

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Iva BOLTAR

**OBLIKOVANJE IN VREDNOTENJE AROME NANOŠKEGA SIRA
– OD KRME DO SIRA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**FORMATION AND EVALUATION OF AROMA PROFILE OF
NANOS CHEESE – FROM THE FEED TO THE CHEESE**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 19.9. 2012 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje živilstvo. Za mentorico je bila imenovana doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič.

Poskusi in analize so bili izvedeni v agroživilskem laboratoriju in laboratoriju za mleko kmetijskega zavoda Nova Gorica, na Nacionalnem veterinarskem Inštitutu enote Nova Gorica, v mlekarini Vipava, v sirarni kmetije Hubjan v Batah ter v zoričnici sirarne kmetije Pustotnik v Gorenji vasi.

Mentorica: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Lea DEMŠAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Matevž POMPE

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Član: prof. dr. Irena ROGELJ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Doktorandka:

Iva BOLTAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 637.354:547.5:543.544.3(043)=163.6
KG	sir/Nanoški sir/aroma/aromatski profil/hlapne organske spojine/zorenje sira/vpliv sezone/vpliv krme/tehnološki postopki/SPME-GC-MS
AV	BOLTAR, Iva, univ. dipl. inž. zoot.
SA	ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje živilstva
LI	2015
IN	OBLIKOVANJE IN VREDNOTENJE AROME NANOŠKEGA SIRA – OD KRME DO SIRA
TD	Doktorska disertacija
OP	XV, 164 str., 18 pregl., 36 sl., 10 pril., 181 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Glavni predmet raziskave je bil Nanoški sir (trdi tip sira), katerega prireja mleka in izdelava sta omejeni na določeno geografsko območje. Študija zajema proučevanje različnih dejavnikov, ki vplivajo na oblikovanje in vrednotenje arome Nanoškega sira. Poleg sezone smo se osredotočili še na čas zorenja ter na nekatere druge pogoje zorenja (temperatura, lokacija zorenja). Naloga zajema tudi analizo aromatskih profilov krme in mleka z namenom vrednotenja možnega vpliva krme in mleka na končno aromo sira. Za določanje profila hlapnih organskih spojin (HOS) v siru, mleku in krmi smo uporabili plinsko kromatografijo z masnim spektrometrom, za ekstrakcijo pa mikroekstrakcijo na trdnem nosilcu (angl. Solid Phase Microextraction – SPME). Vzorci krme in mleka so se glede na sezono razlikovali tako po prisotnosti kot tudi po vsebnosti HOS. Znotraj aromatskega profila Nanoškega sira so bila opazna sezonsko pogojena nihanja. Za nekatere v siru identificirane HOS, ki so imele večje vsebnosti v določeni sezoni smo ugotovili tudi možne povezave s krmo in/ali mlekom iz iste sezone (ocetna kislina, 3-metil butanojska kislina, heksanojska kislina, etil ester heksanojske kisline, etil ester očetne kisline, etil ester dekanjske kisline, 2-butanon, pinan, α-pinen, sabinen, limonen, p-cimen, β-kariofilen, toluen). Med HOS z največjo vsebnostjo v Nanoškem siru spadajo 2-heptanon, 2-nonanon, butanojska kislina in etil ester butanojske kisline. Glede na to, da Nanoškemu siru pripisujejo blago oreškasto aromo, smo v Nanoškem siru tudi identificirali nekatere HOS, ki jih povezujejo z aromo po oreških in mandljih. Med temi HOS bi navedli benzaldehid, etil ester očetne kisline in toluen. Ugotovili smo, da so se vsebnosti določenih HOS med zorenjem spreminjale (naraščale, padale, variirale). Vsebnost večine HOS se je povečevala z zorenjem (še posebej maščobnih kislin in estrov). Vendar pa smo za nekatere HOS ugotovili padajoči trend. Verjetno, ker so te komponente (2,3- butandion/diacetil, 3-hidroksi-2-butanone/acetoin) prekursorji za druge HOS. V siru namreč med zorenjem potekajo številne biokemijske spremembe. Rezultati manjših dodatnih poskusov iz zadnjega dela naloge nakazujejo, da se aromatski profil sira glede na različno lokacijo ni razlikoval. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da je višja temperatura zorenja prispevala k večji vsebnosti določenih HOS ter da je večja količina dodanih starterskih kultur prispevala k večji vsebnosti HOS. Sir, ki je zorel na tropinah, pa je imel večjo vsebnost estrov, kar bi lahko povezali s sadno noto. Naša študija je pomemben prispevek na področju kombinacije instrumentalnega in senzoričnega določanja arome sirov, s posebnim poudarkom na tradicionalnih sirih. To je prva študija, ki se ukvarja z oblikovanjem in vrednotenjem arome izbranega slovenskega sira, spremljanega med zorenjem glede na različno sezono, ter hkrati tudi vključuje povezave z aromatskimi profili krme in mleka z istega območja kot izvira sir.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDK 637.354:547.5:543.544.3(043)=163.6
CX cheese/Nanos cheese/flavour/aromatic profile/volatile compounds/cheese ripening/effect of season/effect of feed/technological processes/SPME-GC-MS
AU BOLTAR, Iva
AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, field Food Science and Technology
PY 2015
TI FORMATION AND EVALUATION OF AROMA PROFILE OF NANOS CHEESE - FROM THE FEED TO THE CHEESE
DT Doctoral dissertation
NO XV, 164 p., 18 tab., 36 fig., 10 ann., 181 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The main object of our study was Nanos cheese (a hard type of cheese), whose milk production and manufacture are limited to a specific geographic area. The study includes examination of various factors in the development and evaluation of Nanos cheese flavour. Apart from the variations influenced by the season in which the cheese was produced focus of our investigation was also the effect of the ripening time as well as some other ripening conditions (e.g. temperature, ripening location). The study also includes an analysis of the aromatic profiles of cattle fodder and milk with the purpose of evaluating the possible impact of fodder and milk on the final flavour of the cheese. For the determination of the profile of volatile organic compounds (VOCs) in cheese, milk and cattle fodder the SPME-GC-MS was used. Depending on the season, samples of fodder and milk, were different in both, presence as well as the content of some VOCs. Within the aromatic profile of Nanos cheese seasonal variations were found. For some VOCs of one season identified in Nanos cheese some possible connections with the fodder and / or milk from the same season were found (acetic acid, 3-methyl butanoic acid, hexanoic acid, hexanoic acid ethyl ester, acetic acid ethyl ester, decanoic acid ethyl ester, 2-butanone, pinan, α -pinene, sabine, limonene, p-cymene, β -caryophyllene, toluene). Among VOCs identified in Nanos cheese with the maximum content are 2-heptanone, 2-nonanone, butanoic acid and ethyl ester butanoic acid. With regard to the fact that Nanos cheese has a nutty flavour, unsurprisingly some VOCs, namely benzaldehyde, acetic acid ethyl ester and toluene associated with the aroma of nuts and almonds, were also identified. Furthermore, we found that the trends of certain VOCs changed during ripening (increased, decreased, varied). Most VOCs' content increased (especially fatty acids and esters), however, a downward trend of some VOCs was also found. The reason for this could be that these components (2,3 butanedione / diacetyl, 3-hydroxy-2-butanone / acetoin) are precursors for other VOCs. In fact, many biochemical changes occur in cheese during ripening process. The results of some minor additional experiments from the last part of the study show that variation in location did not affect the aromatic profile of the cheese. In addition, it was found that a temperature increase at the time of ripening contributed to increased content of certain VOCs. Furthermore, a greater amount of added starter cultures also contributed to increased VOCs' content. Cheese ripened in grape skins had a higher content of esters, which could be associated with a fruity cheese flavour. We consider our study as an important contribution in the field of combining instrumental and sensory analysis in determination of cheese flavour, with a particular emphasis on traditional cheeses. To our knowledge this is the first study which deals with the formation and evaluation of flavour during maturing process of a traditional Slovenian cheese with protected designation of origin, the effect of season on this as well as including in the study how this is linked to the aromatic profiles of fodder and milk from the area of the Nanos cheese production.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XV
1 UVOD.....	1
1.1 UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE.....	1
1.2 NAMEN DELA.....	3
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 NANOŠKI SIR.....	5
2.1.1 Definicija geografskega območja	5
2.1.2 Tehnološki postopek izdelave Nanoškega sira.....	6
2.2 DOLOČANJE AROME SIRA	10
2.3 HLAPNE ORGANSKE SPOJINE V SIRU PO FUNKCIONALNIH SKUPINAH.....	11
2.3.1 Maščobne kisline	12
2.3.2 Ketoni	13
2.3.3 Alkoholi	14
2.3.4 Estri	15
2.3.5 Aldehidi	16
2.3.6 Terpeni	17
2.3.7 Druge snovi	19
2.4 GLAVNE POTI NASTANKA HLAPNIH ORGANSKIH SPOJIN	21
2.4.1 Lipoliza in metabolizem MK	22
2.4.1.1 Lipoliza.....	22

2.4.1.2	Metabolizem prostih maščobnih kislin	23
2.4.2	Proteoliza in metabolizem AK	26
2.4.2.1	Proteoliza.....	26
2.4.2.2	Metabolizem aminokislin.....	28
2.4.3	Fermentacija laktoze ter pretvorbe mlečne kisline	28
2.4.4	Metabolizem citrata	30
2.5	IZVOR Hlapnih organskih spojin v mleku in siru ter vplivi na njihov nastanek	32
2.5.1	Hlapne organske spojine v mleku	32
2.5.2	Vpliv prehrane.....	32
2.5.3	Vpliv tehnološkega postopka izdelave sira.....	35
2.5.4	Toplotna obdelava mleka.....	37
2.5.5	Starterske kulture	38
2.4.3.1	Vloga starterskih kultur	39
2.4.3.2	Dejavniki, ki vplivajo na dodano startersko kulturo	41
2.4.3.3	Izbira in primeri starterskih kultur ter njihov vpliv na aromo	42
2.4.3.4	Naravna mikrobiota Nanoškega sira in uporabljene starterske kulture.....	42
2.4.4	Zorenje	44
3	MATERIAL IN METODE	46
3.1	ZASNOVA POSKUSA PO SKLOPIH.....	46
3.2	MATERIAL	48
3.2.1	Krmni obrok, mleko in sir	48
3.2.2	Kemikalije	49
3.2.3	Aparature in oprema	50
3.3	METODE	51
3.3.1	Metode vrednotenja različnih pogojev zorenja na oblikovanje aromatskega profila Nanoškega sira	51
3.3.1.1	Različna surovina	52
3.3.1.2	Različna lokacija zorenja	52
3.3.1.3	Različna količina dodanih starterskih kultur ter temperature zorenja.....	52
3.3.1.4	Zorenje sira na tropinah.....	53
3.3.2	Metode določanja hlapnih organskih spojin v siru, krmi in mleku.....	53

3.3.2.1	Razvoj in optimizacija metode SPME-GC-MS za določanje hlapnih organskih spojin v siru	53
3.3.2.2	Določanje hlapnih organskih spojin v mleku ter travni silaži in sveži travi	56
3.3.2	Struktura krmnega obroka ter kemijske analize travne silaže, sveže trave in mleka	56
3.3.3	Statistična analiza.....	57
3.3.3.1	Opisna statistična analiza	57
3.3.3.2	ANOVA	58
3.3.3.3	Analiza primerjave dveh ali več odvisnih vzorcev	59
3.3.3.4	Analiza z metodo glavnih osi (PCA).....	59
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	61
4.1	VPELJAVA IN OPTIMIZACIJA METODE	61
4.2	SKLOP 1: KRMA IN MLEKO.....	64
4.2.1	Sestava in struktura krmnih obrokov ter osnovni parametri kemijske kakovosti mleka	64
4.2.2	Hlapne organske spojine v travni silaži, sveži travi in mleku iz poletne in zimske sezone.....	66
4.2.2.1	Primerjava krme (sveže trave) in mleka s tipičnega »nanoškega« in drugega območja	70
4.3	SKLOP 2: HLAPE ORGANSKE SPOJINE V NANOŠKEM SIRU	75
4.3.1	Identifikacija in analiza hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru	75
4.3.1.1	Identifikacija hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru, njihove aromatične note ter parametri modela	75
4.3.1.2	Analiza hlapnih organskih spojin Nanoškega sira, njihov trend vsebnosti med zorenjem ter vpliv sezone.....	83
4.3.1.2.1	Proste maščobne kisline.....	83
4.3.1.2.2	Ketoni	90
4.3.1.2.3	Alkoholi.....	99
4.3.1.2.4	Estri.....	106
4.3.1.2.5	Aldehidi	111
4.3.1.2.6	Terpeni.....	114
4.3.1.2.7	Druge snovi.....	115
4.3.2	PCA organskih spojin Nanoškega sira iz poletne in zimske sezone	117
4.3.2.1	Rezultati PCA na 99. dan zorenja	117

4.3.2.2	Rezultati PCA na 63. dan zorenja	119
4.3.2.3	Hlapne organske spojine, ki so v PCA ločile sezoni ter njihove povezave v krmi in mleku	122
4.3.3	PCA analiza Nanoškega sira iz dveh poletnih sezon	122
4.3.4	PCA analiza Nanoškega sira in sira Tolminc	124
4.4	SKLOP 3: MOŽNI VPLIVI SPREMENJENIH PARAMETROV NA PROFIL Hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru	127
4.4.1	Različna surovina	127
4.4.2	Različna lokacija zorenja.....	129
4.4.3	Vpliv različne količine dodanih starterskih kultur ter temperature zorenja	131
4.4.3.1	Učinek višje temperature.....	134
4.4.3.2	Učinek večje količine dodane starterske kulture.....	136
4.4.4	Vpliv različne tehnologije zorenja: običajna in na tropinah.....	136
5	SKLEPI.....	140
6	POVZETEK	142
6.1	POVZETEK	142
6.2	SUMMARY	146
7	VIRI	150

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Kemikalije uporabljene v analizah krme, mleka in sira	50
Preglednica 2: Aparature in oprema, uporabljena v analizah krme, mleka in sira	51
Preglednica 3: Vsebnost in koncentracija hlapnih organskih spojin (HOS) v Nanoškem siru	63
Preglednica 4: Sestava krmnega obroka v zimski sezoni (n=16)	65
Preglednica 5: Sestava krmnega obroka v poletni sezoni (n=10)	65
Preglednica 6: Povprečne vrednosti vsebnosti hranilnih snovi v travni silaži iz zimske sezone in sveže trave iz poletne sezone	66
Preglednica 7: Povprečne vrednosti osnovnih parametrov kemijske kakovosti vzorcev mleka (n=6) po sezonah	66
Preglednica 8: Nekaterne hlapne organske spojine (HOS) (s povprečno površino kromatografskih vrhov), identificirane v krmi in mleku, s statističnimi parametri	68
Preglednica 9: Terpeni v mleku iz poletne sezone z območja za Nanoški sir (Nanoško) ter izven tega območja (Drugo)	72
Preglednica 10: Terpeni v krmi (sveži travi) z območja za Nanoški sir (Nanoško) ter izven tega območja (Drugo)	73
Preglednica 11: Hlapne organske spojine (HOS) v Nanoškem siru in njihove aromatične note	77
Preglednica 12: F-vrednost in p-vrednost vplivov v uporabljenem statističnem modelu	80
Preglednica 13: Hlapne organske spojine (HOS) v Nanoškem siru s statističnimi parametri v uporabljenem statističnem modelu	82
Preglednica 14: Izračunane komponente uteži spremenljivk-hlapnih organskih spojin (HOS) za prvi dve osi (Faktor 1, Faktor 2) pri 63. in 99. dnevu zorenja	121
Preglednica 15: Uteži komponent spremenljivk – hlapnih organskih spojin za prvi dve funkciji (Funkcija 1 in Funkcija 2) pri PCA analizi Nanoškega sira in sira Tolmenc	126
Preglednica 16: Mikrobiološke analize površin hlebcev, zorenih na različnih lokacijah	130
Preglednica 17: Vsebnost hlapnih organskih spojin (HOS) v sirih, izdelanih z različno količino dodane starterske kulture (SK) in zorenih pri različnih temperaturah (12 °C, 18 °C)	133

Preglednica 18: Hlapne organske spojine (HOS) v Nanoškem siru, zorenem na običajen način in na tropinah.....	137
---	-----

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Diagram poteka izdelave Nanoškega sira (Nanoški sir GIZ, 2013: 7).....	9
Slika 2: Nastanek estrov in njihove spremembe (Alewijn, 2006: 27).....	15
Slika 3: Shema laktonizacije 5-hidroksi maščobnih kislin (I) do δ -laktona (II) (Alewijn, 2006: 29).....	20
Slika 4: Glavne biokemijske poti med zorenjem sira: (a) proteoliza, (b) lipoliza, (c) metabolizem laktata in citrata (McSweeney and Sousa, 2000: 295).....	22
Slika 5: Glavne poti metabolizma prostih maščobnih kislin (McSweeney in Sousa, 2000: 304).....	24
Slika 6: Transformacija maščobnih kislin preko β -oksidacije (Brulè in sod., 2000: 105).....	25
Slika 7: Nastanek nekaterih snovi iz kazeina (Bunch Kristensen, 1999: 175).....	27
Slika 8: Diagram mikrobne katabolizma aminokislin med zorenjem sira (Choisy in sod., 2000b: 127).....	28
Slika 9: Glavne poti metabolizma laktata v siru (McSweeney in Sousa, 2000: 296).....	29
Slika 10: Metabolizem citrata pri citrat-pozitivnih bakterijah iz rodu <i>Lactococcus</i> in <i>Leuconostoc</i> (McSweeney in Sousa, 2000: 300).....	31
Slika 11: Tehnološki postopek sirjenja in dejavniki, ki vplivajo na kakovost sira (Fox in Cogan, 2004: 585).....	36
Slika 12: Shema zastavljenega dela iz 2. sklopa	48
Slika 13: Trend vsebnosti prostih maščobnih kislin med zorenjem Nanoškega sira v zimski in poletni sezoni.....	85
Slika 14: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) 3-metil butanojske kisline v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah	87
Slika 15: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) 2-metil butanojske kisline v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah	88
Slika 16: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) heksanojske kisline v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah	89
Slika 17: Trend skupne vsebnosti ketonov v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah glede na dan zorenja v zimski in poletni sezoni.....	91
Slika 18: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) diacetila v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah	92
Slika 19: Primerjava trendov vsebnosti (povprečje $\pm$ standardna napaka) diacetila in acetoina v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah	94

Slika 20: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) 2-heptanona in oktanojske kisline (prekurzor 2-heptanona) v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah	96
Slika 21: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) 2-oktanona v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah	97
Slika 22: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) 2-nonanona v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah	98
Slika 23: Trend skupne vsebnosti alkoholov v vzorcih Nanoškega sira do 99. dneva zorenja v obeh sezonah.....	100
Slika 24: Primerjava vsebnosti (povprečje $\pm$ standardna napaka) acetoina, diacetila ter 2,3-butandiola med zorenjem Nanoškega sira v poletni sezoni (P)	101
Slika 25: Trend vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) 2,3-butandiola, 2-butanona in 2-butanola med zorenjem Nanoškega sira v poletni sezoni (P).....	102
Slika 26: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) 2-pentanola in 2-pentanona med zorenjem Nanoškega sira v obeh sezonah.....	103
Slika 27: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) 2-heptanola in 2-nonanola ter njunih prekurzorjev med zorenjem Nanoškega sira v zimski sezoni.....	104
Slika 28: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) etil estra očetne kisline in prekurzorja-očetne kisline med zorenjem Nanoškega sira v obeh sezonah.....	107
Slika 29: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) etil estra butanojske kisline in njegovega možnega prekurzorja-butanojske kisline med zorenjem Nanoškega sira v poletni sezoni (P).....	109
Slika 30: PCA identificiranih hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru na 99. dan zorenja, glede na hlebce sira iz poletne (K1–K6) in zimske (K7–K12) sezone	119
Slika 31: PCA identificiranih hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru na 63. dan zorenja, glede na hlebce sira iz poletne (K1–K6) in zimske (K7–K12) sezone	120
Slika 32: PCA identificiranih hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru na 63. dan zorenja, glede na hlebce sira iz 1. poletne (K1–K6) in 2. poletne (K13–K22) sezone	123
Slika 33: PCA identificiranih hlapnih organskih spojin na 99. dan zorenja Nanoškega sira, glede na hlebce sira iz 1. poletne (K1–K6) in 2. poletne (K13–K22) sezone.....	124
Slika 34: PCA identificiranih hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru (N7–N9) in siru Tolminc (T1–T3)	125

- Slika 35: PCA identificiranih hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru iz
»odbranega« (K7–K12) in iz »neodbranega« (K23–K28) mleka..... 128
- Slika 36: Hlebca sira, izdelana z običajno količino dodane starterske kulture,
zorena pri različnih temperaturah. Levo: pri 18 °C, desno: pri 12 °C. 132

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Testiranje SPME vlaken pri 25 °C, 24 h
- Priloga B: Testiranje črnega in sivega SPME vlakna pri 25 °C, 24 h
- Priloga C: Rezultati t-testa meritev s sivim (SV) in črnim (CR) vlaknom
- Priloga D: Test SPME-vlaken: 15 min kondicioniranje in 45 min ekstrakcija pri 37 °C
- Priloga E: Hlapne organske spojine v krmi po sezonah, statistični parametri opisne statistike in Wilcoxon-ovega testa
- Priloga F: Hlapne organske spojine v mleku po sezonah, statistični parametri opisne statistike in Wilcoxon-ovega testa
- Priloga G: Povprečne vrednosti vsebnosti (površina kromatografskih vrhov) hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru na različne dneve zorenja v poletni sezoni
- Priloga H: Povprečne vrednosti vsebnosti (površina kromatografskih vrhov) hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru na različne dneve zorenja v zimski sezoni
- Priloga I: Skupna vsota hlapnih organskih spojin po funkcionalnih skupinah in deleži posamezne skupine v Nanoškem siru v različnih sezonah
- Priloga J: Vsebnost hlapnih organskih spojin (HOS) v Nanoškem siru, zorenem na različnih lokacijah

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	aminokislina
<i>B.</i>	<i>Brevibacterium</i>
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
<i>G.</i>	<i>Geotrichum</i>
GC-MS	plinska kromatografija z masnim spektrometrom
GC-O	plinska kromatografija v kombinaciji z olfaktometrijo (GC-O)
HOS	hlapne organske spojine
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Leu.</i>	<i>Leuconostoc</i>
MK	maščobna kislina
MKB	mlečnokislinske bakterije
<i>P.</i>	<i>Penicillium</i>
PT	metoda izpihni in ujemi (angl. purge and trap)
SK	starterska kultura
SPME	mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (angl. Solid Phase Microextraction)
sp.	vrsta (<i>angl. species</i>)
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
subsp.	podvrsta (<i>angl. subspecies</i>)
ŠSC	število somatskih celic
SŠMO	skupno število mikroorganizmov

1 UVOD

1.1 UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE

Mlečni izdelki so pomembna skupina živil, med katerimi zavzemajo siri posebno mesto. Trend uživanja sirov v zadnjih letih močno narašča, s čimer se povečuje tudi njihova proizvodnja. Ob tem je potrebno nenehno zagotavljanje kakovosti in ustreznih lastnosti izdelka. Eden pomembnejših kriterijev za določanje kakovosti in tipičnih lastnosti sirov je zagotovo aroma (Stefanon in Procida, 2004; Amenu in Deeth, 2007), še posebej tradicionalnih, ki imajo edinstveno aromo zaradi lokalnih značilnosti specifičnega območja izdelave (Carpino in sod., 2004).

