozne krme akumulirala med drugo in šesto uro inkubacije, največ pri slabi silaži (29,43 mg/100g SS vzorca) po šesti uri inkubacije.
- Vakcenska kislina je vmesni produkt biohidrogenacije tako linolne kot linolenske MK. Njena biohidrogenacija (akumulacija v prvih šestih urah) in razgradnja je odvisna od vrste voluminozne krme (v šestih urah inkubacije od 6,86 % (slaba silaža) do 8,43 % (dobra silaža)).

## 6 POVZETEK

Namen naše naloge je bil proučiti obseg biohidrogenacije v vampovem soku ter ugotoviti, kako na biohidrogenacijo vplivata zrelost in način konzerviranja voluminozne krme. Zanimala nas je tudi maščobnokislinska sestava posameznih substratov pred biohidrogenacijo in po različnem trajanju *in vitro* inkubacije.

*In vitro* fermentacijo substratov smo izvedli z metodo po Menke in Steingass (1988) (hohenheimski plinski test). V nalogi smo za substrate izbrali štiri vrste voluminozne krme (sveža trava, seno, dobra in slaba silaža). V ogrete 100 ml brizgalke smo zatehtali 175 mg substrata in jih napolnili z mešanico vampovega soka in pufra ter jih inkubirali 2, 4, 6, 8, in 96 ur. Ob določeni uri inkubacije smo brizgalke vzeli iz kopeli in jih postavili v mrzlo vodo, da smo zaustavili fermentacijo. Vsebinsko smo nato prelili na stehtane in označene plastične krožnike ter jih shranili v zamrzovalniku pri temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zamrznjene vzorce smo liofilizirali in jih do analize maščobnokislinske sestave ponovno shranili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estrenje maščobnih kislin smo izvedli po postopku, ki sta ga razvila Park in Goins (1994) brez predhodne ekstrakcije maščob iz vzorca. Maščobne kisline v vzorcu smo določili s plinsko kromatografijo. S pomočjo formule, ki jo navajajo Sinclair in sod. (2005) smo izračunali deleže biohidrogenirane linolne in linolenske kisline.

S pomočjo masnih deležev (% g/100 g MK) smo ocenili maščobnokislinsko sestavo skupin MK (NMK, ENMK, VNMK, n-3 VNMK, n-6 VNMK in razmerje med n-6/n-3 VNMK). Ugotovili smo, da je bil delež ENMK pred inkubacijo v primerjavi z ostalimi skupinami MK v vseh voluminoznih krmah najmanjši, medtem ko je bil delež VNMK v primerjavi z drugimi MK v substratih največji. Po 96 urah inkubacije se je delež NMK pri vseh substratih povečal zaradi biohidrogenacije nenasičenih MK. Med inkubacijo se je razmerje n-6/n-3 VNMK pri vseh substratih širilo. Iz širjenja razmerja je razvidno, da so se n-3 VNMK biohidrogenirale hitreje od n-6 VNMK.

Primerjali smo tudi vsebnosti posameznih NMK in sicer lavrinsko, miristinsko, palmitinsko in stearinsko kislino. Ugotovili smo, da je pred inkubacijo seno vsebovalo največje deleže teh NMK. Med inkubacijo se je delež vseh opazovanih NMK povečeval, kar je bilo pričakovano. Najbolj se je povečal delež C18:0, ki je končni produkt biohidrogenacije.

Izmed ENMK smo ugotovili zelo majhna deleža C12:1 in C14:1 pred in po inkubaciji substratov, medtem ko so se deleži vseh izomer C18:1 med inkubacijo vseh substratov povečali. Največje deleže so dosegli med četrto in šesto uro inkubacije. Izmed VNMK smo opazili, da sta se že v prvih dveh urah inkubacije zmanjšala deleža linolne in linolenske kisline. Biohidrogenacija linolenske kisline je hitrejša kot biohidrogenacija linolne kisline. Največ linolenske in linolne kisline se je po 96 urah inkubacije biohidrogeniralo pri dobri silaži. V poskusu smo določali tudi vsebnosti vakuenske kisline, ki je vmesni produkt biohidrogenacije in prevladujoča trans MK v mlečni maščobi prežvekovalcev. Služi kot substrat za nastanek cis-9 trans-11 KKK v živalskih tkivih. Vmesna produkta biohidrogenacije sta poleg vakuenske kisline še cis-9 trans-11 KKK in trans-10 cis-12 KKK, cis C18:1 in C18:0 pa sta končna produkta biohidrogenacije.