S senzoričnega vidika je aroma sira skupek zaznav, ki jih ljudje zaznamo ob zauživanju in so lahko prijetne, manj prijetne, tipične ali nespecifične. S kemijskega vidika pa je aroma kompleks hlapnih in nehlapnih snovi (Delgado in sod., 2010). Hlapne organske snovi (HOS), ki dajejo hrani specifičen vonj (Charve, 2011), so lahko izrazito specifične in omogočajo nedvoumno razlikovanje mlečnih izdelkov (Perotti in sod., 2009).

Čeprav je analiza HOS v živilski industriji, vključno z mlekarstvo, ena izmed najbolj uporabljenih instrumentalnih metod določanja določenih parametrov kakovosti živil (Milosavljević in sod., 2012), pa je klasična senzorična analiza pri tem še vedno nenadomestljiva, saj spada h kriterijem, ki pomembno vplivajo na potrošnikovo izbiro posameznega živila (Perotti in sod., 2009). Instrumentalna analiza določanja arome lahko pomembno dopolni senzorično analizo, saj na objektivni način nudi nekakšen prstni odtis arome specifičnega izdelka. Kromatografska analiza je ena pomembnejših instrumentalnih metod določanja senzorične kakovosti živil (Abilleira in sod., 2010b), s pomočjo katere razrešujemo aromatske profile oz. aromagrame.

Analitična metoda za določanje profila HOS v siru pogosto vključuje plinsko kromatografijo z masnim spektrometrom (Verzera in sod., 2004), vendar potrebuje ustrezno ekstrakcijo oziroma predkoncentracijo vzorca. Kljub temu da obstaja veliko tehnik za analizo spojin v plinski fazi, je vendarle nekako najbolj uveljavljena ekstrakcijska tehnika, tako imenovana mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (angl. Solid Phase Microextraction - SPME), ki so jo že uspešno vključili v analize arome sira (Chin in sod., 1996; Delgado in sod., 2010; Milosavljević in sod., 2012). Njena glavna prednost je odsotnost uporabe organskih topil. Poleg tega je tehnika hitra, enostavna, specifična in občutljiva. Pri tej tehniki se na večslojno vlakno adsorbirajo HOS (Charve, 2011).

Danes tako poznamo najrazličnejše vrste sirov, ki se med seboj razlikujejo po aromi. Poleg lokalnih klimatskih in geoloških pogojev vpliva na oblikovanje arome sira tudi sam tehnološki postopek izdelave. Tako so razlike med vrstami sirov dobrodošle, ker

nudijo pestrost izbire. Ista vrsta sira mora dosegati neko standardno kakovost, ki vrsto definira in jo naredi specifično. Kontrola posameznih tehnoloških korakov in vplivov nudi jasnejši vpogled v tiste faze proizvodnje sira, ki so ključne za njegovo končno kakovost in aromo.

Na količino in raznolikost prisotnih HOS v siru vplivajo številni parametri, kot so prehrana živali, pogoji zorenja, tehnološki proces izdelave, indogena mikrobiota surovega mleka, vrsta mleka (ovčje, kozje, kravje), sirišče, sezona, okolje (Centeno in sod., 2004; Stefanon in Procida, 2004; Gioacchini in sod., 2010), aktivnost encimov ter dodatek starterske kulture (SK) (Ozcan in Kurdal, 2012).

Literaturni podatki navajajo, da so posamezni avtorji že določali HOS v geografsko zaščitene sirih in drugih zanimivih sirih (Correa Lelles Nogueira in sod., 2005; Cornu in sod., 2009; Gioacchini in sod., 2010). Čeprav so v sirih identificirali več kot 600 HOS, je zanimivo, da k oblikovanju končne arome sira dejansko prispevajo le nekatere od teh (Curioni in Bosset, 2002). Rezultati so pokazali, da lahko določeno noto arome v siru povežemo z določenimi hlapnimi snovmi (Lawlor in sod., 2002).

Modelni sir naše raziskave je bil Nanoški sir, trdi tip sira, katerega prireja mleka in izdelava sira sta omejeni na specifično geografsko območje. Lokalne značilnosti, ki prispevajo k oblikovanju specifičnih lastnosti Nanoškega sira, so splet vseh tistih dejavnikov, ki vplivajo na proizvodnjo krme, na surovo mleko, ki je surovina za izdelavo Nanoškega sira in je prirejeno na natančno določenem območju ter na samo tehnologijo izdelave sira. Za določitev in poenotenje vseh parametrov proizvodnje ter končne kakovosti Nanoškega sira je leta 2003 Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano izdalo Pravilnik o označbi geografskega porekla Nanoški sir, s katerim se za Nanoški sir določa način pridelave, predelave in priprave za trg ter definira območje pridelave in označbo geografskega porekla. Sir, ki zadosti kriterijem iz specifikacije za Nanoški sir, je upravičen do oznake geografskega porekla ter zagotavlja potrošniku pristen in kakovosten izdelek.

Vedno več slovenskih živilskih izdelkov se poteguje za pridobitev označbe posebni kmetijski pridelki oziroma živila. Izkušnje drugih držav tudi kažejo, da so ekonomske koristi zaščite večje kot dodatni stroški, ki nastanejo ob vključevanju posameznih proizvodov v sheme kakovosti (Jerič in sod., 2007). Nanoški sir nosi znak zaščiteno geografsko poreklo in ima številne nagrade, ki potrjujejo njegovo kakovost. Zaščiteno geografsko poreklo dokazuje značilnosti in kakovost kmetijskega pridelka in je najvišja raven zaščite tradicionalnih živil. Te so izključno ali bistveno posledica geografskega okolja ter njegovih naravnih in človeških dejavnikov. V Sloveniji je le nekaj sirov, ki imajo ta znak. Poleg tega je Nanoški sir prvi slovenski sir, ki je prejel oznako živilo z označbo porekla na območju celotne Evropske unije (DOOR, 2014).

Kompleksna študija, ki bi vključevala proučevanje različnih dejavnikov, kot so krma za krave, sezona izdelave sira, čas zorenja ter nekateri izbrani parametri med zorenjem (temperatura, lokacija zorenja, količina SK) na oblikovanje in vrednotenje arome sirov v slovenskem prostoru, še ni bila opravljena. Zato bi rezultati naše naloge pripomogli h kontroli kakovosti tudi drugih geografsko zaščitene sirov, za katere so nujne dodatne raziskave. Poleg tega bodo rezultati pripomogli k večji prepoznavnosti samega Nanoškega sira kot specifičnega in edinstvenega izdelka ter objektivni oceni njegove kakovosti, prepoznavnosti in avtentičnosti.

1.2 NAMEN DELA

Namen naloge je bil identificirati HOS, ki določajo aromatski profil konzumno zrelega Nanoškega sira in prispevajo k oblikovanju njegove arome, njihove vrednosti pa smo primerjali tudi v odvisnosti od sezone izdelave sira. Razvijanje aromatskega profila smo pri Nanoškem siru spremljali tudi med zorenjem ter ob spreminjanju nekaterih pogojev zorenja (temperatura, količina SK, lokacija zorenja). Navedeni pogoji so določeni s specifikacijo. V manjših dodatnih poskusih smo jih spremenili, ker smo želeli preveriti, kako ti vplivajo na spremembe aromatskega profila Nanoškega sira. V nalogi sta bili vključeni tudi kemijska analiza ter analiza aromatskih profilov krme in mleka z namenom vrednotenja možnega vpliva krme in mleka na končno aromo sira.

S pomočjo literaturnih podatkov smo ovrednotili, katere HOS, ki smo jih identificirali v Nanoškem siru, lahko prispevajo k oblikovanju arome in tako poskušali ugotoviti zvezo med posamezno HOS in aromo. Podatke smo obdelali tudi z različnimi statističnimi pristopi univariatne in multivariatne analize ter predstavili najpomembnejše rezultate opisne statistike.

Vpliv pomembnega tehnološkega postopka, zorenja, kakor tudi vpliv sezone izdelave sira in prehrane živali na oblikovanje aromatskega profila sira predstavljajo temeljno raziskavo, ki je potrebna za razumevanje ključnih dejavnikov v proizvodnji sira, vrednotenje dobljenih rezultatov pa nudi smernice za nadaljnje izboljšave tehnoloških postopkov izdelave sirov. Nanoškemu siru kot predstavniku slovenskih sirov z zaščitnim geografskim poreklom bo raziskava pomenila nadgradnjo in tisto dodano vrednost, ki jo danes kot potrošniki iščemo pri visokokakovostnih izdelkih.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Na oblikovanje značilne arome Nanoškega sira vplivajo številni dejavniki med njimi sezona izdelave, čas zorenja, različni pogoji zorenja (okolje, temperatura). Glede na to pričakujemo, da:

- bo Nanoški sir vseboval določene HOS, ki se bodo po vsebnosti in/ali prisotnosti razlikovale od HOS drugih sirov in ki bodo značilno prispevale k oblikovanju arome Nanoškega sira;
- bodo znotraj aromatskega profila Nanoškega sira opazna sezonsko pogojena nihanja, saj je v poletnem času prisotna tudi paša;
- se bodo vsebnosti določenih HOS med zorenjem spreminjale;
- bodo različni pogoji zorenja vplivali na oblikovanje aromatskega profila Nanoškega sira.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANOŠKI SIR

Nanoški sir je dobil ime po planoti Nanos, ki se dviga nad Vipavsko dolino na njeni SV strani. Nanos je ena od najvišjih planot znotraj geografskega območja, na katerem potekata prireja mleka in proizvodnja Nanoškega sira. Začetki sirarstva na nanoški planoti segajo v 16. stoletje, Nanoški sir pa se po veljavni specifikaciji izdeluje od leta 1986. Tradicija izdelave sira ter specifična sestava tal in geo-klimatski pogoji so oblikovali Nanoški sir, kakršnega poznamo danes (Nanoški sir GIZ, 2013).

Nanoški sir je bil v preteklosti že predmet nekaterih raziskav. Rondič (1996) je ugotovila, da je površinska mikrobiota Nanoškega sira zelo pestra ter potrdila prisotnost kvasovk, ki jih sicer najdemo na grozdju, kar sovпада z dejstvom, da poteka proizvodnja Nanoškega sira v vinorodnem okolišu. Mohar Lorbeg (2008) je proučevala fenotipsko in genotipsko raznolikost enterokokov iz tradicionalnih slovenskih sirov, med katere spada seveda tudi Nanoški sir. Tompa (2005) pa je v svoji študiji v tradicionalnih slovenskih sirih potrdil prisotnost nekaterih terpenov, ki izvirajo iz krme.

Nanoški sir je trdi sir za rezanje v obliki hlebca premera 32–34 cm, višine 7–12 cm, teže 8–11 kg. Po zorenju mora sir vsebovati najmanj 60 % suhe snovi ter najmanj 45 % maščobe v suhi snovi. Skorja sira je rumena z odtenkom opečnato rdeče do rjave barve, ponekod so lahko vidne sledi plesni kot posledica klasičnega zorenja. Skorja je gladka, suha, brez razpok in poškodb. Oblika hlebca je rahlo zaobljena. Na prerezu je sir intenzivno rumene barve, testo je elastično, gibko, prožno, gladko in čvrsto, v testu so lahko redko posejana drobna do srednje velika očesa nepravilnih oblik. Vonj sira je čist, malo intenziven, okus pa rahlo pikanten, prijetno slan in intenziven (Nanoški sir GIZ, 2013). Poleg tega Rondič (1996) v svoji študiji trdi, da sta vonj in okus sladka in spominjata na okus orehov.

Lokalne značilnosti, ki oblikujejo specifične lastnosti Nanoškega sira, so skupek vseh dejavnikov, ki vplivajo na proizvodnjo krme, na surovo mleko, prirejeno na območju izdelave Nanoškega sira ter na sam tehnološki postopek izdelave sira. Izdelava Nanoškega sira je kontrolirana od začetne do končne faze – od prehrane krav do končnega izdelka. Vse stopnje proizvodnje Nanoškega sira morajo potekati na zaščitenem območju (Nanoški sir GIZ, 2013), saj nosi oznako zaščitenega geografskega porekla ter označbo porekla v EU.

2.1.1 Definicija geografskega območja

Prireja mleka, namenjenega za predelavo v Nanoški sir, poteka znotraj geografskega območja, ki je omejeno na kraško območje z Vipavsko dolino, Trnovsko planoto in okolico Krasa ter Postojnske kotline. Znotraj geografskega območja za prirejo mleka se

nahaja omejeno geografsko območje proizvodnje Nanoškega sira (predelava mleka v Nanoški sir), ki poteka v zgornjem delu vinorodnega okoliša Vipavske doline na območju doline reke Močilnik od Lozic do Vipave in doline reke Vipave od Vipave do Ajdovščine. Proizvodnja Nanoškega sira mora biti locirana na nadmorski višini do 500 m, do katere na geografskem območju uspeva tudi vinska trta. Vpliv mikrobiote vinorodnega območja pa je najmočnejše izražen med zorenjem Nanoškega sira (Nanoški sir GIZ, 2013).

2.1.2 Tehnološki postopek izdelave Nanoškega sira

Tehnološki postopek izdelave Nanoškega sira lahko, podobno kot je to navedeno v specifikaciji (Nanoški sir GIZ, 2013), opišemo v 10-ih korakih (Slika 1).

PRIREJA MLEKA (korak 1)

Mleko za Nanoški sir mora biti prirejeno na kmetijah znotraj definiranega geografskega območja, vsaj 80 % mleka pa mora biti od krav rjave pasme. Rjava pasma goveda je s svojimi lastnostmi najbolj prilagojena za izkoriščanje naravnih pogojev za prirejo mleka za Nanoški sir na tem območju. Najpomembnejše prednosti te pasme pa so dobro izkoriščanje velikih količin voluminozne krme za prirejo kakovostnega mleka za Nanoški sir, odpornost in krepkost, v primerjavi z nekaterimi drugimi mlečnimi pasmami pa je za mleko krav rjave pasme značilna višja vsebnost beljakovin in maščob (Nanoški sir GIZ, 2013). Poleg tega ima večjo frekvenco alela B za κ -kazein v primerjavi z drugimi mlečnimi pasmami, na primer s črno-belo pasmo, ki se najpogosteje uporablja za prirejo mleka. Genotip κ -kazeina (BB) pa je najboljša varianta z vidika izplena sira, krajšega časa koagulacije in čvrstjega koaguluma (Potočnik in sod., 2013).

Krave smejo biti krmljene z voluminozno krmo z geografskega območja. V obroku morajo dobiti najmanj 75 % suhe snovi obroka iz osnovne voluminozne krme, ki je lahko travna paša in različne stopnje sušene trave od silaže do sena, silaža vseh žitaric in koruze, silaža sudanske trave in krmnega sirka. V primeru pomanjkanja osnovne voluminozne krme na geografskem območju zaradi naravnih nesreč se lahko poveča delež močnih krmil s 25 % obroka na 35 % obroka (Nanoški sir GIZ, 2013).

LOČENO ZBIRANJE IN PREDELAVA SUROVEGA MLEKA (korak 2)

Za vsako serijo sira se mora zbrati mleko vsaj dveh molž. Če je za serijo namenjeno mleko večjega števila molž, med prvo molžo in toplotno obdelavo mleka ne sme preteči več kot 72 ur.

TOPLOTNA OBDELAVA (korak 3)

Toplotna obdelava mleka poteka na nizki temperaturi in sicer se surovo mleko toplotno obdela s segrevanjem na temperaturo od 63 °C do 69 °C (Nanoški sir GIZ, 2013) 40 sekund (Rondič, 1996).

OBDELAVA MLEKA PRED SIRJENJEM (korak 4)

Pred sirjenjem se mleku uravna temperaturo na 32 °C do 34 °C. Ko je temperatura stabilna, se mu med mešanjem doda SK, ki vsebuje mlečnokislinski bakteriji (MKB) *Streptococcus thermophilus* (*Str. thermophilus*) in *Lactobacillus helveticus* (*Lb. helveticus*), v tej fazi pa se mleku lahko doda tudi encimski preparat lizocim. Nato se mleko v sirarskem kotlu meša toliko časa, da se SK in encimski preparat dobro raztopita in enakomerno porazdelita po celotni količini mleka. Mešanje prekinemo, ko na površini mleka ni več vidnih neraztopljenih zrn SK.

SIRJENJE MLEKA IN OBLIKOVANJE SIRNEGA ZRNA (korak 5)

Mleko se siri z dodatkom mikrobiološkega sirišča, ki je 100 % himozin. Količina dodanega sirišča je odvisna od lastnosti mleka, temperature sirjenja in moči sirišča. Raztopino sirišča se vlije v mleko v sirarskem kotlu in dobro premeša. Mešanje se prekine in počaka, da mleko koagulira približno. Čas koagulacije traja 30–40 minut. Optimalno čvrstost koagulumu ugotavljamo z roko. Ko se koagulum med prsti školjkasto lomi, ga začnemo takoj obdelovati.

Obdelava koagulumu je namenjena izdelavi sirnega zrna, izvedemo pa jo v fazah predsirjenja in dosirjenja. V fazi predsirjenja gre za rezanje koagulumu in drobljenje, v fazi dosirjenja pa za dogrevanje in sušenje sirnega zrna pri 45–50 °C. Sirno zrno sušimo pri temperaturi dogrevanja do ustrezne suhosti oz. »klenosti«. Klenost sirnega zrna preverimo s svaljkom sirnine, ki se mora zlepti, z drgnjenjem med dlanmi pa ponovno razpasti na posamezna zrna.

OBLIKOVANJE SIRA (korak 6)

Kleno sirno zrno ločimo od sirotke in oblikujemo sirno pogačo. Ko je pogača dovolj suha, da jo lahko režemo, jo razdelimo na tako velike kose, da jih lahko zložimo v okrogla oblikovala premera 35 cm in višine 15 cm.

STISKANJE IN ZORENJE SVEŽEGA SIRA (korak 7)

Sveži sir v oblikovalih obtežimo in stiskamo toliko časa, da je sir ob koncu te stopnje dovolj suh, da ima trdno obliko in gladko površino. Med stiskanjem sir večkrat obrnemo. Fermentacijo sira spremljamo z merjenjem vrednosti pH sira in jo prekinemo, ko je pH 5,4–5,0.

SOLJENJE (korak 8)

Po končani fermentaciji vsak hlebec sira na eni strani označimo s številko serije – šaržno številko (datum in mesec). Označene hlebce zložimo v slanico tako, da je na vseh hlebcih označba serije na isti strani. Za soljenje lahko uporabljamo slanico, pripravljeno iz morske soli v koncentraciji 18–24 %, s temperaturo od 11 °C do 18 °C in vrednostjo pH od 4,9 do 5,4. Hlebce solimo 3 dni, med soljenjem jih dnevno obrnemo, da se enakomerno presolijo.

ZORENJE (korak 9)

Zorenje mora potekati v zgornjem delu vinorodnega okoliša Vipavske doline v zorilnici, ki je locirana na nadmorski višini do 500 m. Po tridnevnem soljenju se hlebce sira vzame iz slanice in zloži na odcejalne deske, da se osušijo na površini. Ko je površina sira dovolj suha, se sir preloži na lesene deske in odpelje v zorilnico s klimatskimi pogoji od 80 % do 90 % relativne vlažnosti zraka in temperaturi od 9 °C do 15 °C. Nanoški sir zori najmanj 60 dni oziroma dokler v siru ni dosežena najmanj 60 % suha snov in najmanj 45 % maščobe v suhi snovi. Prvih 14 dni zorenja se sir briše in obrača vsake tri dni. Po tem času se sir obrne vsaj enkrat tedensko, obriše se ga po potrebi z namenom, da se plesen na površini preveč ne razrase.

SELEKCIJA SIRA, SENZORIČNO OCENJEVANJE SIRA, KEMIJSKE ANALIZE IN OZNAČEVANJE (korak 10)

Ko so doseženi minimalni kemijski parametri glede procenta suhe snovi in maščobe v suhi snovi, se opravi selekcija hlebcev glede na njihov zunanji izgled. Izloči se vse hlebce sira, ki ne ustrezajo normativu. Od hlebcev sira, ki ustrezajo specifikaciji glede višine, se vzame enega, ki se ga opere in pripravi za senzorično ocenjevanje. Sir senzorično ocenjuje najmanj tričlanska komisija. Vsak ocenjevalec oceni sir individualno, posamezni rezultati se obdelajo in izračuna se povprečna ocena, ki velja za posamezno serijo.

Po poteku minimalnega roka zorenja se vzorec sira posamezne proizvodne serije analizira na vsebnost suhe snovi in maščobe v suhi snovi. Po dosegu min. suhe snovi in maščobe v suhi snovi lahko sir še nadalje zorimo na enakih pogojih, lahko ga operemo in skladiščimo na nekoliko nižji temperaturi, kjer počaka do prodaje. Siri, ki ustrezajo kriterijem za označitev z znakom Nanoški sir, se pred prodajo ali razrezom žigosajo z znakom Združenja proizvajalcev Nanoškega sira, ki je prikazan z narciso in napisom »Nanoški sir«. Znak se vtisne na površino hlebca sira tako, da je po razrezu na posameznem izseku del znaka. Vsak kos predpakiranega sira mora biti označen tudi z oznako serije. Nanoški sir se označi tudi s pripadajočim znakom Skupnosti ter nacionalnim simbolom kakovosti.

Stopnja	Glavne značilnosti posamezne stopnje
1. Prireja mleka	- Prireja mleka na geografskem območju - Min. 80 % mleka krav rjave pasme - Hranjenje živine z naravnimi krmili - Upoštevanje sanitarnih predpisov
2. Zbiranje in predelava surovega mleka	- Ločeno zbiranje in predelava surovega mleka za Nanoški sir
3. Toplotna obdelava	- Toplotna obdelava na nizki temperaturi pasterizacije od 63 °C do 69 °C - termizacija
4. Obdelava mleka pred sirjenjem	- Dodajanje starterske kulture in lizocima - Mešanje mleka
5. Sirjenje in oblikovanje sirnega zrna	- Sirjenje mleka - Oblikovanje sirnega zrna
6. Oblikovanje sira	- Oblikovanje sira - Razrez in oblikovanje sira
7. Stiskanje in zorenje svežega sira	- Stiskanje in oblikovanje svežega sira - Zorenje in mikrobiološka fermentacija
8. Soljenje	- Označevanje sira - Soljenje sira 3 dni in vsakodnevno obračanje
9. Zorenje	- Sušenje - Najmanj 60 dnevno zorenje - Ročna nega sira
10. Selekcija sira, senzorično ocenjevanje, kemične analize in označevanje	- Selekcija sira glede na zunanji izgled kolotov - Senzorična analiza - Kemična analiza - Označevanje

Slika 1: Diagram poteka izdelave Nanoškega sira (Nanoški sir GIZ, 2013: 7)

Figure 1: Flowchart of Nanos cheese production (Nanoški sir GIZ, 2013: 7)

2.2 DOLOČANJE AROME SIRA

Aroma sira je skupek zaznav, ki jih ljudje zaznamo ob uživanju sira in so lahko prijetne, manj prijetne, tipične ali nespecifične (Charve, 2011). Ob zaužitju hrane pride do interakcija okusa, vonja in teksture do skupnega občutka, ki ima v angleščini izraz »flavour«. Prijeten vonj včasih označujemo z besedo aroma. Sicer izraz aroma obsega skupen občutek za okus in vonj, ki ga zaznamo nazalno in retronazalno (Belitz in sod., 2009). Razlike v definiranju zaznavanja okusa in arome niso povsem jasne. Ponekod se tudi izraze za aromo, okus in »flavour« (interakcija okusa, vonja in teksture) uporablja kot sopomenke (Alewijn, 2006). Aromatične snovi so HOS, ki jih zaznamo z receptorji za vonj (Belitz in sod., 2009), vendar le nekatere HOS prispevajo h končni aromi sira (Curioni in Bosset, 2002).

Receptorji za vonj se nahajajo v olfaktornem tkivu v nosni votlini. Aromatične snovi dosežejo te receptorje, ko se sprostijo skozi nos (ortonozalna detekcija) ali preko grla, ko se sprostijo po žvečenju (retronazalna detekcija). Poleg tega lahko HOS pridejo do olfaktornih receptorjev preko krvi, in sicer difundirajo iz kapilar v nosni votlini (Belitz in sod., 2009). Končna aroma sira je odvisna od koncentracije in deleža hlapnih in nehlapnih aromatičnih snovi, ki so prisotne v siru (Poveda in sod., 2008). Pri končni aromi je poleg koncentracije posamezne snovi pomemben še vzdražnostni prag posamezne spojine oziroma snovi. Vzdražnostni prag je najnižja koncentracija snovi, ko še zaznamo njen vonj (Belitz in sod., 2009). Končno tipično aromo določenega sira oblikujejo številne komponente, ki morajo biti prisotne v določeni koncentraciji in ustreznem ravnotežju (Collins in sod., 2003).

HOS, ki so sestavni del arome, dajejo siru specifičen vonj (Charve, 2011), poleg tega pa omogočajo nedvoumno razlikovanje mlečnih izdelkov. Kromatografska analiza hlapnih snovi je ena pomembnejših metod določanja kakovosti hrane (Abilleira in sod., 2010a). S pomočjo instrumentalne analize razrešujemo aromatske profile oziroma aromagrame. Senzorična analiza je pri določanju kakovosti izdelka nenadomestljiva in nam omogoča odlično dopolnjevanje instrumentalne analize. Pomembna je tudi zato, ker spada h kriterijem, ki vplivajo na potrošnikovo izbiro (Perotti in sod., 2009).

Določanje arome, ki temelji na kemijski analizi, je bilo vedno v interesu tako raziskovalcev kot proizvajalcev hrane, saj bi lahko služilo kot alternativa ali dopolnilo senzoričnega ocenjevanja. Večina HOS je v siru prisotna v sledovih, zato je potrebno te snovi najprej izolirati in koncentrirati z eno izmed ekstrakcijskih tehnik. Temu nato sledi identifikacija HOS (Gioacchini in sod., 2010).

Analiza nekaterih aromatičnih snovi je odvisna od metode ekstrakcije, zato je pomembno, katero ekstrakcijsko tehniko uporabimo, da zajamemo kar najbolj reprezentativno mešanico aromatičnih komponent sira. Vsaka ekstrakcijska tehnika ima prednosti in slabosti (Curioni in Bosset, 2002). Analiza aromatičnih snovi po klasičnih

metodah vključuje koncentracijsko-ekstrakcijske tehnike, kot so vakuumaska destilacija, ekstrakcija tekoče-tekoče ter v zadnjem času tudi tehniko »izpihni in ujemi« (angl. Purge and Trap; PT). V nasprotju z naštetimi tehnikami je trdno-fazna mikroekstrakcija oziroma ekstrakcija na mikrovlaknih (angl. Solid Phase Microextraction, SPME) poceni, enostavna in hitra metoda brez uporabe topil (Frank in sod., 2004). Tehniko SPME je vpeljal Pawliszyn v 90. letih prejšnjega stoletja (1990), v raziskave HOS na področju sirov pa Chin in sod. (1996). Ta tehnika vključuje absorpcijo analitov na posebno vlakno, ki vsebuje različne stacionarne faze oz. vrste nanosa na vlakno (Tomba, 2005; Panseri in sod., 2009). Sicer je tehnika SPME manj občutljiva v primerjavi s tehniko PT, vendar so vlakna bolj učinkovita za ekstrakcijo medija, ki ima višje vrelišče. Tehniko SPME namreč lahko uporabimo pri višjih temperaturah, kar je boljše za ekstrakcijo visoko hlapnih snovi (Gioacchini in sod., 2010). Tomba in sod. (2013) v svoji študiji izpostavijo tudi negativne strani SPME. Moteči dejavnik pri SPME je tekmovanje posameznih hlapnih spojin iz vzorca za vezavo na prosta aktivna mesta na vlaknu, saj imajo prednost tiste spojine z višjo afiniteto. Slabost te metode se izkažejo predvsem pri vzpostavljanju ravnotežja med analitom oziroma HOS in polimerno plastjo SPME vlakna, kjer je količina vezanega analita (npr. določena HOS) odvisna od njegove relativne afinitete do vlakna. Tako je dobljen rezultat ocena realne koncentracije.

SPME se uporablja za koncentracijo hlapnih snovi pri analizah, kjer uporabljajo plinsko kromatografijo ter plinsko kromatografijo v kombinaciji z olfaktometrijo (Frank in sod., 2004). Plinska kromatografija z masnim spektrometrom (GC-MS) je uporabna metoda za identificiranje in kvantificiranje izoliranih aromatičnih snovi, vendar ne določa, ali je posamezna snov aromatično aktivna. Zato uporabljajo tudi plinsko kromatografijo v kombinaciji z olfaktometrijo (GC-O). Pri tej tehniki uporabljajo nos kot detektor za določanje aromatične aktivnosti spojine. Nos je namreč zelo občutljiv detektor, saj zazna do 10^{-19} molov določenega vonja (Curioni in Bosset, 2002).

2.3 HLAPNE ORGANSKE SPOJINE V SIRU PO FUNKCIONALNIH SKUPINAH

HOS v siru lahko razdelimo v različne kemijske skupine: maščobne kisline (MK), ketone, alkohole, estre in aldehide. Poleg omenjenih skupin, ki imajo običajno po več predstavnikov, pripadajo HOS še drugim skupinam (Curioni in Bosset, 2002). Nekateri omenjajo še ogljikovodike (Fernández-García, 2002a; Gioacchini in sod., 2010), laktone, furane, N-vsebujoče snovi, pirazine, terpene, S-vsebujoče snovi in fenole (Curioni in Bosset, 2002). Razen terpenov smo te komponente združili v skupino ostale HOS, saj smo v Nanoškem siru identificirali le nekaj predstavnikov iz teh ostalih skupin.

MK so lahko že same aromatično aktivne, poleg tega pa so tudi prekurzorji za številne druge aromatične snovi. Med njimi so pomembni metil-ketoni, iz katerih lahko

nastanejo sekundarni alkoholi (Curioni in Bosset, 2002). Med zorenjem sira nastanejo estri z esterifikacijo kratkih in srednje-verižnih MK ter primarnih in sekundarnih alkoholov (Gioacchini in sod., 2010). MK so prekursorji tudi za nekatere aldehide. Poleg tega so v siru prisotni tudi aldehidi, ki izvirajo iz aminokislin (AK). Za terpene je dokazano, da se v sir prenesejo iz krme (Curioni in Bosset, 2002).

2.3.1 Maščobne kisline

Mlečna maščoba, ki je sestavljena iz različnih maščobnih kislin (MK) (Collins in sod., 2003), pomembno vpliva na razvoj arome v siru (McSweeney in Sousa, 2000). Na mlečno maščobo vplivata tudi obdobje laktacije in prehrana (Urbach, 1990), zato sta njena vsebnost in sestava variabilni. Kratko- in srednjeveržne MK (C_4 - C_{10} in C_{16}) se sintetizirajo v mlečni žlezi iz acetata in β -hidroksibutirata, ki nastaneta zaradi aktivnosti vampnih bakterij. Predvsem dolgoveržne MK se lahko prenesejo iz krme v mlečno žlezo (Zhang in sod., 2011).

Vsebnost mlečne maščobe je pomemben parameter pri analizi profila MK (Perotti in sod., 2009). MK so vezane v trigliceride, ki so estri glicerola in treh MK. Poleg vezanih MK so v mleku tudi proste MK, ki lahko nastanejo v procesu lipolize trigliceridov (Collins in sod., 2004). Med MK je približno 70 % nasičenih ter 30 % nenasičenih MK (Lindmark Månsson, 2008). Choisy (2000b) pa še navaja, da je od vseh MK 65 % nasičenih MK s 4:0 do 20:0. V mlečni maščobi prežvekovalcev so identificirali kar 437 različnih MK (Collins in sod., 2003), prevladujejo pa MK z 2 do 20 C-atomi (Alewijn, 2006). Med MK po vsebnosti prevladujejo butanojska, heksanojska, oktanojska, dekanoska, dodekanojska, tetradekanojska, *cis*-9-oktadecenojska, *cis*-9,12-oktadekadienojska in 9,12,15-oktadekatrienojska kislina, med njimi pa je največ heksadekanojske (palmitinska) in oktadekanojske (oleinska) kisline, ki predstavljata kar 25 % oz. 27 % vseh lipidov (Collins in sod., 2003).

Proste MK so v sirih pomembna skupina aromatičnih snovi. Poleg tega so MK tudi prekursorji za druge HOS kot so metil ketoni, alkoholi, aldehidi, laktoni in estri (Curioni and Bosset, 2002). Na vsebnost prostih MK v sirih vplivajo tudi drugi tehnološki dejavniki, kot je na primer izdelava sira iz surovega mleka ter vrsta uporabljenega sirišča (Abilleira in sod., 2010b).

Med zorenjem sira nastajajo proste MK, ki so v glavnem rezultat treh različnih biokemijskih poti in sicer lipolize, proteolize in fermentacije laktoze (Curioni and Bosset, 2002). Največ prostih MK nastane pri lipolizi (Delgado in sod., 2011) mlečne maščobe (Verzera in sod., 2010). Krajše proste MK lahko nastanejo tudi pri oksidaciji ketonov, estrov in aldehydov (Molimard in Spinnler, 1996). Prosta butanojska kislina lahko nastane na različne načine, saj lahko izvira iz maščobe (lipoliza), beljakovin ali iz ogljikovodikov (fermentacija laktata) (Alewijn, 2006). Poleg butanojske nastanejo pri lipolizi še pentanojska, heksanojska, heptanojska, oktanojska, nonanojska, dekanoska

in undekanojska. Ocetna in propanojska kislina nastaneta v metabolizmu laktata kot posledica delovanja mikroorganizmov (Delgado in sod., 2011). V fermentaciji laktata ali mlečne kisline, odvisno od vrste mikroorganizmov, lahko poleg butanojske nastane še mravljinčna kislina (metanojska kislina) (Choisy in sod., 2000b), 2-metil in 3-metil butanojska kislina pa nastaneta iz prostih AK (Delgado in sod., 2011).

Nekatere proste MK so lahko posledica delovanja različnih mikroorganizmov (MKB, plesni). MKB, ki jih dodamo kot SK imajo v primerjavi s plesnimi veliko slabšo sposobnost razgradnje maščobe, saj so slabi lipoliti (Curioni in Bosset, 2002). Plesni razgrajujejo trigliceride, iz katerih se sprostijo predvsem MK, ki imajo med 4 in 20 C-atomi. Choisy in sod. (2000b) pa navajajo, da samo proste MK s 6 ali več C-atomi izvirajo iz lipolize.

Dolgoverižne MK (z več kot 12 C-atomi) ne vplivajo toliko na aromo, saj imajo zelo visok prag zaznave. V nasprotju z njimi imajo kratkoverižne MK (C_4 - C_{12}) precej nižji prag zaznave in tako lahko pomembno oblikujejo končno aromo v siru. H kratkoverižnim MK, ki značilno vplivajo na aromo sira, spadajo pentanojska (valerična), heksanojska (kapronska), dekanoska (kaprinska), dodekanojska (lavrinska) ter oktanojska (kaprilna) kislina. Slednja še posebej oblikuje značilno aromo po kozah v kozjem siru (Curioni in Bosset, 2002).

Predvsem razvejane MK so še posebej pomembne za aromo v kozjih in ovčjih sirih, kot na primer 2-metil in 3-metil-butanojska kislina (izovalerična), za kateri je značilna sadna nota (Sympoura in sod., 2009) oziroma nota po siru (Frank in sod., 2004). Za aromo pri kozjem siru naj bi bili odgovorni tudi 4-metil oktanojska ter 4-etil oktanojska kislina (Morgan in Gaborit, 2001).

2.3.2 Ketoni

Pri večini mlečnih izdelkov so ketoni pomembna skupina HOS, ki oblikujejo končno aromo (Curioni in Bosset, 2002). Pri sirih bi lahko predstavnike te skupine razdelili v podskupine, in sicer na diketone (npr. diacetil), nenasičene ketone (npr. 8-nonen-2-on) ter metil ketone (2-heptanon) (Alewijn, 2006). Za ketone (še posebej za podskupino metil ketonov) je značilno, da imajo poseben vonj ter nizek vzdražnostni prag. Njihova nota naj bi bila sadna, cvetna in hkrati zatohla. Pripisujejo jim tudi noto po zeliščih (Curioni in Bosset, 2002).

Metil ketoni lahko nastanejo v encimatsko katalizirani oksidaciji prostih MK (Slika 6) (McSweeney in Sousa, 2000). Slednje se najprej oksidirajo preko β -ketoacil koencima-A (Schulz, 1991) do β -ketokislin (McSweeney in Sousa, 2000). V β -oksidaciji se skrajša veriga za acilni ostanek (Alewijn, 2006). Sledi dekarboksilacija, kjer se odcepi en C-atom (McSweeney in Sousa, 2000). Iz nasičene MK (C_{2n}) nastane metil keton (C_{2n-1}) (Choisy in sod., 2000b). Končna koncentracija metil ketonov je odvisna od

lipolize (Fox in sod., 2000) oziroma od intracelularnih prostih MK. Metil ketoni naj bi nastali tudi v neencimatski poti (npr. zaradi segrevanja), vendar je bolj poznana encimatska pot nastanka ketonov (Alewijn, 2006).

Na nastanek metil ketonov lahko vplivamo tudi z dodatkom nekaterih SK, ki vsebujejo plesni, saj imajo plesni, v primerjavi z MKB, precej bolj izraženo lipolitično aktivnost. Ugotovili so, da lahko, tako spore plesni kakor tudi vegetativni micelij, producirajo metil ketone (Collins in sod., 2003).

Visoka vsebnost metil ketonov je navadno značilna za sire s plesnijo ter večino trdih tipov sirov (Verzera in sod., 2004). Plesni iz rodu *Penicillium* predstavljajo 60–80 % vseh plesni, ki so prisotne na površini trdih sirov (Rondič, 1996). Prav za ta rod plesni navajajo, da prispeva k nastanku metil ketonov. Ostali ketoni nastanejo med zorenjem iz citrata, proteinov ali pa so bili že prisotni v samem mleku (Alewijn, 2006).

Na končni profil ketonov vplivajo različni dejavniki, kot so koncentracija različnih MK, potek lipolize, lastnosti mlečne maščobe (Choisy in sod., 2000b), temperatura, pH, fiziološko stanje plesni in prisotnost spor (Fox in sod., 2000).

2.3.3 Alkoholi

V siru prisotni alkoholi nastanejo v različnih biokemijskih poteh in sicer pri metabolizmu laktoze (Curioni in Bosset, 2002), fermentaciji citrata (Bugaud in sod., 2001), redukciji metil ketonov (Curioni in Bosset, 2002), redukciji aldehydov (Alewijn, 2006) ter razgradnji linolne in linolenske kisline (Curioni in Bosset, 2002).

Etanol je eden izmed produktov metabolizma laktoze (McSweeney, 2004; Cakmakci in sod., 2012). Nastane lahko tudi pri fermentaciji citrata (Bugaud in sod., 2001) ali katabolizmu AK (McSweeney, 2004; Cakmakci in sod., 2012).

Pri redukciji metil ketonov (npr. 2-heptanon) nastanejo ustrezni sekundarni alkoholi (npr. 2-heptanol) (Delgado in sod., 2011), ki imajo podobno aromatično noto kot njihovi prekurzorji metil ketoni (Urbach, 1997). Na tak način naj bi nastali alkoholi z več kot 4-C atomi, medtem ko kratkoveržni alkoholi nastanejo pri fermentaciji citrata (Bugaud in sod., 2001). Redukcija metil ketonov do alkoholov se odvija zaradi aktivnosti številni heterofermentativnih laktobacilov in vrst iz rodu *Leuconostoc* (Maconi in Aragozzini, 1989), poleg tega naj bi potekala s pomočjo encima dehidrogenaze (Delgado in sod., 2011).

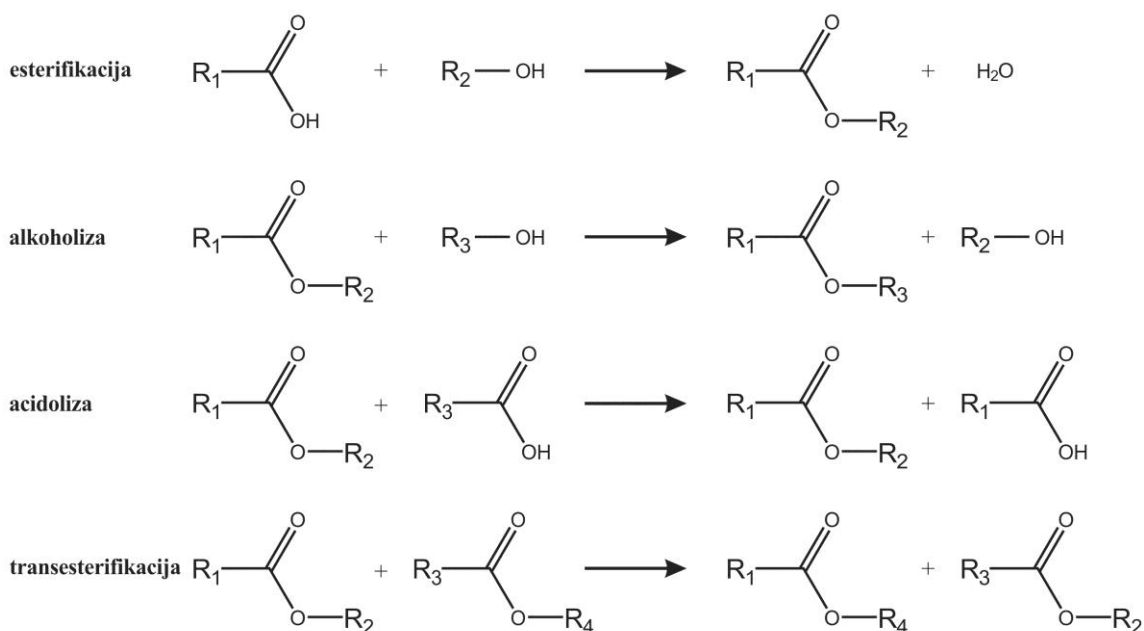
Primarni alkoholi nastanejo z redukcijo aldehydov (Abilleira in sod., 2010b). Delgado in sod. (2011) še navajajo, da so razvejeni primarni alkoholi rezultat redukcije aldehydov, ki nastanejo iz leucina.

2.3.4 Estri

Frank in sod. (2004) so iz sira izolirali 35 estrov, ki so v sirih pogoste HOS, medtem ko sta McSweeney in Sousa (2000) v ementalnem siru identificirala kar 40 različnih estrov. Večinoma so estri sestavljeni iz prevladujočih alkoholov (metanol, etanol) ter srednje in dolgoveržnih MK (Alewijn, 2006). Prisotni so že v samem mleku, saj nastanejo v mlečni žlezi (Toso in sod., 2002).

Estri nastajajo tudi med zorenjem sira in sicer z esterifikacijo kratkih in srednjeveržnih MK ter primarnih in sekundarnih alkoholov (Gioacchini in sod., 2010). Proces je reverzibilen (Alewijn, 2006). Najpogostejše dostopen alkohol, udeležen v esterifikaciji, je etanol.

Tioestri, analogi estrov, nastanejo v reakciji prostih MK s sulfhidrilno skupino, običajno gre za metanetiol (McSweeney, 2004). Liu in sod. (2004) dodajajo, da estri oziroma njihove transformacije nastanejo poleg esterifikacije prostih MK z alkoholi še po drugih poteh in sicer z alkoholizo estrov (zamenjava alkoholnega dela z drugim alkoholom), z acidolizo (prenos OH skupine estra na drugo prosto MK) ter s transesterifikacijo (Slika 2). Vse to poteka poleg drugih encimov tudi s pomočjo lipaz. Poleg tega nastanejo nekateri estri (npr. etil-3-metilbutanoat) v metabolizmu AK oziroma pretvorbi AK kot so metionin, fenilalanin, treonin ter razvejene AK (Smit in sod., 2005).



Slika 2: Nastanek estrov in njihove spremembe (Alewijn, 2006: 27)

Figure 2: Mechanisms for ester formation and modification (Alewijn, 2006: 27)

V sintezo estrov naj bi bile vključene esteraze, ki so prisotne v številnih mikroorganizmih, npr. kvasovkah in bakterijah (laktokoki, laktobacili, mikrokokci,

korineformne bakterije, enterokoki) (Choisy in sod., 2000a). Največjo sposobnost tvorbe estrov imajo med mikroorganizmi kvasovke (Gioacchini in sod., 2010), ki imajo na primer pri trdih sirih velik pomen predvsem na začetku zorenja (Rondič, 1996). Rondičeva (1996) je tudi ugotovila, da se je število kvasovk na površini Nanoškega sira med zorenjem povečevalo. Alewijn (2006) pa trdi, da naj bi imele bakterijske esterase glavno vlogo pri tvorbi in hidrolizi estrov. Encimatska aktivnost MKB, ki povzroči nastanek estrov, je zelo različna. Manjša količina estrov lahko nastane tudi po neencimski poti.

Za nastanek estrov je pomembna ustrezna vodna aktivnost, ki naj bi bila med 0,70 in 0,90. Poleg vodne aktivnosti vplivajo na nastanek estrov še vrednost pH, prisotnost alkoholov, encimov in prekursorjev (kislin) (Alewijn, 2006). Predvsem etanol naj bi bil limitirajoči reaktant pri esterifikaciji (McSweeney, 2004).