## 7 VIRI

- Ascherio A., Willent W. 1997. Health effects of trans fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66: 1006-1010
- Banni S., Angioni E., Murru E., Carta G., Melis M.P., Bauman D., Dong Y., Ip C. 2001. Vaccenic acid feeding increases tissue levels of conjugated linoleic acid and suppresses development of premalignant lesions in rat mammary gland. *Nutrition and Cancer*, 41: 91-97
- Bauman D.E. 2002. Conjugated linoleic acid (CLA) and milk fat. V: A good news story. Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, NY. *Proc. Arizona Dairy Production, Conf.*, Tempe: 47-52.  
[http://www.ansci.cornell.edu/bauman/cla/conference\\_proceedings/index.html](http://www.ansci.cornell.edu/bauman/cla/conference_proceedings/index.html)  
(22. feb. 2011)
- Bauman D.E. 2009. Conjugated linoleic acid (CLA) studies. The Bauman research group. Cornell University, Department of animal science.  
[http://www.ansci.cornell.edu/bauman/cla/chemical\\_structures/index.html](http://www.ansci.cornell.edu/bauman/cla/chemical_structures/index.html)  
(29. okt. 2010)
- Bauman D.E., Baumgard L.H., Corl B.A., Griinari J.M. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science: Annual meeting 1999*: 1-15
- Bauman D.E., Parfield J.W., de Veth M.J., Lock A.L. 2003. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. V: *Proc. Cornell Nutr. Conf*: 175-189
- Bauman D.E., Griinari J. M., 2003. Conjugated Linoleic Acids (CLA) and Lactating Dairy Cows. Cornell University, Department of Animal Science. <http://www.ansci.cornell.edu>  
(22. feb. 2011)
- Bernardini D., Gerardi G., Elia C.A., Marchesini G., Tenti S., Segato S. 2010. Relationship between milk fatty acid composition and dietary roughage source in dairy cows. *Veterinary Research Communications*, 34, Suppl. 1: 135-138
- Boufaïed H., Chouinard P.Y., Tremblay G.F., Petit H.V., Michaud R., Bélanger G. 2003a. Fatty acids in forages. I. Factors affecting concentrations. *Canadian Journal of Animal Science*, 83: 501-511
- Boufaïed H., Chouinard P.Y., Tremblay G.F., Petit H.V., Michaud R., Bélanger G. 2003b. Fatty acids in forages. II. *In vitro* ruminal biohydrogenation of linolenic and linoleic acids from timothy. *Canadian Journal of Animal Science*, 83: 513-522
- Boyer R. 2005. *Temelji biokemije*. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.

- Buccioni A., Antongiovanni M., Petacchi F., Mele M., Serra A., Secchiari P., Benvenuti D. 2006. Effect of dietary fat quality on C18:1 fatty acids and conjugated linoleic acid production: An *in vitro* rumen fermentation study. *Animal Feed Science and Technology*, 127: 268–282
- Buccioni A., Antongiovanni M., Petacchi F., Mele M., Serra A., Secchiari P., Minieri S. 2008. Effect of dried or green herbage on vaccenic acid and conjugated linoleic acid production during *in vitro* rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 140: 207–213
- Carriquiry M., Weber W.J., Baumgard L.H., Crooker B.A. 2007. *In vitro* biohydrogenation of four dietary fats. *Animal Feed Science and Technology*, 141: 339–355
- Chalupa W., Moate P., Boston R. 2002. Ruminal metabolism and intestinal digestion of fatty acids. School of Veterinary Medicine, Pennsylvania.  
[http://calscf.calsnet.arizona.edu/animsci/ansci/swnmc/papers/2002/Chalupa\\_Moate\\_Boston2002.pdf](http://calscf.calsnet.arizona.edu/animsci/ansci/swnmc/papers/2002/Chalupa_Moate_Boston2002.pdf) (21. feb. 2011)
- Chilliard Y., Ferlay A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*, 44: 467-492
- Čepeljnik T., Devillard E. 2006. Sposobnost biohidrogenacije linolne kisline pri vampni bakteriji *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>. *Acta agriculturae Slovenica*, 88, 2: 75-81
- Digestive Anatomy in Ruminants. 2003. Hypertexts for biomedical sciences (23. nov. 2003).  
[http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/herbivores/rumen\\_anat.html](http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/herbivores/rumen_anat.html) (1. dec. 2010)
- Fellner V., Sauer F.D., Kramer J.K.G. 1995. Steady state rates of Linoleic Acid Biohydrogenation by Ruminal Bacteria in Continuous Culture. *Journal of Dairy Science*, 78: 1815-1823
- Flint H.J., 1997. The rumen microbial ecosystem – some recent developments. *Trends in Microbiology*, 5: 483-488
- Harfoot C.G., Hazlewood G.P. 1997. Lipid metabolism in the rumen. V: The rumen microbial ecosystem. 2<sup>nd</sup> edition. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). London, Blackie Academic: 382-426
- Jenkins T.C. 1993. Lipid metabolism in the rumen, advances in ruminant lipid metabolism. *Journal of Dairy Science*, 76, 12: 3851-3863
- Jenkins T.C., Wallace R.J., Moate P.J., Mosley E.E. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86: 397-412.  
<http://jas.fass.org/cgi/content/full/86/2/397> (24. feb. 2011)

- Kay J.K., Mackle T.R., Auldism M.J., Thomson N.A., Bauman D.E. 2004. Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. *Journal of Dietary Science*, 87: 369-378
- Kamra D.N., 2005. Rumen microbial ecosystem. Microbiology section, centre of advanced studies in animal nutrition. Indian Veterinary Research Institute, *Current Science*, 89: 124-135
- Kimball J. W. *Biology*. 2008.  
<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/F/Fats.html> (30. nov. 2010)
- Kramer J.K.G., Cruz-Hernandez C., Deng Z., Zhou J., Jahreis G., Dugan M.E.R. 2004. Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *American Society for Clinical Nutrition*, 79: 1137-1145
- Lobb K., Chow C.K. 2008. Fatty acids classification and nomenclature. V: Fatty acids in foods and their health implications. 3<sup>rd</sup> edition. Chow C.K. (ed.). New York, CRC Press: 1-15
- Lock A.L., Bauman D.E. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. New York, Cornell University, Department of Animal Science, 39: 1197.  
<http://www.springerlink.com/content/k765650j8j467k14/> (17. mar. 2011)
- Lor J.J., Ueda K., Ferlay A., Chilliard Y., Doreau M. 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary. *Journal of Dairy Science*, 87: 2472–2485
- Maia M.R.G., Chaudhary L.C., Figueres L., Wallace R.J. 2006. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek*. Springer Science, 91: 303–314  
<http://www.springerlink.com/content/kr6752466658hw38/> (13. apr. 2011)
- MacDonald H.B. 2000. Conjugated Linoleic Acid and Disease Prevention: A Review of Current Knowledge. *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 2: 111S–118S
- Martin S.A., Jenkins T.C. 2002. Factors affecting conjugated linoleic acid and trans-C18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria. *Journal of Animal Science*, 80: 3347-3352
- Menke K.H., Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28: 7-55
- Mir P.S., McAllister T.A., Scott S., Aalhus J., Baron V., McCartney D., Charmley E. 2004. Conjugated linoleic acid–enriched beef production. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 1207-1211