Med zorenjem narašča število mikroorganizmov in njihovih encimov, ki imajo pomembno vlogo pri nastanku estrov. Poleg tega naj bi bilo več estrov v sirih iz surovega mleka kot pa v sirih iz pasteriziranega mleka (Gioacchini in sod., 2010).

Večini estrov pripisujejo sladko, sadno noto ter noto po rožah. Etil estri imajo še posebej pomembno vlogo pri oblikovanju sadne note v sirih (Curioni in Bosset, 2002). Kratkoverižnim estrom pripisujejo noto po jabolkih in ananasu, dolgoverižnim pa sadno, cvetno, vinsko, voskasto/milno noto ter noto po žganju (Alewijn, 2006). Nekateri od teh estrov imajo zelo nizek prag zaznave. Poleg tega naj bi estri zmanjševali ostrino in grenkobo arome, ki nastane zaradi MK (Curioni in Bosset, 2002; Liu in sod., 2004) in aminov (Curioni in Bosset, 2002). Predvsem prisotnost nerazvejenih etil estrov nerazvejenih MK z 2 do 10-C atomi je bila že večkrat potrjena v različnih sirih (Liu in sod., 2004). V siru so tako identificirali metil, propil in butil estre (McSweeney, 2004). Estri, ki pomembneje vplivajo na aromo, so etil butanoat (z aromo po sadju, jabolkih), etil pentanoat (z aromo po meloni in drugem sadju) ter etil heksanoat (z aromo po agrumih in meloni) (Frank in sod., 2004). Pri nekaterih sirih k nastanku arome pomembno prispevajo še etil oktanoat ter razvejan ester etil-3-metilbutanoat. Pomemben aromatski ester je fenil acetat, ki prispeva v sirih k noti po rožah (Curioni in Bosset, 2002).

Prevelika koncentracija estrov naj bi vplivala na neustrezno poudarjeno sadno noto (Alewijn, 2006), kar se smatra kot napako pri določenih sirih. Kljub temu je nekaterim potrošnikom še posebej všeč sir s takšno aromo (McSweeney in Sousa, 2000).

2.3.5 Aldehidi

Aldehidi, tako razvejeni kot nerazvejeni, nastajajo tudi med zorenjem (Curioni in Bosset, 2002). Kratki razvejeni aldehidi izvirajo predvsem iz AK, medtem ko daljši aldehidi izvirajo iz MK (Alewijn, 2006).

Aldehidi, ki izvirajo iz AK, nastanejo v Streckerjevi razgradnji (Gioacchini in sod., 2010). Pri tem se na začetku zorenja, ko je vrednost pH nižja, AK najprej dekarboksilirajo do aminov. Amini so organske spojine s funkcionalno skupino, ki vsebuje dušikov atom s parom neveznih elektronov. Med zorenjem se vrednost pH dvigne in amini se v Streckerjevi razgradnji oksidirajo do aldehydov (McSweeney in Sousa, 2000).

Nerazvejeni aldehidi pa nastanejo v β -oksidaciji nenasičenih MK (Gioacchini in sod., 2010). Npr. 2-dekanal, 2-undekanal, oktanal in nonanal lahko nastanejo v avtooksidaciji oleinske kisline. Med reakcijo najprej nastane vmesni produkt hidroksiperoxid in šele nato iz njega nastanejo aldehidi (Alewijn, 2006). Aldehidi so v sirih prehodne komponente, saj se lahko hitro reducirajo do primarnih alkoholov ali celo oksidirajo do določenih kislin (Curioni in Bosset, 2002).

Nastanek aldehydov pa je lahko tudi posledica delovanja mikrobioloških encimov. Ugotovili so, da naj bi npr. encimi, ki jih tvori bakterija *Str. thermophilus*, katalizirali nastanek določenih aldehydov (Collins in sod., 2003), aldehidi pa nastanejo tudi po neencimskih poteh (Gioacchini in sod., 2010). Kratki aldehidi nastanejo zaradi mikrobiološke aktivnosti in ne izvirajo iz maščob, medtem ko daljši izvirajo iz maščobe oziroma MK in nastanejo po neencimskih poteh (Alewijn, 2006).

Pri večini trdih tipov sirov je skorja polprepustna, kar vpliva na nižji redoks potencial. Zaradi tega je manj dostopnega kisika, ki bi bil udeležen v oksidaciji in nastanku nekaterih aldehydov. Vendar se z daljšim zorenjem poveča tudi možnost za oksidacijo maščob (Alewijn, 2006).

Za alifatske aldehide je značilna aroma po zeleni travi in zeliščih. Predvsem razvejeni aldehidi imajo običajno pomemben prispevek pri aromi sira. Previsoka koncentracija aldehydov lahko povzroči tudi nezaželeno aromo. Trend vsebnosti aldehydov med zorenjem pa je zelo različen in sicer lahko njihova vsebnost povečuje, zmanjšuje ali pa je konstantna, tako so nekateri prisotni le na začetku zorenja, drugim se vsebnost ne spreminja, vsebnost nekaterih pa se poveča (Gioacchini in sod., 2010).

2.3.6 Terpeni

Terpene uvrščamo med ogljikovodike. Sestavljeni so iz dveh (monoterpeni) ali več izoprenskih enot (seskviterpeni). Izopren je ogljikovodik s formulo $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ (Kirste, 1998). V primeru, da je vezan tudi kisik, jih imenujemo terpenoidi (Terpene ..., 2014). Terpeni spadajo med lipide in jim pripisujejo aromatične lastnosti (Tomba, 2005) ter so glavne substance eteričnih olj (Tornambé in sod., 2006).

V mleku in mlečnih izdelkih izvirajo terpeni iz rastlin, ki jih zaužijejo živali (Bugaud in sod., 2001; Curioni in Bosset, 2002) in so v rastlinah prisotni kot sekundarni metaboliti. Predvsem družine dvokaličnic kot so *Apiaceae* (kobuljnice), *Lamiaceae* (ustnatice) in

Asteraceae (nebinovke) imajo večjo vsebnost terpenov. V družini *Poaceae* (trave), ki so enokaličnice, pa je njihova vsebnost nekoliko nižja. Nekateri trdijo, da so lahko terpeni v siru prisotni tudi zaradi aktivnosti nekaterih plesni iz rodu *Penicillium* (*P. saecifulvum*, *P. camemberti fungis*) (Tornambé in sod., 2006).

Terpeni vplivajo na aromo sira direktno zaradi svojih aromatičnih lastnosti, njihov vpliv v sirih pa je lahko tudi posreden, saj zavirajo delovanje nekaterih mikroorganizmov in tako vplivajo na njihov metabolizem (Cornu in sod., 2009).

Znano je, da so terpeni značilni predvsem za sire iz mleka krav, ki so se pasle na visokogorskih pašnikih (Curioni in Bosset, 2002), kjer raste veliko dvokaličnic (Toso in sod., 2002). Ugotovili so tudi že, da se je vsebnost terpenov med pašno sezono v mleku spreminjala (Tornambé in sod., 2006). Največ terpenov naj bi imela poletna paša, ki je vsebovala več aromatičnih rastlin (Mariaca in sod., 1997). Poleg tega naj bi na vsebnost terpenov v paši oziroma rastlinah vplivali tudi klimatski pogoji. V toplih in suhih pogojih nastaja v rastlinah več sekundarnih metabolitov in eteričnih olj (Tornambé in sod., 2006). Schlichtherle-Cerny in sod. (2007) so ugotovili, da na končni profil terpenov lahko vpliva tudi fermentacija v vampu.

Pogostejše identificirani terpeni v sirih so α -pinen (Curioni in Bosset, 2002; Kalač, 2011), linalol (Curioni in Bosset, 2002), limonen (Gioacchini in sod., 2010; Kalač, 2011).

Poleg tega naj bi bila njihova prisotnost značilna za določeno območje (Cornu in sod., 2005), zato jih nekatere študije navajajo za možne markerje geografskega porekla sira (Curioni in Bosset, 2002). Terpeni so prisotni tudi v senu, vendar je njihova vsebnost manjša v primerjavi s svežo travo oz. pašo (Zeppa in sod., 2004). Tompa (2005) navaja, da se vsebnost terpenov v senu lahko zmanjša zaradi procesa sušenja in hlapnosti spojin. Poleg tega so tudi ugotovili, da ni bilo razlik v vsebnosti terpenov med travno silažo in senom iz istega območja (Kalač, 2011).

Mnenja o vplivu terpenov na končno aromo sira so različna. Čeprav so nekatere študije že dokazale neposredno povezavo med prisotnimi terpeni in njihovim vplivom na aromo sira (Bugaud in sod., 2001), pa drugi trdijo, da sprememba koncentracij terpenov nima neposrednega vpliva na končno aromo sira (Coulon in sod., 2004). Tompa (2005) tudi navaja, da terpeni zaradi nizke koncentracije v siru nimajo neposrednega vpliva na aromo določenega sira.

Terpenom pripisujejo aromo po fermentiranem sadju. V eni izmed študij so ugotovili pozitivno povezavo med oreškasto aromo sira in prisotnostjo nekaterih terpenov (Bugaud in sod., 2001).

Cornu in sod. (2005) navajajo, da bi pasterizacija mleka lahko vplivala na profil terpenov v siru, Buchin in sod. (1998) pa so ugotovili ravno nasprotno, da pasterizacija

mleka ni vplivala na vsebnost terpenov v siru. Poleg že omenjenih dejavnikov, kot so vrsta rastlin, klimatski pogoji, geografska lega, nadmorska višina, sezona, lahko na vsebnost terpenov v sirih vplivajo tudi fizikalni, biokemijski in mikrobiološki dejavniki, ki so vključeni v tehnološki postopek.

2.3.7 Druge snovi

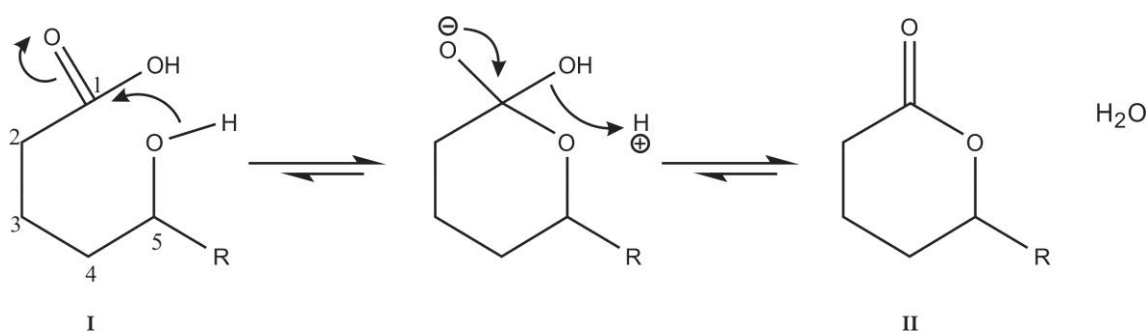
LAKTONI

Laktoni so ciklični estri, med katerimi naj bi nekateri (γ - in δ -laktoni) pomembno prispevali k oblikovanju končne arome tudi na račun njihovega nizkega praga zaznave. V splošnem pa laktone povezujejo z vonjem po breskvi, marelici in kokosu (Curioni in Bosset, 2002). Collins in sod. (2003) navajajo, da lahko nesorazmerne količine laktonov z veliko molekulsko maso vplivajo na žarkost sira. δ -dekalakton je pogost in pomemben aromatičen lakton, ki so ga identificirali v siru (Curioni in Bosset, 2002).

Laktoni so lahko prisotni v mleku, nastajajo pa tudi v času zorenja sira. Poti nastanka laktonov so različne, nekatere so še vedno neraziskane (Alewijn, 2006). Poleg tega je produkcija laktonov odvisna od številnih dejavnikov, kot so segrevanje, lipoliza, prehrana, laktacija, sezona in celo pasma krav. Laktoni so lahko rezultat intramolekularne esterifikacije hidroksi MK (McSweeney in Sousa, 2000; Collins in sod., 2003). Curioni in Bosset (2002) navajata nastanek laktonov kot proces hidrolize hidroksi-MK trigliceridov, temu sledi laktonizacija, to je esterifikacije hidroksi MK. Hidroksi kisline nastanejo lahko že v mlečni žlezi ali pa v procesu lipolize (McSweeney in Sousa, 2000). Laktoni lahko izvirajo tudi iz hidroksi kislin, ki nastanejo z redukcijo keto kislin (Collins in sod., 2003). Alewijn (2006) navaja še nekatere druge teorije nastanka hidroksi MK in sicer z oksidacijo nenasičenih MK. V procesu lipolize se MK najprej sprostijo iz trigliceridov. Temu sledi β -oksidacija, ko iz MK dobimo 4- ali 5-hidroksikisline. Iz teh nato dobimo δ - ali γ -laktone (Slika 3) (Alewijn, 2006). Sinteza γ - in δ -laktonov je spontan proces (McSweeney in Sousa, 2000). Obseg lipolize bi zato lahko vplival na vsebnost laktonov (Collins in sod., 2003). Alewijn (2006) je v svoji študiji izmeril v različnih sirih podobne vrednosti laktonov kljub različni vsebnosti MK.

Nekatere študije navajajo, da se laktoni tvorijo zaradi segrevanja mlečne maščobe (Collins in sod., 2003), medtem ko naj bi dolgotrajno segrevanje zavrlo nastajanje laktonov (Alewijn, 2006). To pa ne velja za vse laktone, saj so nekateri toplotno stabilnejši (npr. γ - in δ -laktoni) (Alewijn, 2006).

Ugotovili so tudi, da na nastanek določenih laktonov vpliva plesen *P. roqueforti* (Collins in sod., 2003). Različne študije navajajo še druge encimske poti nastanka laktonov (Alewijn, 2006). Poleg tega so dokazali, da je vsebnost laktonov v polnomastnem siru povečevala do 14. tedna zorenja, medtem ko je bila njihova vsebnost v polmastnem siru konstantna (McSweeney in Sousa, 2000).



Slika 3: Shema laktonizacije 5-hidroksi maščobnih kislin (I) do δ -laktona (II) (Alewijn, 2006: 29)

Figure 3: Scheme of spontaneous lactonisation of a 5-hydroxy acid (I) to δ -lactone (II) (Alewijn, 2006: 29)

ŽVEPLOVE SNOVI

Žveplove (S) snovi imajo pomembno vlogo pri oblikovanju arome sira. Nekateri jih povezujejo z nezaželeno aromo. S-snovi imajo nizek prag zaznave, pripisujejo jim močno aromo po česnu in vonj po zelo zrelih sirih. Najbolj pogosto prisotna S-snov v siru je metional, ki lahko nastane v Streckerjevi razgradnji. Zaradi aktivnosti nekaterih mikroorganizmov (vrste *P. camemberti*, *Geotrichum candidum*, *Brevibacterium linens*) nastane iz metionala metanetiol. Predvsem bakterijska vrsta *B. linens* je značilna za sire z rdečo mažo, ki zorijo po sekundarnem načinu. Metanetiol je v oksidativnih reakcijah prekursor za nastanek drugih S-snovi, kot sta dimetilsulfid in dimetiltrisulfid, ki sta prav tako pomembni S-snovi v sirih. Dimetilsulfid je lahko produkt metabolizma propionskih bakterij. Dimetiltrisulfid ima noto po smeteh, ohrovту, cvetači ter česnu. Metanetiol ima značilen vonj po žveplu in česnu. Metionalu pa pripisujejo najrazličnejše note: pikantno, prijetno po praženem, po pečenem krompirju, po kuhanem mleku ter tudi po kuhani zelenjavi in krompirju (Curioni in Bosset, 2002). Frank in sod. (2004) so v nekaterih sirih od S-snovi identificirali tudi dimetiltetrasulfid, ki je odgovoren za aromo po kuhani cvetači ter 2-tioetanol, ki prispeva k aromi po kokošji juhi.

V trdih tipih sirov kot sta na primer čedar in ementalški sir, kjer zorenje poteka po primarnem načinu, nastanejo S-snovi zaradi aktivnosti starterskih in nestarterskih bakterij. S-snovi nastanejo lahko tudi v različnih kemijskih reakcijah (Curioni and Bosset, 2002), vendar pa Bugaud in sod. (2001) navajajo, da S-snovi v siru izvirajo predvsem iz razgradnje S vsebujočih AK in sicer zaradi aktivnosti nekaterih bakterij, ki so prisotne v siru.

FENOLNE SNOVI

Fenoli le v manjših koncentracijah pozitivno vplivajo na aromo sira. V večjih koncentracijah prispevajo k nezaželeni aromi (Curioni in Bosset, 2002).

FURANI

Furani so zelo pomembne aromatične snovi, vendar njihov izvor in vpliv na aromo sira ni povsem raziskan (Curioni in Bosset, 2002). Nekateri navajajo, da so produkti Maillardove reakcije med AK in sladkorji, nastajali pa naj bi tudi pri oksidaciji večkrat nenasičenih MK (Bugaud in sod., 2001). Pomembnejši furan v nekaterih sirih je 4-hidroksi-2,5-dimetil-3-furanon (furaneol). Naslednji pomemben furan je 5-etil-3(2H)-furanon (homofuraneol), za katerega je značilna nota po karameli in sladkem. Za furan 5-heptilhidro-2(3H)-furanon pa je značilna nota po »staranem« siru oziroma siru s podaljšanim zorenjem (Curioni in Bosset, 2002).

DUŠIKOVE SNOVI

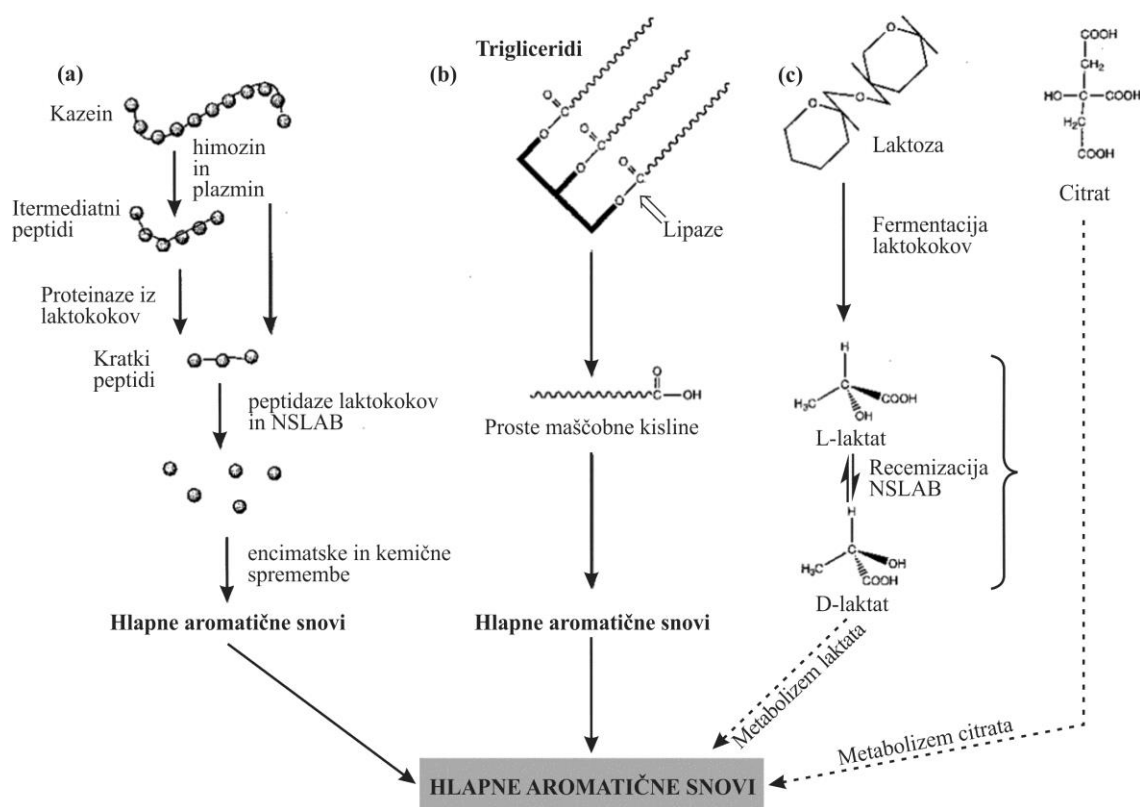
Indol in skatol spadata med dušikove snovi, ki v nekaterih sirih prispevata k aromi. Za indol je značilen vonj po plesni ter spominja tudi na vonj po hlevu. Na njegov nastanek vplivajo kvasovke, mikrokoki ter bakterija *B. linens*. Indol je razgradni produkt triptofana (Curioni in Bosset, 2002).

PIRAZINI

Pirazini so heterociklične aromatične snovi, nekateri oblikujejo tudi aromo sirov. 3-izopropil-2-metoksipirazin je v sirih odgovoren za nezaželeno aromo po krompirju, 2-izobutil-3-metoksipirazin pa za aromo po belem popru (Curioni in Bosset, 2002).

2.4 GLAVNE POTI NASTANKA HLAPNIH ORGANSKIH SPOJIN

Med zorenjem se vzporedno s spremembo strukture sira razvija tudi aroma zaradi številnih aromatičnih snovi, ki nastajajo po različnih biokemijskih poteh. Te se delijo na primarne in sekundarne. K primarnim spadajo lipoliza, proteoliza ter metabolizem laktata in citrata (Slika 4), k sekundarnim pa sodijo metabolizem MK in AK (McSweeney in Sousa, 2000).



Slika 4: Glavne biokemijske poti med zorenjem sira: (a) proteoliza, (b) lipoliza, (c) metabolizem laktata in citrata (McSweeney and Sousa, 2000: 295)

Figure 4: General pathways for the biochemistry of cheese ripening: (a) proteolysis, (b) lipolysis, and (c) metabolism of lactate and citrate (McSweeney and Sousa, 2000: 295)

2.4.1 Lipoliza in metabolizem MK

2.4.1.1 Lipoliza

Lipoliza je katalizirana z lipazami, ki izvirajo iz mleka, sirišča, dodanih SK in nestarterskih bakterij, kvasovk ter plesni (Collins in sod., 2004). Najslabšo aktivnost izkazujejo lipaze, ki izvirajo iz surovega mleka (Choisy in sod., 2000b). Lipoliza ne poteka samo v notranjosti sira, ampak tudi na površini, zaradi plesni in nekaterih bakterij (McSweeney in Sousa, 2000). Lipoliza je obsežnejša pri sirih, ki zorijo dlje časa (trdi tip sirov), pri sirih z modro plesnijo v testu (Choisy in sod., 2000b) ter pri sirih s površinskimi bakterijami (McSweeney in Sousa, 2000). Na obsežnejšo lipolizo vplivajo tudi bakterije iz družine *Micrococcaceae*, ki so bolj lipolitične kot MKB (Choisy in sod., 2000a). Esteraze, ki so podskupina lipaz, izločajo tudi nekateri homofermentativni laktobacili, med katere spada *Lb. helveticus* (McSweeney in Sousa, 2000). Nekateri so ugotovili, da lahko esteraze odcepijo MK z 10 C-atomi in manj, medtem ko naj bi lipaze sproščale daljše MK (Alewijn, 2006). Tudi psihrotrofne bakterije, ki se razvijejo predvsem ob podaljšanem hladnem skladiščenju mleka in

neustreznih higienskih razmerah, tvorijo lipaze. Lipaze psihrotrofnih bakterij so ekstracelularne in toplotno stabilne, zato ostanejo aktivne tudi po toplotni obdelavi mleka pri temperaturah pasterizacije (Hantsis-Zacharov in Halpern, 2007).

Lipoliza najpogosteje poteče po korakih

triglicerid → 1,2- ali 2,3-diglicerid → 2-monoglicerid → glicerol,

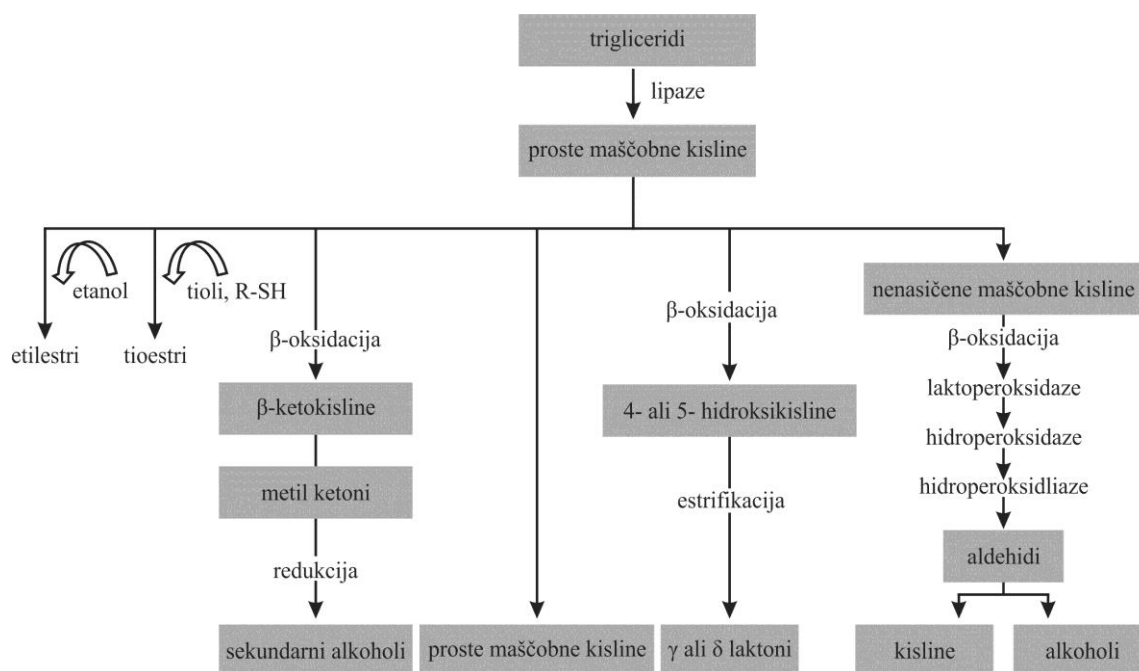
kjer se v vsakem koraku sprosti molekula MK (Choisy in sod., 2000b).

2.4.1.2 Metabolizem prostih maščobnih kislin

Mikroorganizmi lahko uporabljajo MK kot vir ogljika ter jih presnavljajo v različne snovi kot so metil ketoni, sekundarni alkoholi, estri, laktoni, aldehidi in kisline (Slika 5) (Collins in sod., 2003). Transformacija prostih MK lahko vključuje različne poti, β -oksidacijo (Slika 6) (Brulè in sod., 2000), redukcijo, esterifikacijo (Collins in sod., 2003).

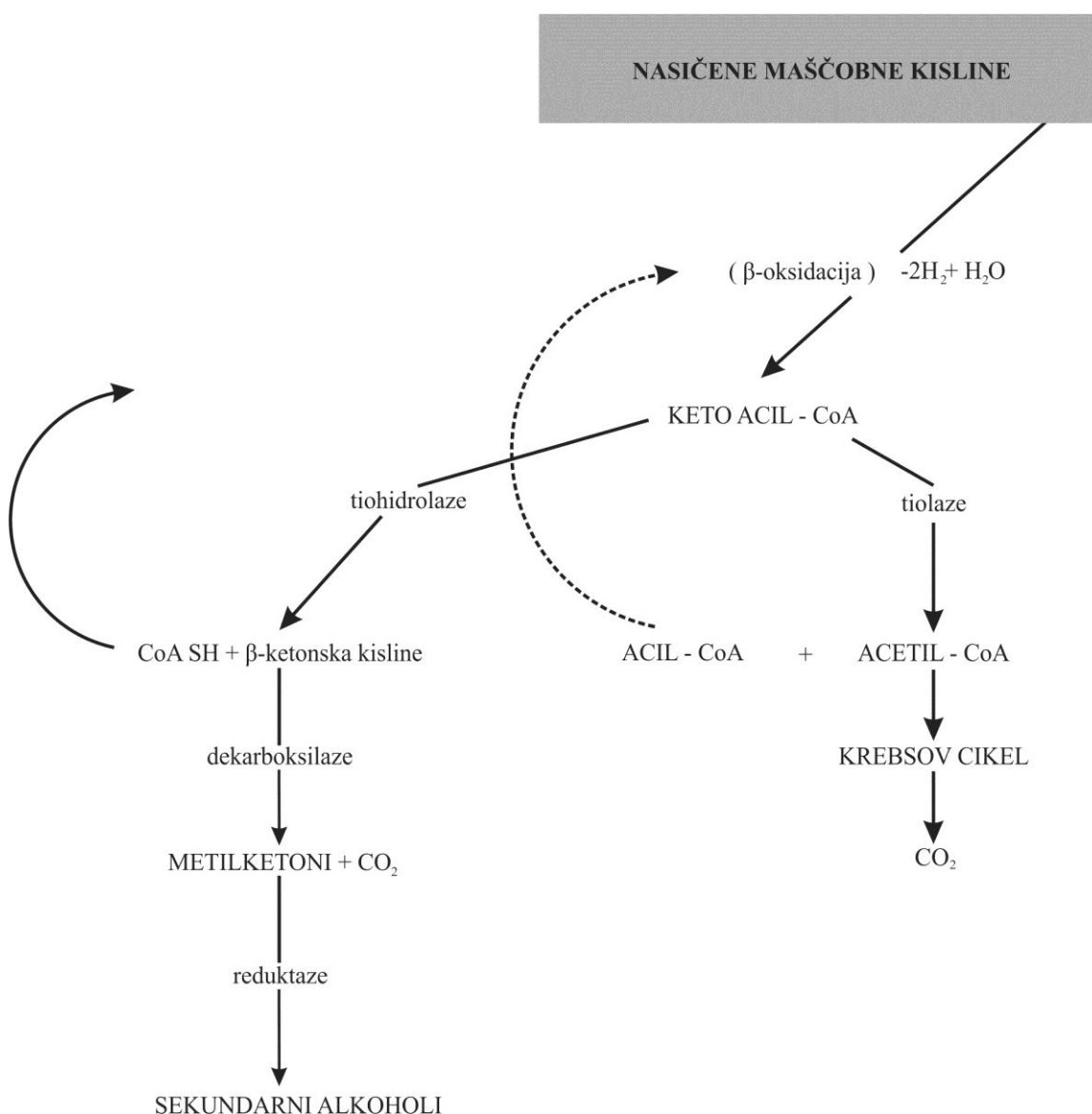
Profil in vsebnost ketonov, ki nastanejo pri transformaciji prostih MK, sta odvisna od vsebnosti različnih MK in od intenzivnosti lipolize oziroma aktivnosti lipolitičnih encimov (Brulè in sod., 2000). V primeru, da je v siru nizka koncentracija prostih MK, se le-te v celoti oksidirajo do CO_2 in nastane le majhna količina metil ketonov. Z encimatsko redukcijo nastalih metil ketonov pa nastanejo sekundarni alkoholi (Collins in sod., 2003).

V esterifikacijo so v glavnem vključene kratke in srednje verižne proste MK ter različni alkoholi (alifatski, aromatski, tioli), ki nastanejo v fermentaciji laktoze ali v katabolizmu AK. Alkoholi lahko nato skupaj s prostimi MK tvorijo estre. V to sintezo so vključene esteraze ali transferaze. V primeru, ko proste MK reagirajo skupaj s S-skupino, nastanejo tioestri (Collins in sod., 2003).



Slika 5: Glavne poti metabolizma prostih maščobnih kislin (McSweeney in Sousa, 2000: 304)

Figure 5: General pathways for the catabolism of free fatty acids (McSweeney and Sousa, 2000: 304)



Slika 6: Transformacija maščobnih kislin preko β-oksidacije (Brulè in sod., 2000: 105)

Figure 6. Transformation of fatty acids through the β-oxidation (Brulè et al., 2000: 105)

Laktoni, ciklične snovi, nastanejo z intramolekularno esterifikacijo hidroksi MK ter tudi iz nenasičenih MK pod vplivom encimov lipoksigenaz ali hidrataz. Za laktone je tudi značilno, da se tvorijo ob segrevanju (Collins in sod., 2003).

V β-oksidaciji nenasičenih MK pa lahko nastanejo nekateri nerazvejeni kratkoverižni aldehidi (Curioni in Bosset, 2002; Collins in sod., 2003).

2.4.2 Proteoliza in metabolizem AK

2.4.2.1 Proteoliza

Proteoliza lahko neposredno vpliva na oblikovanje arome, saj nastanejo v tem procesu AK in krajši peptidi, ki so že aromatični. Poleg tega je rezultat proteolize nastanek AK, ki so prekursorji za druge aromatične snovi (Sousa in sod., 2001; McSweeney, 2004). Proteoliza poteka tudi med zorenjem sira in je zelo kompleksen biokemijski proces, ki pomembno vpliva na razvoj končne arome (Sousa in sod., 2001). Predvsem pri trdih in poltrdih tipih sirov je proteoliza ključna pri oblikovanju arome (Van Kranenburg in sod., 2002; Randazzo in sod., 2007). Intenzivnost proteolize se med siri razlikuje (McSweeney in Sousa, 2000) zaradi raznolike aktivnosti mikroorganizmov. Njihova aktivnost je odvisna od tehnoloških parametrov, fizikalno-kemijskih lastnosti sirnine in narave mikroorganizmov (Choisy in sod., 2000b).

Pri proteolizi poteka hidroliza kazeinov do peptidov in prostih AK. Proteolizo katalizirajo encimi sirišča (himozin, pepsin), endogeni encimi mleka (plazmin, katepsin D) ter encimi mikroorganizmov (proteaze in peptidaze) (Upadhyay, 2004).

Proteolitične encime mikroorganizmov delimo na endopeptidaze (proteaze), ki hidrolizirajo proteine in sprostijo peptide ter na eksopeptidaze (aminopeptidaze, karboksipeptidaze in dipeptidaze), ki cepijo peptide do prostih AK (Choisy in sod., 2000b).

Med zorenjem se pri proteolizi kazeina (Slika 7) prepleta delovanje treh tipov encimov in sicer zaostankov koagulacijskih encimov (encimov sirišča), plazmina (McSweeney, 2004) ter proteaz in peptidaz MKB (Brulè in sod., 2000). Encimi sirišča in plazmin cepijo kazein na daljše peptide, medtem ko krajši peptidi in AK nastanejo zaradi delovanja proteaz mikroorganizmov (starterske in ne-starterske MKB, sekundarne SK) (Sousa in sod., 2001).

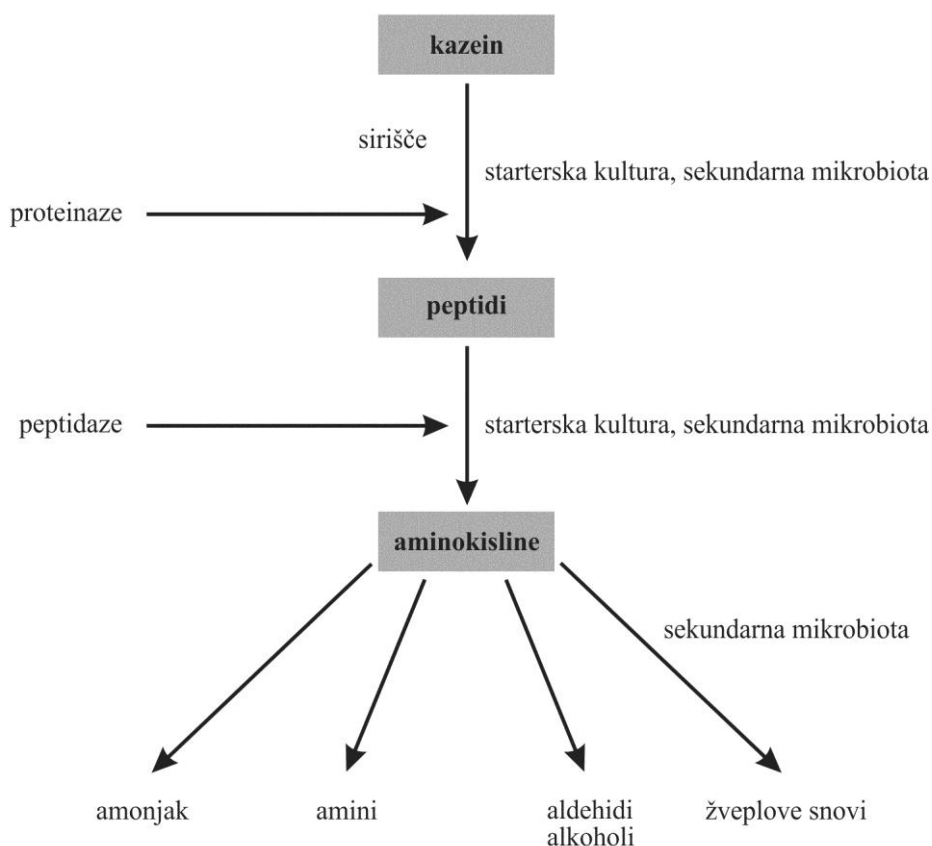
Plazmin je pomemben encim mleka, ki s proteolitičnim delovanjem sodeluje pri zorenju sirov, posebej tistih, katerih dogrevanje sirnega zrna poteka pri višjih temperaturah in tistih z višjimi vrednostmi pH. Poleg tega se aktivnost plazmina poveča tudi po toplotni obdelavi mleka, saj pride s pasterizacijo do inaktivacije termolabilnih inhibitorjev plazmina, termostabilni aktivator pa pretvori neaktivni plazminogen v aktivni plazmin. Dvig vrednosti pH med zorenjem poveča tudi aktivnost encimov MKB, zmanjša pa aktivnost encimov sirišča, katerega optimalna vrednost pH delovanja je okoli 5 (Choisy in sod., 2000b).

Profil AK, ki nastanejo pri proteolizi, se med siri razlikuje in je odvisen tudi od aktivnosti mikroorganizmov. Pri sirih s plesnijo je proteoliza zelo izrazita. Tako npr. plesni iz rodu *Penicillium* (npr. *P. roqueforti*, *P. camemberti*) izločajo močno aktivne

proteolitične encime, ki lahko povzročijo nastanek zelo grenkih peptidov. Na površini sira, kjer so prisotne plesni, poteka proteoliza hitreje (Choisy in sod., 2000b).

Pri nekaterih trdih tipih sirov naj bi pri proteolizi sodelovale tudi bakterijske vrste *Propionibacterium* (Sousa in sod., 2001), vendar njihova vloga kot proteolitov še ni tako raziskana. Za MKB iz rodov *Lactococcus*, *Lactobacillus* in *Streptococcus* je značilno, da imajo šibko proteolitično aktivnost, a skupaj s plazminom prispevajo k nastanku precejšnje vsebnosti majhnih peptidov in prostih AK. Za površinske bakterije kot sta *Micrococcus caseolyticus* in *B. linens* je značilna tvorba metaloproteaze in proteaz, ki vsebujejo serin, medtem ko kvasovke *Geotrichum candidum* z močno eksopeptidazno aktivnostjo prispevajo k nastanku AK in s tem k zmanjšanju grenkobe (Choisy in sod., 2000b).

V procesu proteolize lahko nastanejo in se akumulirajo kratki hidrofobni peptidi, ki povzročajo grenkobo. Ti peptidi so lahko produkt proteinazne aktivnosti nekaterih nestarterskih bakterij ali pa delovanja sirišča, ki cepi β -kazein na specifičnem mestu poleg hidrofobnega C-konca (McSweeney, 2004). V primeru odsotnosti proteaz in peptidaz nekaterih starterskih bakterij, ki bi cepile nastale hidrofobne peptide, se ti zato akumulirajo in povzročajo grenkobo (McSweeney in Sousa, 2000).



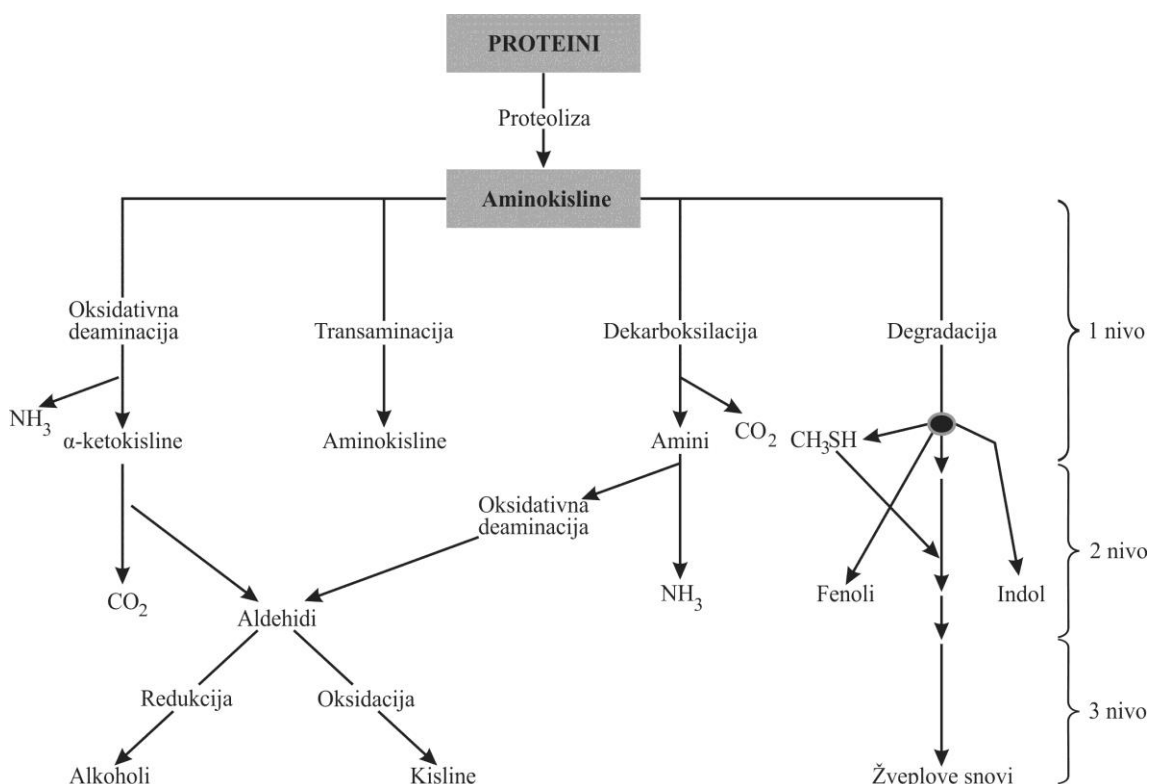
Slika 7: Nastanek nekaterih snovi iz kazeina (Bunch Kristensen, 1999: 175)

Figure 7: The formation of certain substances from casein (Bunch Kristensen, 1999: 175)

2.4.2.2 Metabolizem aminokislin

Metabolizem AK vodi do nastanka različnih snovi, ki prav tako sodelujejo pri oblikovanju končne arome sira, pri čemer so vključeni različni sistemi encimov in sicer dekarboksilaze, deaminaze in transaminaze (Choisy in sod., 2000b). V transformacijo AK so vključene transaminacija, deaminacija, dekarboksilacija, desulfuracija, katabolizem aromatičnih AK in reakcije AK z drugimi komponentami (Sousa in sod., 2001), ki vodijo do vrste verižnih reakcij (Slika 8), v katerih se nastali amini ali keto kisline lahko pretvorijo v aldehide, alkohole ali kisline (Choisy in sod., 2000b).

Po dekarboksilaciji AK nastanejo amini, ki se nato v naslednjem koraku, pod vplivom deaminaz, pretvorijo v aldehide, ti pa nadalje v kisline ali alkohole (Brulè in sod., 2000).



Slika 8: Diagram mikrobnega katabolizma aminokislin med zorenjem sira (Choisy in sod., 2000b: 127)

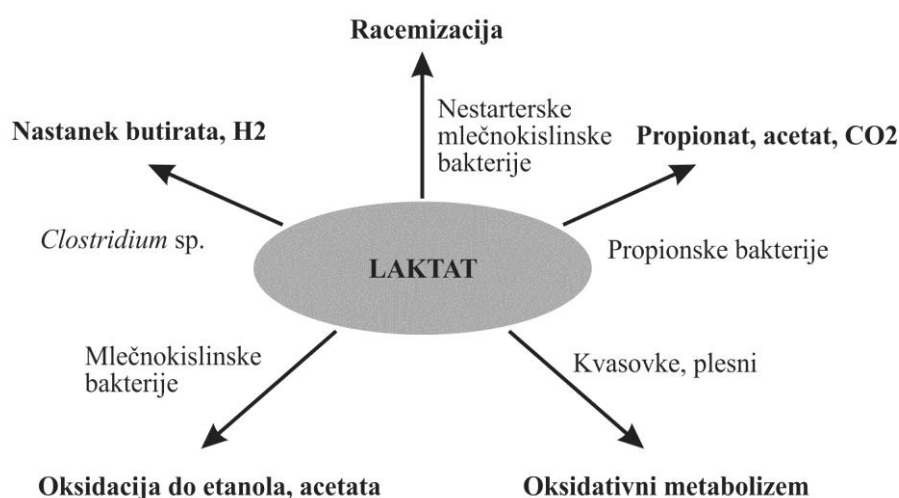
Figure 8: General flow diagram of the microbial catabolism of the amino-acids during cheese ripening (Choisy et al., 2000b: 127)

2.4.3 Fermentacija laktoze ter pretvorbe mlečne kisline

Pretvorba laktoze do mlečne kisline je pomembna pri vseh vrstah sirov in je odvisna tudi od vrste dodane SK (McSweeney in Sousa, 2000). Laktoza se po homofermentativni poti v celoti pretvori v mlečno kislino, značilna pa je za bakterije iz

rodov *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* in večino laktobacilov. Po heterofermentativni poti, ki je značilna za bakterije iz rodu *Leuconostoc* in heterofermentativne laktobacile, pa poleg mlečne kisline nastanejo še CO₂ in etanol. Količina zaostale laktoze, ki je v siru pred začetkom zorenja, je odvisna od pogojev koagulacije mleka in sušenja sirnega zrna, na kar vplivajo aktivnost SK, pranje sirnega zrna, stopnja sušenja sirnega zrna in pogoji soljenja (Choisy in sod., 2000b).