- Moate P.J., Chalupa W., Jenkins T.C., Boston R.C. 2004. A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption of long chain fatty acids. *Animal Feed Science and Technology*, 112: 79-105
- Mosley E.E., Powell G.L., Riley M.B., Jenkins T.C. 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to trans isomers in vitro. *Journal of Lipid Research*, 43: 290-296
- Muller L.D., Delahoy J.E. 2004. Conjugated linoleic acid (CLA) implications for animal production and human health. Penn State, College of agricultural science, Cooperative extension: 1-8
- Orešnik A., Kermauner A. 2000. Prehrana domačih živali. 2. del. Skripta. Ljubljana, Veterinarska fakulteta: 70 str.
- Orešnik A., Kermauner A. 2009. Osnove prehrane. Slovenj Gradec, Kmetijska založba: 179 str.
- Ortega-Pérez R., Murillo-Amador B., Espinoza Villavicencio J.L., Palacios-Espinosa A., Carreón-Palau L., Palacios-Mechetnov E., Plascencia-Jorquera A. 2010. Chemical composition and proportion of precursors of rumenic and vaccenic acids in alternative forages for the feeding of ruminants in arid ecosystems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 33–45.  
<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=93913074004> (17. mar. 2011)
- Park P.W., Goins R.E. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science*, 59: 1262-1266
- Ribeiro C.V.D. M, Karnati S.K.R., Eastridge M.L. 2005. Biohydrogenation of Fatty Acids and Digestibility of Fresh Alfalfa or Alfalfa Hay Plus Sucrose in Continuous Culture. *Journal of Dairy Science*, 88: 4007-4017
- Russell J.B., Rychlik J. L., 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, 292: 1119-1122
- Simopoulos A. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70: 560S-9S
- Sinclair L.A., Cooper S.L., Huntington J.A., Wilkinson R.G., Hallett K.G., Enser M., Wood J.D. 2005. In vitro biohydrogenation of n–3 polyunsaturated fatty acids protected against ruminal microbial metabolism. *Animal Feed Science and Technology*, 81: 1-18
- 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 Clinical Nutrition*, 76: 504-510
- Weissbach F., Honig H. 1996. Über die Vorhersage und Steuerung des Gärungsverlaufs bei der Silierung von Grünfütter aus extensivem Anbau. *Landbauforschung Völkenrode*, 1: 10-17

- Williams C.M., 2000. Dietary fatty acids and human health. *Annales de Zootechnie*, 49: 165-180
- Wood J.D., Enser M., Richardson R.I., Whittington F.M. 2008. Fatty acids in meat and meat products. V: Fatty acids in foods and their health implications. 3<sup>rd</sup> edition. Chow C.K. (ed.). New York, CRC Press: 87-107
- Wilde P.F., Dawson R.M.C. 1966. The Biohydrogenation of  $\alpha$ -linolenic acid and oleic acid by rumen micro-organisms. *Biochemistry Department, Agricultural Research Council, Institute of Animal Physiology*, 98: 469-475
- Žgajnar J. 1990. Prehrana in krmljenje goved. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 564 str.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Andreju Lavrenčiču za strokovno pomoč pri izvajanju *in vitro* poskusa in za vse nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Iskreno se zahvaljujem somentorici asist. dr. Alenki Levart za pomoč pri izbiri literature, za optimizem in dobro voljo pri opravljanju analize in za številne koristne nasvete.

Zahvala prof. dr. Janezu Salobirju za strokovno recenzijo diplome in predsedniku komisije prof. dr. Ivanu Štuhcu za temeljit pregled dela in koristne popravke.

Hvala tehničnim sodelavcem Katedre za prehrano za pomoč pri analizah v laboratoriju.

Hvala dr. Nataši Siard za pomoč pri pregledu literature ter ga. Karmeli Malinger za pregled angleškega izvlečka.

Zahvaljujem se tudi ga. Sabini Knehtl za vso pomoč in prijaznost tekom študija.

Anja in Tina, hvala za klepetave urice.

Posebno zahvalo dolgujem mojima staršema. Hvala, ker sta mi omogočila študij ter za vso moralno in finančno podporo tekom študija.

Miha, hvala za potrpežljivost ob mojem »jamranju« in za vsa potepanja ter za kratke in dolge pobege na lepše.