Večina nastale mlečne kisline je v obliki laktata, ki je pomemben prekursor za številne reakcije (Slika 9). Nadaljnji metabolizem laktata je odvisen od prisotnih mikroorganizmov (klostridiji, nestarterske MKB, propionske bakterije, kvasovke) (McSweeney in Sousa, 2000).



Slika 9: Glavne poti metabolizma laktata v siru (McSweeney in Sousa, 2000: 296)

Figure 9: General pathways for lactate metabolism in cheese (McSweeney and Sousa, 2000: 296)

Med glavne poti metabolizma laktata v siru spadajo: racemizacija laktata, oksidacija laktata zaradi MKB, metabolizem laktata pod vplivom kvasovk, metabolizem laktata pod vplivom propionskih bakterij ter metabolizem laktata pod vplivom *Clostridium* sp.

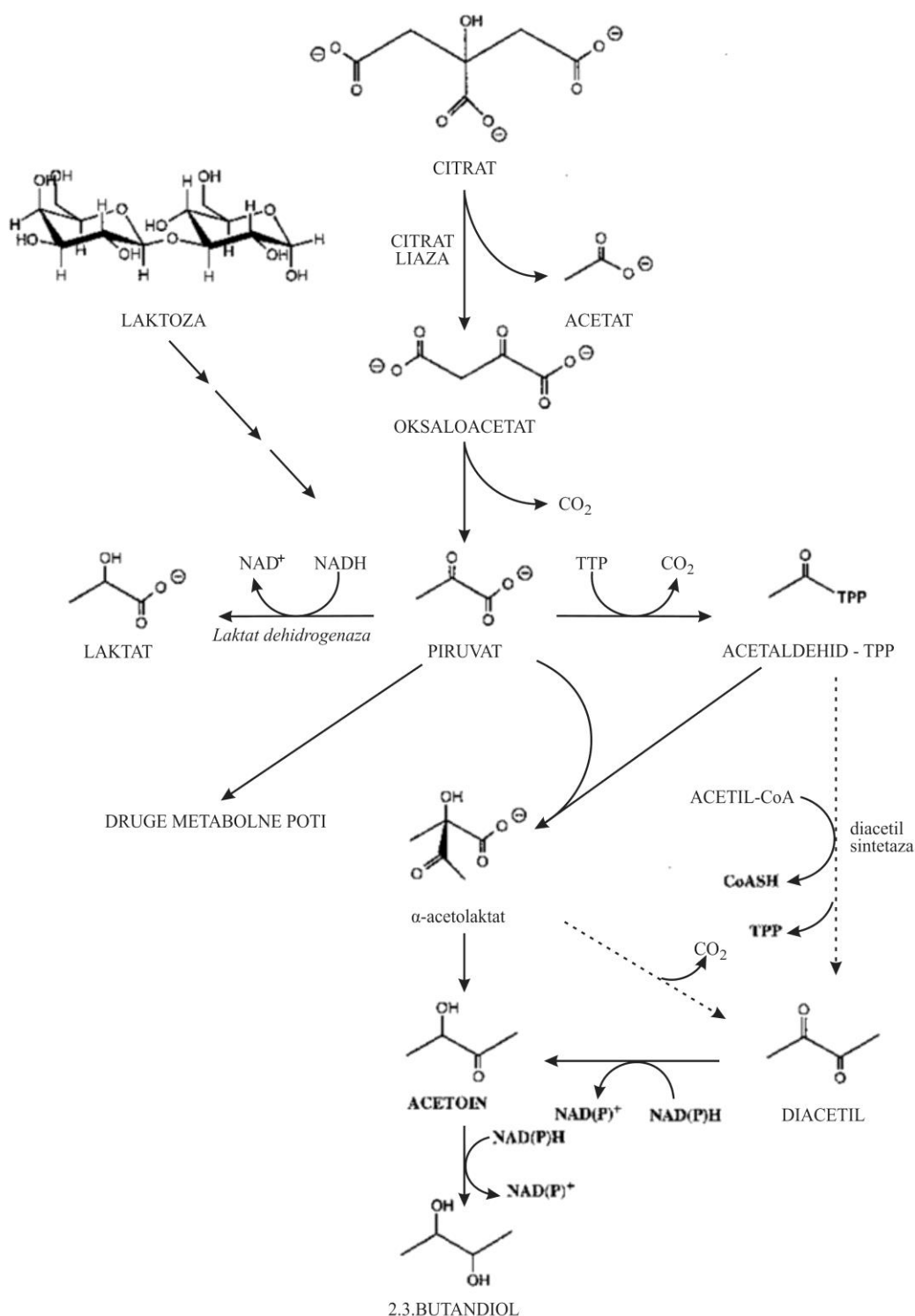
- Racemizacija laktata: med mlečnokislinsko fermentacijo nastajata optično aktivni L(+) ali D(–) izomerna oblika mlečne kisline (laktata) ali pa njuna optično neaktivna DL mešanica oz. racemat. Nastanek posameznih produktov je odvisen od narave prisotnih bakterij, ki so lahko homo-, hetero- ali fakultativno heterofermentativne. D-laktat lahko nastaja neposredno iz laktoze zaradi delovanja starterskih laktobacilov ali nestarterskih MKB ali pa posredno iz L-laktata, saj so nekatere bakterije sposobne le tega pretvarjati v D-laktat. Tako naj bi se v sirih, izdelanih iz surovega mleka, med zorenjem tvorilo več D-laktata predvsem zaradi aktivnosti prisotne nestarterske mikrobiote (McSweeney in Sousa, 2000), nekaterih pediokokov, laktobacilov in leukonostokov. Racemizacija laktata je precej pomembna z vidika topnosti, saj je kalcijev DL-

laktat manj topen kot kalcijev L-laktat, kar vodi do nastanka kalcijevih-DL-laktat kristalov, ki se v siru manifestirajo kot beli madeži. Čeprav so nastali kristali popolnoma neškodljivi, pri potrošnikih izzovejo negativen odziv v smislu zaplesnjenosti sira oz. prisotnosti tujkov (McSweeney, 2004). Vpliv racemizacije laktata na aromo je neznaten. DL-laktat pa je s prehranskega vidika precej bolj neugoden, saj lahko predvsem pri dojenčkih povzroča prebavne motnje (Le Quèrè in Molimard, 2003; Singh in sod., 2003).

- Oksidacija laktata: L-laktat se lahko oksidira do acetata pod vplivom naravno prisotnih bakterij, kar pa je odvisno od razpoložljivosti kisika. Prevelika količina acetata lahko povzroča v siru nezaželeno aromo (Choisy in sod., 2000b).
- Nekatere kvasovke in plesni lahko zelo hitro metabolizirajo laktat do CO₂ in H₂O (McSweeney in Sousa, 2000).
- Propionske bakterije metabolizirajo L-laktat v propionat, acetat in CO₂ (McSweeney in Sousa, 2000).
- Vrste bakterij iz rodu *Clostridium* lahko laktat pretvorijo v masleno kislino in H₂ (McSweeney in Sousa, 2000).

2.4.4 Metabolizem citrata

Citrat je naravno prisoten v mleku in sicer povprečno 1750 mg v enem litru. Čeprav je kar 94 % citrata v mleku v topni obliki in ga pri sirjenju večina preide v sirotko, pa je vsebnost citrata v sirnini približno trikrat večja kot v sirotki, kar je najverjetneje posledica koncentriranja koloidnega citrata. Metabolizem citrata s cit⁺ MKB je izrednega pomena pri oblikovanju teksture in arome sirov, predvsem s tvorbo aromatičnih komponent kot so acetat, diacetil, acetoin in v 2,3-butandiol (Slika 10). Cit⁺ MKB ne izkoriščajo citratov kot izvora energije ampak kot akceptorje elektronov, pri čemer poteka metabolizem citrata ob prisotnosti laktoze ali katerega drugega sladkorja. Najbolj znane cit⁺ MKB so iz rodov *Leuconostoc* (*Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leu. lactis*) in *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*) (McSweeney in Sousa, 2000; Choisy in sod., 2000a; Fox in sod., 2000), medtem ko *Str. thermophilus* in termofilni laktobacili citrata ne metabolizirajo (Fox in sod., 2000). Metabolizem citrata pa je pomemben tudi pri nekaterih vrstah sirov, kjer iz citrata nastali CO₂ oblikuje v siru značilna očesa (McSweeney in Sousa, 2000).



Slika 10: Metabolizem citrata pri citrat-pozitivnih bakterijah iz rodu *Lactococcus* in *Leuconostoc* (McSweeney in Sousa, 2000: 300)

Figure 10: Pathways for citrate metabolism in citrate-positive lactococci and *Leuconostoc* sp. (McSweeney and Sousa, 2000: 300)

2.5 IZVOR HLAPNIH ORGANSKIH SPOJIN V MLEKU IN SIRU TER VPLIVI NA NJIHOV NASTANEK

2.5.1 Hlapne organske spojine v mleku

Nekatere HOS, ki so prisotne v mleku se tvorijo v mlečni žlezi. Žlezni del mlečne žleze sestavljajo številni mlekovtorni mehurčki ali alveole. Alveole so v notranjosti obdane z epitelimi celicami, v katerih nastaja mleko. Sestavine mleka, med katere prištevamo mlečno maščobo, laktozo in proteine mleka, nastajajo v procesih biosinteze v mlekovtornih celicah iz snovi, ki jih po arterijskih kapilarah prinaša kri v žlezno tkivo mlečne žleze. Ostale sestavine mleka kot na primer mineralne snovi, nekateri encimi, vitamini, albumin krvnega seruma, imunoglobulini pa prehajajo iz krvi v mlečno žlezo nespremenjene in postanejo del mleka (Bajt, 2011).

Del MK se sintetizira v mlečni žlezi, predvsem kratko in srednjeveržne MK (s 4–14 C-atomi), ki nastanejo iz acetata in β -hidroksi butirata, ki sta produkta vampnih bakterij (Palmquist, 2006). V mlečni žlezi se sintetizira tudi manjša količina dolgoveržnih MK, večina pa jih v mleko pride preko krvi, kar je odvisno od vsebnosti maščobe v obroku (Stamples, 2006).

Na prisotnost nekaterih HOS vpliva tudi endogena mikrobiota surovega mleka, kar je tesno povezano z vplivom okolja. K oblikovanju končne arome mleka pa doprinese tudi stadij laktacije in zdravstveno stanje živali. V mleku neprestano potekajo biološke, kemijske in encimske spremembe, ki lahko spremenijo aromo mleka (Toso in sod., 2002; Al-Attabi in sod., 2009).

V mleku naj bi se nahajalo vsaj 400 HOS (Al-Attabi in sod., 2009), vendar vse ne prispevajo h končni aromi mleka. V mleku so identificirali različne aldehide, ketone, alkohole, ogljikovodike, žveplove snovi, estre, terpene (Toso in sod., 2002), kisline, laktone, furane, N-vsebujoče snovi, karbonile ter alifatske in aromatske ogljikovodike. Ketoni naj bi bili najboljše skupina HOS v mleku. Med njimi je največ acetona, ki je po nekaterih podatkih značilna spojina surovega mleka (Al-Attabi in sod., 2009).

2.5.2 Vpliv prehrane

Prehrana krav vpliva na sestavo mleka in s tem tudi na sestavo sira (Cornu in sod., 2009). Poleg tega prehrana pomembno vpliva na aromo svežega mleka oziroma na prisotnost HOS v mleku (Moio in sod., 1996). Mlečna maščoba je zelo spremenljiva sestavina mleka tako po koncentraciji kot tudi po sestavi (Palmquist, 2006). Prehrana živali lahko močno vpliva na sestavo in vsebnost mlečne maščobe v mleku, medtem ko je ta vpliv na beljakovine manj izražen (Cornu in sod., 2009).

Določene spojine se prenesejo iz krme v mleko in od tu naprej v sir. V mleko se lahko prenesejo po različnih poteh, in sicer iz vdihanega zraka, iz vampnih plinov ter iz

prebavnega trakta (Toso in sod., 2002). Vse te snovi nato po krvnem obtoku pridejo do mlečne žleze (Kalač, 2011; Toso in sod., 2002). Snovi, ki so se med krmljenjem krav preko vdihanega zraka prenesle v krvni obtok, zelo hitro preidejo v mleko (Carpino in sod., 2004), vendar gre pri tem verjetno za zelo nizke koncentracije.

Nekatere HOS, ki so prisotne v krmi, vplivajo na koncentracijo iste snovi v mleku, kar lahko neposredno prispeva k specifičnemu vonju mleka. HOS v krmi pa imajo lahko tudi posreden vpliv na končen vonj mleka. In sicer tako, da zaužita krma vpliva na metabolizem v vampu, kjer zaradi aktivnosti mikroorganizmov nastajajo spojine, ki lahko prispevajo h končnemu vonju mleka (Toso in sod., 2002).

HOS, ki izvirajo iz krme, se sprostijo iz rastlin po mehanski poškodbi. Slednjo lahko povzroči košnja ali pa sama žival med krmljenjem. Te HOS se lahko sprostijo takoj po poškodbi, medtem ko se druge lahko sintetizirajo in sprostijo nekaj ur kasneje. V to skupino spadajo tudi terpeni. Dokazali so, da prehajajo terpeni v mleko iz krme, ki jo zaužije žival. Nahajajo se v različnih vrstah rastlin, še posebej so značilni za aromatične dvokaličnice. Poleg tega so jih identificirali tudi v črni detelji. Prisotnost in vsebnost terpenov v siru sta odvisni od vnosa s krmo. Vsebnost sekviterpenov se lahko v silaži zmanjša med fermentacijo. V nekaterih študijah so potrdili sezonski vpliv na vsebnost terpenov v mleku. V poletni sezoni je mleko krav, ki so bile na paši, vsebovalo večje koncentracije terpenov v primerjavi z zimsko sezono. Takrat naj bi osnovni obrok vseboval predvsem koruzno silažo ali seno (Kalač, 2011). Terpeni so bili prisotni samo v mleku živali, ki so se pasle, medtem ko mešanica žit v obroku ni doprinesla k vsebnosti terpenov (Moio in sod., 1996). Moio in sod. (1996) trdijo, da se sekviterpeni verjetno absorbirajo v kri iz črevesja in ne prek dihalnih poti, kot je dokazano za večino drugih HOS. Prenosi snovi znotraj iste skupine se lahko razlikujejo. Na primer, v vampu so nekateri terpeni podvrženi razgradnji v procesu fermentacije, medtem ko drugi niso (Morand-Fehr in sod., 2007).

Precej manj pa je znanega o prenosu nekaterih drugih HOS na primer alkoholov, kislin, estrov, aldehydov, ketonov iz krme v mleko in sir (Kalač, 2011). Bendall (2001) je v študiji primerjal mleko krav, ki so bile na paši, z mlekom krav, ki so bile krmljene s popolno krmno mešanico. Izkazalo se je, da se je aroma mleka razlikovala glede na prehrano krav in sicer predvsem zaradi različne koncentracije določenih HOS in ne toliko glede na prisotnost/odsotnost HOS, ki so bile specifično prisotne v določeni krmi. Podobne ugotovitve navaja tudi Kalač (2011), ko je v eni od študij ugotovil višje koncentracije določenih HOS v sirih, ki so bili iz mleka krav, krmljenih s travno silažo v primerjavi s sirii, ki so bili iz mleka krav, krmljenih s senom. Tudi Moio in sod. (1996) so proučevali vpliv različne prehrane (paša s travnikov, paša z visokogorskih pašnikov, mešanica žit) na prisotnost in vsebnost HOS (estri, aldehydi, ketoni, dušikove spojine, aromatični ogljikovodiki, laktoni) v mleku ovc. Vpliv različnega krmljenja je prispeval

predvsem k različni vsebnosti določenih HOS v mleku (npr. krmljenje z mešanico žit je prispeval k višji vsebnosti aldehydov).

Del dolgoverižnih MK se sintetizira v mlečni žlezi, ostali del MK (C_{16} in daljše) se prenesejo v mlečno žlezo iz krme. Približno 40–60 % dolgoverižnih MK (prevladujejo C_{18}) izvira iz prehrane (Palmquist, 2006). Znano je, da lahko s prehrano vplivamo na vsebnost nenasičenih MK (Stamples, 2006). Dokazali so na primer večjo koncentracijo nenasičenih MK v mleku krav, ki so bile na paši v primerjavi tistimi, ki so bile krmljene s koncentratom (Cornu in sod., 2009). Ugotovili so tudi, da večja vsebnost maščobe v obroku poveča delež MK s 18 C atomi in zmanjša delež krajših MK (Stamples, 2006).

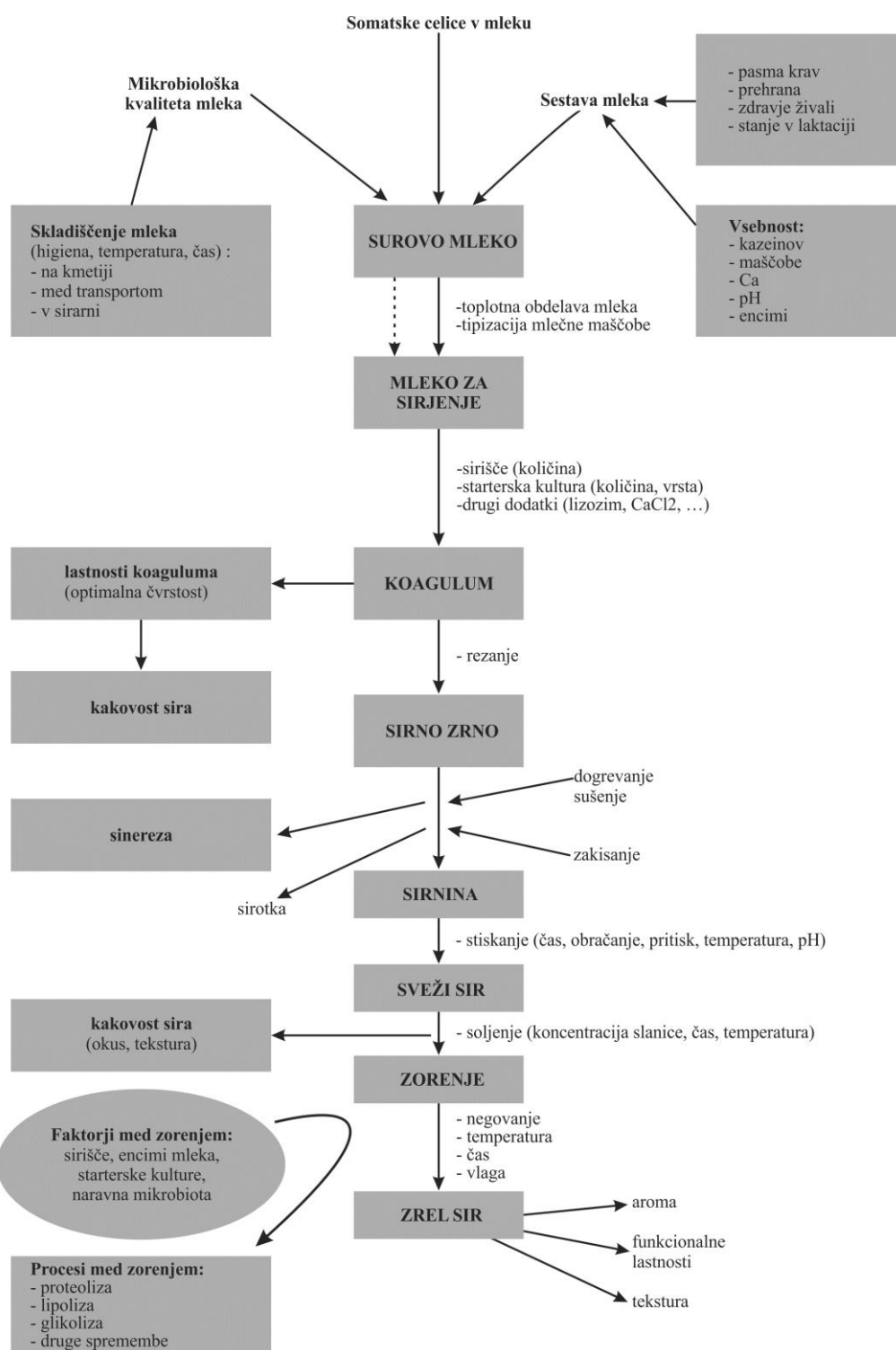
Kar nekaj študij je že proučevalo vpliv krmljenja s silažo na aromo mleka oziroma na prisotnost HOS v mleku (Shipe in sod., 1962; Toso in sod., 2002; Mounchili in sod., 2005). Ugotovili so, da določene snovi iz travne silaže lahko povzročajo v mleku neprijetno aromo (Shipe in sod., 1962). Krmljenje krav s silažo je tako vplivalo na večjo vsebnost etanola, propan-2-ona, dimetil sulfida, 2-butanona, heksanala, oktan-2,3-diona ter heptanala (Mounchili in sod., 2005). Etanol, ki nastane v silaži, lahko vpliva na koncentracijo alkohola v mleku posredno, in sicer vpliva na metabolizem v vampu ali pa direktno s specifičnim vonjem po silaži (Toso in sod., 2002). V silaži nastaneta očetna in butanojska kislina (Danner in sod., 2003). Nekaj očetne kisline naj bi se tudi preneslo iz krme v mleko (Carpino in sod., 2004). Vsebnost butanojske kisline v silaži se lahko v anaerobnih pogojih še poveča zaradi aktivnosti klostridijev, ki se v silažo vnesejo z zemljo ali gnojovko ob neustreznem spravilu silaže. Klostridiji tvorijo spore, ki se prenesejo v mleko. To je lahko kasneje vzrok za pozno napihovanje v sirih (Danner in sod., 2003) ter večje koncentracije butanojske kisline (Stefanon in Procida, 2004). Tudi določeni alkoholi, aldehidi in ketoni naj bi se pojavili v travni silaži in nato po zaužitju travne silaže v mleku krav. Kljub temu dejstvu je premalo podatkov, ki bi potrdili, ali določena komponenta izvira iz krme ali pa je nastala med zorenjem sira. V travni silaži je veliko vodotopnih ogljikovodikov, ki veljajo za reaktante med mlečnokislinsko fermentacijo. Produkti fermentacije so tudi alkoholi, med njimi je najbolj pogost etanol. Za nekatere alkohole (propanol, etanol) so potrdili, da naj bi se iz krme krav prenesli v krvni obtok in nato v mleko. Izvor posameznih aldehydov in ketonov prisotnih v siru je težko potrditi. Nekateri namreč izvirajo iz sveže krme, drugi nastanejo med sušenjem ali fermentacijo krme, tvorijo pa se tudi med zorenjem sira. Poleg tega nekatere karboksilne kisline, med katere spadajo tudi MK, izvirajo iz rastlin ali nastanejo med siliranjem. MK skupaj z alkoholi lahko tvorijo estre. Vendar je zelo malo znanega o prenosu MK in estrov iz silaže v mleko in sir (Kalač, 2011).

Carpino in sod. (2004) so že dokazali, da so siri iz mleka krav, ki so bile na paši, vsebovali več aromatično aktivnih snovi. V isti študiji so navedli določene aromatične snovi, ki so se prenesle iz krme v sir. Snovi, ki so jih identificirali v rastlinah in sirih iz poletne sezone, so bile poleg terpenoidov tudi aldehidi (fenilacetaldehyd, nonanal, (E,E)-

2,4 dekadienal, (E) 2-nonenal, (Z) 2-nonenal, 2,4 dekadienal, vanilin) ter estra (grenil acetat, (E)-metil jasmonat. Vendar pa Buchin in sod. (1999) trdijo, da se razvejeni aldehidi in estri ne prenesejo v sir iz krme, ampak so rezultat metabolizma AK, prostih MK ter ogljikovodikov, in sicer zaradi aktivnosti mikroorganizmov že v samem mleku.

2.5.3 Vpliv tehnološkega postopka izdelave sira

Na lastnosti določenega sira, vključno z aromo, vplivajo tudi posamezne faze tehnološkega procesa izdelave sira, kot so posnemanje maščobe, toplotna obdelava mleka, kinetika fermentacije, čas zorenja. Zato je pomembno poznati posamezne faze v procesu sirjenja ter spremljati parametre, kot so temperatura, vlaga, vrednost pH. Faze tehnološkega postopka vplivajo na končno kakovost ter s tem tudi na aromo sira. Na sliki 11 je prikazan celoten tehnološki postopek z možnimi dejavniki, ki lahko vplivajo na kakovost sira. Za kvaliteten sir je zelo pomembna že kakovost surovine – mleka, in sicer tako s kemijskega, fizikalnega kot mikrobiološkega vidika. Lastnosti in sestava mleka se namreč nato odražajo v siru (Mounchili in sod., 2005). Če lastnosti mleka ne zadostijo kriterijem, potem tudi sir ne bo imel želene arome, teksture in drugih lastnosti, zato moramo kakovost mleka spremljati že v izhodišču vse od prehrane krav (Fox in Cogan, 2004).



Slika 11: Tehnološki postopek sirjenja in dejavniki, ki vplivajo na kakovost sira (Fox in Cogan, 2004: 585)

Figure 11: Technology of cheesemaking and factors affecting the quality of the cheese (Fox and Cogan, 2004: 585)

2.5.4 Toplotna obdelava mleka

S toplotno obdelavo mleka zagotovimo mikrobiološko kakovost surovine (Hermier in Cerf, 2004) ter varen izdelek standardne kakovosti. Poleg tega se s toplotno obdelavo izgubi značilen vonj in okus po surovem mleku, izognemo pa se tudi številnim napakam izdelkov, ki jih povzročajo tehnološko škodljivi mikroorganizmi (Bajt in Golc-Teger, 2005). V grobem delimo postopke toplotne obdelave glede na uporabljeno temperaturo na pasterizacijo, kjer gre za temperature do 100 °C, in sterilizacijo, kjer gre za temperature nad 100 °C. Mleko je pri toplotni obdelavi izpostavljeno določeni temperaturi le določen čas, zato podrobneje delimo postopke toplotne obdelave po časovno-temperaturnih režimih. Termizacija je eden od temperaturno najblažjih načinov toplotne obdelave mleka (Hermier in Cerf, 2004). Po pravilniku je termizacija postopek, v katerem surovo mleko segrevamo za vsaj 15 sekund pri temperaturi med 57 °C in 68 °C. Mleko po termizaciji še vedno izkazuje pozitivno reakcijo na preskus aktivnosti fosfataze (Pravilnik o veterinarskih pogojih ..., 2004). Ta način toplotne obdelave mleka se uporablja tudi pri izdelavi nekaterih tradicionalnih sirov, na primer pri Nanoškem siru.

Mleko za predelavo v sir toplotno obdelamo z namenom, da uničimo potencialno prisotne patogene mikroorganizme, na primer *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella* in zmanjšamo število nezaželenih bakterij, na primer psihrotrofnih in koliformnih, žal pa s postopki pasterizacije ne uničimo bakterijskih spor (klostridiji) (Hermier in Cerf, 2004). Čeprav s toplotno obdelavo delno uničimo tudi tehnološko pozitivne mikroorganizme, ki so naravno prisotni v surovem mleku, se jih še vedno ohrani dovolj, predvsem tistih toplotno bolj odpornih. To so na primer nekateri laktobacili, enterokoki, ki sodelujejo pri zorenju sira (Buchin in sod., 1998; Srikanthakumar in sod., 2004). V siru najdemo tudi mikroorganizme, ki se v toplotno obdelano mleko prenesejo s sirarske opreme in iz okolja (Grappin in Beuvier, 1997).

Toplotna obdelava pa ne vpliva le na mikroorganizme, ampak tudi na aktivnost endogenih encimov mleka (katepsin D, lipoproteinske lipaze, alkalne fosfataze) kakor tudi eksogenih encimov mikroorganizmov, ki so v mleku. K toplotno stabilnejšim encimom prištevamo plazmin, kislinsko fosfatazo ter proteinaze in lipaze psihrotrofnih bakterij (Grappin in Beuvier, 1997).

Siri, narejeni iz pasteriziranega mleka, naj bi imeli v primerjavi s siri, narejenimi iz surovega mleka, bolj prazen, neizrazit okus (flat taste). Toplotna obdelava torej delno uniči tudi tehnološko koristne mikroorganizme surovega mleka, ki bi med zorenjem lahko tvorili aromatične snovi oziroma sodelovali pri oblikovanju arome sira. Ker s toplotno obdelavo zdesetkamo nativno mikrobioto surovega mleka, jo nadomestimo z ustreznim izborom primerne SK (Buch Kristensen, 1999).

Zato se surovo mleko za izdelavo Nanoškega sira obdela s postopkom termizacije, ki vsaj delno ohrani mikrobno populacijo nativnih, tehnološko koristnih MKB (Nanoški sir GIZ, 2013).

Poleg tega je termizacija najprimernejši postopek toplotne obdelave v sirarstvu, saj toplotna obdelava mleka pri višjih temperaturah poslabša sposobnost mleka za usirjanje, ker pride do sprememb lastnosti kazeina in delno maščobe, serumski proteini lahko denaturirajo, zmanjša pa se tudi količina topnega kalcija (Hermier in Cerf, 2004).

2.5.5 Starterske kulture

SK so mono, združene ali mešane kulture tehnološko koristnih živih mikroorganizmov z encimskim potencialom, ki v pogojih proizvodnje z usmerjenim delovanjem odločilno vplivajo na oblikovanje lastnosti končnega izdelka – fermentiranega živila (Smole Možina in Raspor, 1994). Gre za mikrobiološka cepiva, ki jih na tržišču najdemo v obliki najrazličnejših pripravkov, od liofiliziranih kultur do tekočih cepiv (Tunick, 2014). Kot SK poleg bakterij najdemo tudi kvasovke in plesni ter kombinacije vseh teh skupin (Smole Možina in Raspor, 1994). Danes se kot SK v proizvodnji sirov v večini uporablja komercialne SK, ki so liofilizirane (sušene z zmrzovanjem).

SK spremljajo človeka že od nekdaj, še preden se je pravzaprav zavedel njihove prisotnosti, ko je prvo cepitev mleka z nekakšno »startersko kulturo« izpeljal tako, da je prenesel majhno količino fermentiranega mleka prejšnjega dne v sveže mleko. V začetku 19. stoletja so raziskovalci začeli slutiti, da pri kisanju mleka sodelujejo živi organizmi in leta 1857 je Pasteur dokazal, da je mlečnokislinska fermentacija posledica delovanja živih organizmov in ne kemijskih reakcij. Lister je 1873 izoliral čisto bakterijsko kulturo in potrdil, da so bakterije vključene pri procesu nastajanja sira. Začetki priprave in uporabe bakterij kot SK v mlekarski industriji segajo v leto 1890, prve države, ki so jih začele uporabljati, pa so bile ZDA, Danska in Nemčija (Powell in sod., 2003).

Proizvodnje fermentiranih mlečnih izdelkov brez uporabe SK si danes ne znamo več predstavljati, med njihove najpomembnejše učinke prištevamo zagotavljanje konstantne kakovosti izdelka, preprečevanje kvarjenja in podaljšanje obstojnosti izdelka, oblikovanje terapevtskih in funkcionalnih lastnosti ter izboljšanje senzoričnih in reoloških lastnosti izdelka (Rogelj in Perko, 2003).

Dokazano je že bilo, da z uporabo SK lahko pomembno vplivamo na oblikovanje aromatskega profila sira (Randazzo in sod., 2007) in s tem na končno aromo (Kocaoglu-Vurma in sod., 2008), hkrati pa preprečimo morebitna nihanja oz. odstopanja v aromatskem profilu določenega sira, do katerih lahko pride med posameznimi serijami izdelave sira (Wouters in sod., 2002). Čeprav vse poti nastanka aromatičnih snovi še niso povsem znane (Ayad in sod, 2000), je vpliv SK na tvorbo različnih aromatičnih

snovi v sirih opisalo že več študij (Ortigosa in sod., 1999; Ayad in sod., 2000; El Soda in sod., 2000; Powell in sod., 2003; Randazzo in sod., 2007).

Mlekarske SK delimo po njihovih lastnostih in uporabi na več načinov. Po optimalni temperaturi delovanja delimo SK na mezofilne z optimalno temperaturo delovanja med 10–40 °C in termofilne z optimalno temperaturo delovanja med 40–50 °C. K mezofilnim SK spadajo *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc* sp. Termofilne SK v glavnem vključujejo *Streptococcus thermophilus* in laktobacile (*Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) (Fox in sod., 1990; Fox in Cogan, 2004).

Mezofilne SK delimo tudi glede na to, ali proizvajajo aromatične snovi in plin ali ne. Tako so tipa O tiste SK, ki vsebuje homofermentativne kulture *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, ki tvorijo kislino, ne pa tudi aromatičnih snovi in plina (Canteri, 2000). Kulture tipa L vsebujejo vrste *Leuconostoc*, ki so heterofermentativne. Tip D pa so kulture, ki vsebujejo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, oboji pa fermentirajo citrat do aromatičnih snovi (diacetil, acetoin) in CO₂. Kulture tipa LD pa vsebujejo obe vrsti (Rogelj in Perko, 2003).

Po načinu fermentacije delimo MKB, ki sestavljajo SK, na homofermentativne, kjer je glavni produkt fermentacije mlečna kislina, in na heterofermentativne, kjer nastanejo poleg mlečne kisline tudi drugi produkti, kot na primer CO₂, etanol, očetna kislina. Med homofermentativne MKB prištevamo laktokoke, streptokoke, večino laktobacilov in enterokoke, medtem ko so najpomembnejše heterofermentativne MKB iz rodu *Leuconostoc* in nekateri laktobacili (Choisy in sod., 2000a).

SK delimo tudi po sestavi, in sicer na naravne starterske kulture z nepoznano sevno sestavo ter na komercialne SK z znano sevno sestavo (Parente in Cogan, 2003). Ko govorimo o SK, gre navadno za en sev določene vrste, medtem ko gre pri večsevnih SK za več sevov ene vrste ter pri večsevnih mešanih SK za več različnih sevov iz različnih vrst. Pri mešanih SK pa so vrste in sevi delno ali povsem neznani.

2.4.3.1 Vloga starterskih kultur

Primarna funkcija SK v sirarstvu je produkcija mlečne kisline. Ob tem se zniža vrednost pH, kar vpliva na nadaljnje procese pri izdelavi sira ter tudi na končno sestavo in kvaliteto sira (Powell in sod., 2003). Tvorba kisline je pomembna lastnost SK, saj znižanje vrednosti pH v začetku izdelave sira vpliva na koagulacijo mleka (Mohar Lorbeg, 2008). Poleg tega kislina zavira aktivnost nestarterske mikrobiote, v kateri so lahko prisotni tudi nezaželeni in škodljivi mikroorganizmi (Powell in sod., 2003). SK pa lahko tudi direktno vplivajo na nastanek in razvoj različnih aromatičnih komponent in sicer iz laktoze, citrata in proteinov v mleku. Mikroorganizmi SK izločajo peptidaze in proteinaze, ki imajo zelo pomembno vlogo pri zorenju (Parente in Cogan, 2003). Ena od

proteinaz npr. vpliva prav na nastanek grenkih peptidov (Choisy in sod., 2000a). Proteinaze, ki se nahajajo v celični steni, hidrolizirajo kazeine v oligopeptide, ki jih nato peptidaze razgradijo do AK (Parente in Cogan, 2003). Dodane SK tako vplivajo tudi na večjo tvorbo AK. Dokazali so namreč že, da dodane SK vplivajo na povečano produkcijo AK (Nateghi, 2012), ki so prekursorji za številne hlapne snovi (Powell in sod., 2003).

PRIMARNE STARTERSKE KULTURE

Primarne SK so predvsem tiste, ki fermentirajo laktozo do laktata. Vključujejo tako mezofilne kot termofilne MKB (Ratray, 2002), ki ustvarijo pogoje za rast sekundarne mikrobiote (Bajt, 2011). Večina primarnih SK tvori tudi HOS, npr. diacetil iz citrata, ali pa s proteolitičnim delovanjem sodelujejo pri nastanku nekaterih aromatičnih snovi. Primarne SK ob ustreznih pogojih (pH, Eh) pripomorejo tudi k mikrobiološki varnosti sira (Parente and Cogan, 2003).

Primarne SK so lahko komercialno pripravljene ali naravne, ki se še vedno pogosto uporabljajo za izdelavo avtohtonih sirov po tradicionalnih postopkih. V naravnih SK, ki je lahko tudi fermentirana sirotka, so pogosto zastopani sevi vrst *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. fermentum*, *Str. thermophilus*, enterokoki ter mezofilni laktobacili. Uporaba naravnih SK ima pozitivne in negativne lastnosti. Njihove pozitivne tehnološke lastnosti so predvsem odpornost proti fagom ter tvorba protimikrobnih in aromatičnih snovi, so slabši tvorci kisline, lahko pa so prisotne tudi nezaželene ali celo škodljive bakterije (Parente in Cogan, 2003).

SEKUNDARNE STARTERSKE KULTURE

Glavna funkcija sekundarnih SK je oblikovanje arome, barve in teksture sira (Ratray, 2002). Od primarnih SK se razlikujejo predvsem po fizioloških ali biokemijskih lastnostih kot so sposobnost rasti pri nizki vrednosti pH, tvorba CO₂, izkoriščanje laktata, halotolerantnost (toleranca na slano okolje), specifična proteoliza, specifična lipoliza in transformacija AK v aromatične snovi. Z vidika taksonomije in funkcij so sekundarne SK bolj raznolike od primarnih (Parente in Cogan, 2003). K sekundarnim SK sodijo plesni, kvasovke ter nekatere bakterije: nestarterske MKB, propionske bakterije in bakterije, ki sodelujejo pri površinskem zorenju sira (npr. *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium casei*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Arthrobacter* spp.). Sekundarne SK se dodaja le pri izdelavi nekaterih sirov, kot so siri s plesnijo v testu ali na površini, švicarski tipi sirov ter siri z rdečo mažo na površini. Pri izdelavi švicarskih tipov sirov, kot sta ementalški sir ali grojer, imajo pomembno vlogo kot sekundarne SK propionske bakterije (*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*). Te povzročajo nastanek očes ter nekaterih aromatičnih snovi (propionat, acetat, prolin) (Ratray, 2002). K sekundarnim SK spadajo še bakterije rdeče maže *Brevibacterium linens*, kvasovke *Debaryomyces hansenii* in *Geotrichum*

candidum ter plesni *Penicillium roqueforti* in *P. camemberti*. Sekundarne SK se dodaja za izboljšanje ter predvsem oblikovanje značilnih senzoričnih lastnosti sira (Parente in Cogan, 2003).

2.4.3.2 Dejavniki, ki vplivajo na dodano startersko kulturo

Rast in delovanje SK v mleku sta odvisna od številnih dejavnikov, ki jih je med tehnološkim postopkom izdelave sira potrebno kontrolirati in spremljati. Že samo mleko, kot idealen rastni medij za SK, je surovina spremenljive kakovosti, na katero vplivajo pasma, stadij laktacije, prehrana, klima ter okolje, med tehnološkim postopkom pa na SK vplivajo temperatura mleka ob cepljenju s SK, dogrevanju in sušenju sirnega zrna, vrednost pH, fermentacija laktoze ter soljenje sira (Broome in sod., 2003).

Zelo pomembna je temperatura mleka ob dodatku SK ter temperatura dogrevanja in sušenja sirnega zrna. Temperaturo dogrevanja prilagajamo tipu SK (mezofilna, termofilna) oz. tipu sira, ki ga izdelujemo. Dvigovanje temperature naj bo zmerno, saj prehitro naraščanje temperature vpliva na aktivnost SK v fazi sušenja sirnega zrna (Broome in sod., 2003).

Vrednost pH mleka je pri sirjenju pomemben dejavnik, saj imajo mikroorganizmi, vključeni v SK, različne optimalne vrednosti pH delovanj, in sicer 5,5–6,2 za laktobacile ter 6,3–6,5 za laktokoke in leukonostoke (Broome in sod., 2003). Primerna vrednost pH mleka, ki jo dosežemo z zorenjem mleka za sir, vpliva še na aktivnost sirišča in encime, čvrstost koaguluma in sinerezo, obenem pa zaviralno deluje na nezaželene bakterije (Fox in Cogan, 2004).

SK, ki se jo doda pred usirjanjem, se do faze stiskanja prilagodi in med stiskanjem začne intenzivno delovati, saj je v sirnini še vedno dovolj laktoze. Med fermentacijo se bakterije dodane kot SK razmnožujejo, nastaja mlečna kislina in vrednost pH sira se znižuje. Potek fermentacije je odvisen od aktivnosti in količine SK. V primeru, da je fermentacija preintenzivna in vrednost pH med fermentacijo preveč pade, bo sir neustrezno zorel, rezultat pa je krhko, lomljivo in kislo testo (Bunch Kristensen, 1999). V primeru nezadostne fermentacije pa je sir gumijast z visoko vsebnostjo vode ter hitro pokvarljiv.

Količina dodanih SK je odvisna od željenega razvoja kisline ter od pogojev, ki vplivajo na samo aktivnost SK, in sicer kakovosti mleka (pH, vsebnost beljakovin) ter aktivnosti SK (Johnson in Law, 2010). Proizvajalci liofiliziranih SK priporočajo količino SK 1 UC oziroma 10 UC za 100 litrov pasteriziranega mleka. Fermentativna aktivnost SK je namreč definirana s standardno enoto UC.

Soljenje vpliva na okus in teksturo sira, saj je aktivnost mikrobiote in encimov odvisna od koncentracije soli v siru (Fox in Cogan, 2004). Ker je za večino MKB koncentracija

soli nad 5 % delno ali v celoti zaviralna (Broome in sod., 2002), naj koncentracije v siru ne bi presegle te vrednosti.

2.4.3.3 Izbira in primeri starterskih kultur ter njihov vpliv na aromo

Najpomembnejše tehnološke lastnosti SK, ki se uporabljajo v industrijski proizvodnji sira, so proizvodnja kisline, proteoliza in lipoliza, tvorba plina in arome ter zaviralen učinek proti tehnološko škodljivim mikroorganizmom. Razvoj najrazličnejših tehnik identifikacije in klasifikacije pa je omogočil poznavanje genetskih, biokemijskih in fizioloških lastnosti SK do te mere, da tipu fermentacije, ki ga želimo izpeljati, prilagodimo izbor ustrezne SK (Powell in sod., 2003). Ker SK s svojim delovanjem vplivajo na oblikovanje zelenih senzoričnih lastnosti sira, je priporočeno, da so v SK vključene bakterije z nizko proteolitično, a visoko peptidolitično aktivnostjo. SK vplivajo na nastanek arome sira, zmanjšujejo grenkobo in usmerjajo procese fermentacije (Tarakci in Tuncturk, 2008). Izbira SK je odvisna tudi od naravno prisotne mikrobiote mleka, ki ima lahko pomembno vlogo pri sooblikovanju organoleptičnih lastnosti sira. Pregled in poznavanje lastnosti sevov MKB omogoča pripravo njihovih optimalnih mešanic v obliki SK, ki nato v tehnološkem postopku izdelave sira tvorijo želene lastnosti, seveda pa pripravo SK opravljajo v visoko specializiranih laboratorijih (Powell in sod., 2003).

Za izdelavo različnih vrst sirov se tako glede na okus, aromo in teksturo uporabljajo različne SK. Bakterije, ki so vključene v SK za proizvodnjo sirov, pripadajo rodovom *Lactococcus* (*Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*), *Leuconostoc* (*Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*), *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*), *Lactobacillus* (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*), *Enterococcus* (*Ec. faecalis*, *Ec. faecium*) in *Propionibacterium* (*Pr. freudenreichii* subsp. *shermanii*). Bakterije iz vrst *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* sp. se dodaja pri izdelavi večine sirov. V proizvodnji sirov se uporablja še nekatere druge MKB in sicer *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Ec. faecalis* in *Ec. faecium* (Parente in Cogan, 2003). Za trde tipe sirov, kjer se sirno zrno dogreva pri višji temperaturi, se uporabljajo termofilne bakterije kot so *Str. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (Broome in sod., 2003; Tunick, 2014).

2.4.3.4 Naravna mikrobiota Nanoškega sira in uporabljene starterske kulture

Nanoški sir se izdeluje iz mleka, prirejenega na zaščitenem območju za Nanoški sir, ki s svojimi karakteristikami specifično doprinese k oblikovanju značilne mikrobiote surovega mleka. Mleko za Nanoški sir je podvrženo toplotni obdelavi s postopkom termizacije, ki zagotovi mikrobiološko varnost in delno uniči prisotno nativno mikrobioto tehnološko koristnih MKB. Zaradi delno uničene nativne mikrobiote je torej

potreben dodatek SK, vendar le toliko, da preživeli nativni mikrobioti pomaga voditi fermentacijo, a je pri tem ne preraste. Ker je praktično celoten tehnološki postopek odprt sistem, obstaja možnost vstopa okoliške mikrobiote, ki naseljuje sirarno, prostor za soljenje in zorilnico, v mleko oz. sirno zrno (Nanoški sir GIZ, 2013). Rondič (1996) je v svoji študiji ugotovila, da se sestava mikrobne populacije na površini Nanoškega sira spreminja med dvomesečnim zorenjem. Potrdila je prisotnost koliformnih bakterij in MKB, mikrokokov, plesni in kvasovk, medtem ko so bile po šestih tednih zorenja na siru prisotne tudi plesni, za katere je podala možnost, da pripadajo rodu *Penicillium*. Mikrobiološke analize Nanoškega sira so tudi pokazale prisotnost kvasovk na siru na začetku zorenja, ne pa tudi ob koncu zorenja, saj zaradi neugodnih ekoloških pogojev v siru odmorejo, ostanejo pa aktivni njihovi encimi, ki naj bi sodelovali pri oblikovanju končne arome Nanoškega sira (Nanoški sir GIZ, 2013).

SK, ki jo uporabljajo za izdelavo Nanoškega sira, sestavljata *Str. thermophilus* in *Lb. helveticus*. Za obe bakteriji je značilna proizvodnja mlečne kisline že med procesom sirjenja (Fox in sod., 1990), *Str. thermophilus* pa se tudi hitro razmnožuje in s tem vpliva na hitro znižanje vrednosti pH (Irlinger in Mounier, 2009).

Str. thermophilus je Gr⁺ bakterija v obliki kokov, ki se pogosto povezujejo med seboj v verižice. Je termofilan, homofermentativen ter fakultativen do obvezen anaerob, ki tvori L⁺ mlečno kislino (Tamime, 2002). Optimalna temperatura za njegovo rast je med 37 in 42 °C, preživi tudi pri 62 °C za 20–30 minut, precej manj pa mu ustrezajo nizke temperature (18–20 °C), ko je rast zelo omejena (Parente, 2010). *Str. thermophilus* hidrolizira laktozo z β-galaktozidazo, sintetizira acetaldehid, folno kislino ter majhne količine metanojske kisline in CO₂ (Wouters in sod., 2002). Poleg tega je *Str. thermophilus* slab proteolit in za svojo rast potrebujejo AK (Kocaoglu-Vurma in sod., 2008). *Str. thermophilus* dodajajo kot SK za proizvodnjo številnih sirov (grojer, ementalški sir, sir montaž ...). Uporablja se ga tudi za izdelavo mehkih sirov (mocarela, bri) ter še posebej za poltrde in trde sire in sire iz toplotno obdelanega mleka. *Str. thermophilus* je v SK pogosto v kombinaciji z drugimi MKB (npr. *Lb. helveticus*) (Tunick, 2014).

Lb. helveticus je homofermentativna ter termofilna bakterija z optimalno temperaturo delovanja okoli 42 °C (Choisy in sod., 2000a). Nekateri sevi so občutljivi za lizocim, ki se ga dodaja proti poznemu napihovanju v siru. Ko so v eni od študij dodali *Lb. helveticus* kot SK za izboljšanje okusa sirov z nižjo vsebnostjo maščob, so ugotovili, da se je ob dodatku *Lb. helveticus* povečala vsebnost nekaterih AK (glutamin, metionin, leucin), ki so tudi prekurzorji za nastanek aromatičnih snovi (Nategghi, 2012). Dodatek *Lb. helveticus* naj bi povečal vsebnost AK prolina, ki doprinese k slajšemu okusu sira (Beresford, 2000), pospešuje proteolizo (Nategghi, 2012) in lipolizo (Tarakci in Tuncturk, 2008), zmanjšuje grenkobo sira zaradi visoke aktivnosti aminopeptidaz, v določenih primerih pa naj bi vplival na oreškasto noto v sirih (Klein in sod., 2001;

Nateghi, 2012). *Lb. helveticus* pozitivno vpliva na oblikovanje senzorične kakovosti sira z izločanjem intracelularnih aminopeptidaz in sproščanjem AK, ki se lahko preoblikujejo v aromatične komponente, kot je na primer benzaldehid, za katerega je značilna aroma po mandljih. *Lb. helveticus* se kot SK uporablja pri izdelavi nekaterih trdih sirov, predvsem pri švicarskih tipih (Klein in sod., 2001).

2.4.4 Zorenje

Med zorenjem potekajo v siru biokemijske spremembe, ki dokončno oblikujejo teksturo, senzorične lastnosti in hranilno vrednost sira (Choisy in sod., 2000b). Zorenje pa je pogojeno s prisotnostjo številnih mikroorganizmov oz. njihovih encimov ter samih pogojev zorenja. Pomembne so tudi fizikalno-kemijske lastnosti mleka ter vsebnost substratov za fermentacijo (laktoza, citrat, AK), ki se med zorenjem spreminjajo (Renčelj in sod., 1995). Med zorenjem poteka tudi lipoliza, na katero lahko vpliva obdelava mleka (npr. pasterizacija, homogenizacija) (Choisy in sod., 2000b) ter rokovanje z mlekom (npr. transport in prečrpavanje mleka). Del prostih MK izvira že iz samega mleka, nekatere pa nastanejo med sirjenjem (Alewijn, 2006).

Sir zorimo v zorilnici pri konstantnih pogojih, ustreznih določenemu tehnološkemu postopku oziroma vrsti sira. Med pomembnejše parametre v zorilnici sodita zagotovo temperatura ter vlaga (Šabec, 1964). Za vsako vrsto sira je potrebna ustrezna kombinacija klimatskih pogojev, predvsem temperature in vlage, ki jih je med zorenjem potrebno skrbno vzdrževati. Klimatski pogoji odločajo o hitrosti zorenja, izgubi vlage, tvorbi skorje, rasti površinske mikrobiote ter s tem o končnih lastnostih sira (Slanovec, 1982).

Ker je ustrezna vlaga v zorilnici eden izmed najpomembnejših dejavnikov v procesu zorenja (Van den Berg in Exterkate, 1993), je pomembno, da jo spremljamo in po potrebi korigiramo (Fox in sod., 2004). Primerna vlaga v zorilnih prostorih za trde sire naj se giblje med 80 in 85 %. Taka vsebnost vlage preprečuje prekomerno ali pa premajhno sušenje sirov (Šabec, 1964). Presuha klima povzroči izgubo vlage in s tem vpliva tudi na ekonomske izgube (manjši izkoristek) ter negativno vpliva na kakovost sira. Prevladna klima pa pospešuje rast divje plesni na površini, siri se omehčajo in imajo tudi druge napake (Slanovec, 1982).

Temperaturo zorenja prilagajamo vrsti mikroorganizmov, ki sodelujejo pri zorenju oziroma tipu zorenja, saj z ustreznim temperaturnim režimom spodbujamo njihovo delovanje. Tako dosežemo ustrezne kemične, biokemične in fizikalne spremembe testa in vodimo oblikovanje značilne arome. Z nižanjem temperature zorilnice upočasnimo procese oziroma reakcije, ki potekajo med zorenjem (Renčelj in sod., 1995) ter s tem tudi tvorbo aromatičnih snovi in očes v sirnem testu (Law in sod., 2010).

Kar nekaj študij je že spremljalo vpliv povišane temperature v zorilnici na hitrost zorenja. Siri, ki so zoreli pri višji temperaturi, so zoreli hitreje, saj je povišana temperatura pozitivno vplivala na aktivnost mikroorganizmov in encimsko katalizirane reakcije, naraslo pa je tudi število nestarterskih MKB. Pri povišani temperaturi zorenja obstaja tudi večja verjetnost razvoja škodljivih ali celo patogenih mikroorganizmov. Zato je zorenje pri povišani temperaturi morda bolj primerno pri sirih, izdelanih iz pasteriziranega mleka, seveda pa mora biti, ne glede na temperaturo, zagotovljen dosleden higienski režim. Ena od študij tudi opisuje, da je imel sir, ki je zorel pri višji temperaturi od običajne sicer izrazitejšo aromo, vendar pa je bil slabše senzorično ocenjen, poleg tega je bil pri tem siru razvoj nestarterski MKB zelo hiter. V nekaterih trdih in poltrdih sirih z manj kompleksno populacijo MKB je višja temperatura zorenja vplivala na prehiter potek proteolize. Posledica tega je bil sir z grenkim okusom. Poleg tega lahko višja temperatura izzove hitrejši razvoj bakterij *C. tyrobutyricum*, ki povzročajo pozno napihovanje sirov. Ustrezno pospešeno protelizo so dosegli tudi tako, da je sir najprej krajši čas zorel pri višji temperaturi (1 teden pri 20 °C), temu pa je sledilo zorenje pri nižji temperaturi (8 mesecev pri 8 °C). Pospeševanje zorenja z višjo temperaturo je načeloma učinkovito, v določenih primerih pa lahko s povišano temperaturo zorenja izzovemo celo kvar sira. Večina rezultatov dosedanjih raziskav zaključuje, da s povišano temperaturo zorenja načeloma dosežemo želene fizikalne in senzorične lastnosti sira, kar pa ne izključuje možnosti razvoja neželene arome, neustreznih fizikalnih lastnosti sira in krajšo obstojnost sira (Law, 2010).

3 MATERIAL IN METODE

Raziskave, ki smo jih opravili v okviru doktorske disertacije, smo razdelili v tri sklope. V 1. sklopu smo se osredotočili na analize krme in mleka. V 2. sklopu smo podrobneje proučili aromatsko sestavo Nanoškega sira. V 3. sklopu pa smo se osredotočili na nekatere parametre, ki jih lahko spreminjamo med samim tehnološkim postopkom in vplivajo na končno aromo sira (starterska kultura, temperatura, lokacija zorenja).

3.1 ZASNOVA POSKUSA PO SKLOPIH

V 1. sklopu naloge je bil naš namen, da objektivno določimo razlike v krmnem obroku krav iz različnih sezon (poletne in zimske). Pri tem nas je zanimala tako struktura obroka kot tudi sama sestava. Poleg tega smo poiskali glavne razlike v aromatskem profilu osnovne krme (travne silaže, sveže trave) in mleka med sezonama. Primerjali pa smo tudi aromatski profil krme (sveže trave) in mleka prirejenega na območju, kjer poteka prireja mleka, namenjenega za predelavo v Nanoški sir ter izven tega območja.

Vsem 27 rejcem, ki oddajo mleko za predelavo v Nanoški sir, smo poslali vprašalnike o sestavi zimskega in poletnega krmnega obroka. Glede na rezultate vprašalnikov smo vzorčili krmo, ki je predstavljala osnovo obroka v zimski ter poletni sezoni. V zimski sezoni je bila to travna silaža, v poletni sezoni pa paša. Zato smo za zimski obrok določali osnovne kemijske parametre in HOS le v travni silaži kot osnovni zimski krmi, v sveži travi pa kot osnovni poletni krmi. Mleko in krmo smo za določanje kemijskih parametrov in HOS vzorčili enkrat v zimski in enkrat v poletni sezoni. Pri izbiri 6 rejcev, pri katerih smo vzorčili krmo in mleko, je bil pomemben kriterij večja količina oddanega mleka. Poleg tega je bilo teh 6 rejcev porazdeljenih po celotnem območju namenjenem prireji mleka za Nanoški sir.

Vzorci krme in mleka smo razdelili na dva dela. Prvi del je bil namenjen določanju osnovnih kemijskih parametrov (vsebnosti hranilnih snovi v krmi ter beljakovine, maščobe, laktoza, ŠSC ter SŠMO v mleku), drugi del pa za določanje aromatskega profila s pomočjo GC-MS. Nato smo predstavili značilne HOS vzorcev krme in mleka, odvzetih s področja za predelavo v Nanoški sir v poletni in zimski sezoni. Za primerjavo smo določili tudi aromagram vzorcev krme (sveže trave) in mleka, odvzetih s področja izven geografskega območja za Nanoški sir, kjer smo se osredotočili na terpeni.

Sklop 2 je temelj naloge, zato je tudi najbolj obsežen. Namen dela je bil določiti aromatski profil Nanoškega sira ter za posamezno HOS ovrednotiti spremembe med zorenjem v odvisnosti od sezone ter poiskati povezave z rezultati iz 1. sklopa (analize krme in mleka). Dobljene rezultate smo primerjali z rezultati že opravljenih študij in

predvideli možne vplive na nastanek in vsebnost posameznih HOS. Pri tem smo se osredotočili na študije sirov trdega tipa.

Aromatski profil Nanoškega sira smo spremljali med zorenjem tako v poletni kot zimski sezoni. V obeh sezonah smo vzorčili po dve različni seriji (Slika 12). Znotraj sezone je bilo med eno in drugo serijo po en teden razlike v datumu izdelave sira. V posamezni seriji smo najprej vzorčili sirnino, kar smo označili kot 0. dan zorenja. Vzorčenje sirnine je potekalo v sirarni mlekarne Vipava pred prešanjem, sir pa smo vzorčili v zorilnici mlekarne Vipava.

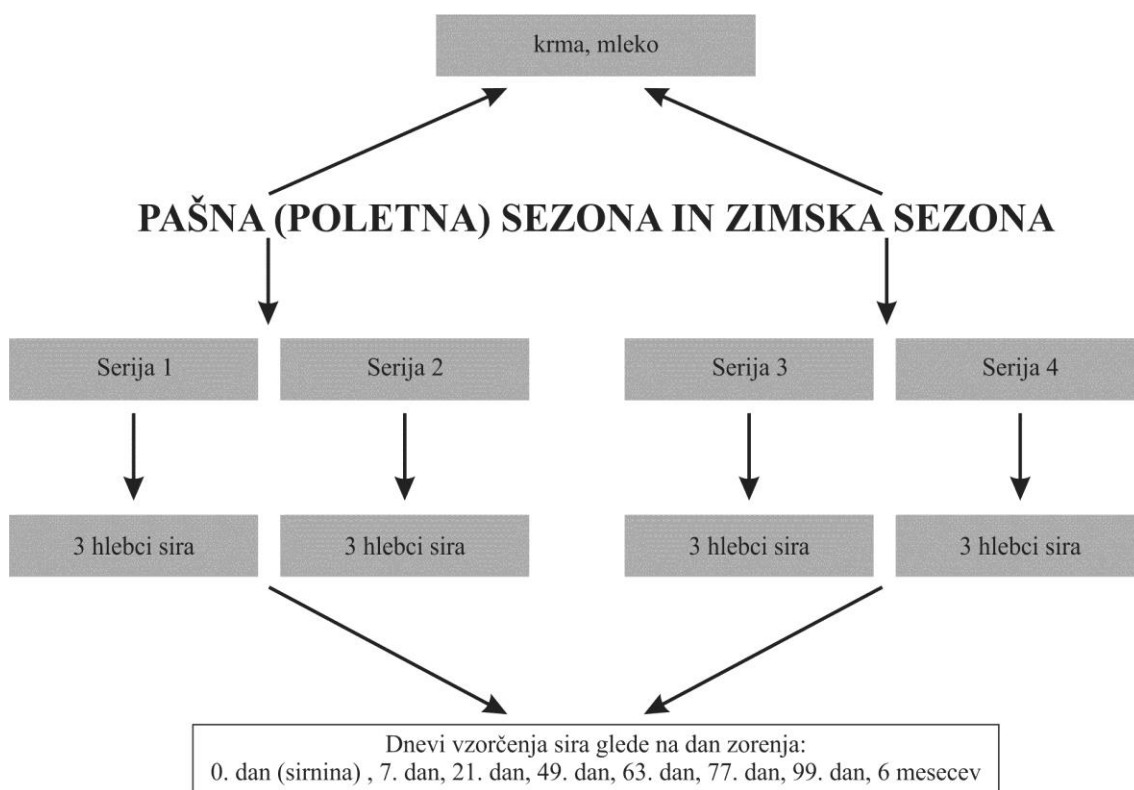
Sirnini smo določili aromatski profil v treh zaporednih meritvah. To pomeni, da smo 1. del vzorčene sirnine pripravili za določanje HOS za 1. meritev, 2. del sirnine za 2. meritev ter 3. del sirnine za 3. meritev. Nato smo iz iste serije, kot je bila odvzeta sirnina, izbrali 3 hlebce Nanoškega sira. Vsak posamezen hlebec znotraj serije smo nato vzorčili v izbranih časovnih intervalih 7., 21., 35., 49., 63., 77. in 99. dan zorenja ter po 6 mesecih zorenja. Tako smo dobili 21 (7 različnih časovnih intervalov vzorčeno v 3 hlebcih) različnih vzorcev Nanoškega sira v eni seriji. Vsak vzorec sira in sirnine smo pomerili v treh ponovitvah. Glede na to, da smo HOS ekstrahirali na vlakno 24 h, smo vzorce, ki smo jih vzorčili isti dan, prenesli v laboratorji, jih ekstrahirali na vlakno ter vlakno prenesli v instrument v GC-MS naslednji dan. Ko se je vlakno sprostilo, smo na istem vlaknu testirali še naslednja dva vzorca, ki smo ju predhodno zamrznili. Zamrzovanje ni imelo vpliva na analizo (predhodno testiranje vzorcev).

V tem sklopu smo proučili vpliv sezone (poletne in zimske) ter čas zorenja na prisotnost oz. vsebnost posameznih HOS v Nanoškem siru. Vzorčenje sirnine in sira je potekalo pri vseh serijah enako. Poletna sezona je vključevala 1. in 2. serijo, zimska sezona pa je vključevala 3. in 4. serijo (Slika 12).

V tem sklopu smo primerjali tudi aromagram 1. poletne sezone (leto 2011) z aromagramom 2. poletne sezone (leto 2012). Tudi znotraj 2. poletne sezone smo vzorčili dve različni seriji. V vsaki seriji pa smo vzorčili po 5 različnih hlebcev Nanoškega sira. Za primerjavo poletnih sezon smo izbrali 63. dan zorenja, ko Nanoški sir že doseže konzumno zrelost. V 2. poletni sezoni smo tako dobili 10 različnih vzorcev sira na 63. dan zorenja (5 hlebcev sira znotraj vsake serije 2. poletne sezone). Aromatski profil teh vzorcev Nanoškega sira iz 1. poletne sezone smo primerjali z aromatskim profilom vzorcev Nanoškega sira iz 2. poletne sezone.

Poleg tega smo aromatski profil Nanoškega sira primerjali z aromatskim profilom geografsko zaščenega sira Tolminc. V primerjavo smo vključili po eno serijo vsakega sira, ki je bil izdelan v mesecu aprilu. Znotraj vsake serije smo vzorčili 3 hlebce. Sir smo vzorčili po vsaj dveh mesecih (+3 dni Nanoški sir, +7 dni sir Tolminc). Tako smo dobili 3 vzorce Nanoškega sira in 3 vzorce sira Tolminc. Za vsak vzorec smo opravili tri meritve, na enak način kot je opisano že zgoraj.

Podrobnejše vzorčenje posameznega sira oziroma hlebca smo opisali v naslednjem poglavju 3.2 Material.



Slika 12: Shema zastavljenega dela iz 2. sklopa

Figure 12: The scheme of planned work from the 2nd set

Zadnji, 3. sklop pa je bil namenjen manjšim dodatnim poskusom, v katerih smo spreminjali nekatere parametre, ki bi lahko vplivali na razvoj oziroma nastanek HOS v siru. Predstavljene so spremembe aromatskega profila HOS v siru, ki so nastale kot posledica različne lokacije zorenja (območje Nanoškega sira, drugo območje), različne temperature zorenja (običajna, višja), različne količine dodane SK (običajna, večja) iz mleka odvzetega iz različnih območij (mleko iz območja, kjer običajno odbirajo mleko za predelavo v Nanoški sir ter iz drugega izbranega območja). Na koncu smo primerjali aromatski profil Nanoškega sira, ki je zorel na klasičen način in sira, ki je zorel na tropinah.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Krmni obrok, mleko in sir

Vsem 27 rejcem, ki oddajajo mleko za predelavo v Nanoški sir, smo najprej poslali vprašalnik, ki je vseboval vprašanja o sestavi krmnega obroka (poletnega in zimskega) ter vprašanja o oddanem mleku (količina oddanega mleka).

Podatke o zimskem obroku je oddalo 10 rejcev, podatke o poletnem obroku pa 16 rejcev. V zimskem obroku je glavnilno predstavljala travna silaža, medtem ko je v poletnem bila to paša. V nadaljevanju smo pašo – poletno krmo definirali kot svežo travo.

V poskus smo vključili krmo (svežo travo, travno silažo) in mleko (iz zimske in poletne sezone) šestih kmetij iz vasi Lome in Zadlog, ki oddajajo mleko za predelavo v Nanoški sir. Kriterija za izbiro rejcev, pri katerih smo vzorčili krmo in mleko, sta bila količina prirejenega in oddanega mleka ter enakomerna porazdeljenost kmetij po celotnem območju, namenjenem oddaji mleka za predelavo v Nanoški sir.

Glede na to, da gre za dvodnevno zbiranje mleka, smo vzorčili mleko štirih molž neposredno pred prečrpavanjem mleka v cisterno. Tako krmo kot mleko smo vzorčili enkrat v zimski in enkrat v poletni sezoni pri šestih rejcih, ki smo jih izbrali na podlagi že omenjenih kriterijev (količine in lokacije). V posamezni sezoni smo vzorčili mleko in krmo na isti dan pri vseh šestih rejcih.

V poletni sezoni smo svežo travo vzorčili na različnih točkah na travnikih, kjer so se pasle krave. V zimski sezoni smo krmo (travno silažo) vzorčili iz bal oziroma silosov. Krmo (svežo travo, travno silažo) smo pred analizo homogenizirali s paličnim mešalnikom. Vzorce krme in mleka smo prenesli v laboratorji ter jim določili osnovne kemijske parametre in HOS. Del vzorcev mleka ter homogenizirane vzorce krme, namenjene za določanje HOS, ki jih nismo analizirali isti dan, smo shranili v zamrzovalniku pri $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Časovni okvir vzorčenja Nanoškega sira je opisan v prejšnjem poglavju (3.1 Zasnova poskusa po sklopih). Vzorčenje Nanoškega sira je potekalo v zorilnici mlekarne Vipava ob izbranih časih med zorenjem. V posamezen hlebec smo s 15 cm dolgim sirarskim svedrom zavrtali z oboda proti notranjosti in izvlekli približno 10 cm dolg svaljek. 1,5 cm zunanjega dela svaljka (od skorje proti notranjosti) smo odrezali, z njim začepili nastalo izvrtino v hlebcu ter vse skupaj premazali z voskom. S tem smo zmanjšali vdor kisika in morebiten razvoj plesni na vzorčenem delu hlebca. Preostali del svaljka smo vstavili v čisto vzorčevalno posodico. Na opisan način smo iz posameznega hlebca pridobili dva svaljka, ki smo ju izvrtali iz različnih strani hlebca. V laboratoriju smo nato svaljka homogenizirali v skupen vzorec. Del homogeniziranega vzorca sira, ki ga nismo analizirali isti dan, smo shranili v zamrzovalniku pri $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po opisanem načinu smo vzorčili vse sire, ki smo jih analizirali v nalogi.

3.2.2 Kemikalije

Kemikalije, ki smo jih uporabili v posameznih analizah krme, mleka in sira, so navedene v preglednici 1.

Preglednica 1: Kemikalije uporabljene v analizah krme, mleka in sira

Table 1 : Chemicals used in the analyses of feed, milk and cheese

Uporabljene kemikalije	
– heksanal (Alfa Aeser, Nemčija)	– sabinen (Sigma-Aldrich, ZDA)
– oktanal (Alfa Aeser, Nemčija)	– p-cimen (Aldrich, ZDA)
– 1-heksanol (Alfa Aeser, Nemčija)	– heptanojska kislina (Sigma-Aldrich, Švica)
– 2-oktanon (Alfa Aeser, Nemčija)	– 2-butanon (Sigma-Aldrich, Nemčija)
– 2-etil heksanol (Fluka Sigma-Aldrich, Nemčija)	– benzaldehid (Sigma-Aldrich, Nemčija)
– 3-metil 1-butanol (Fluka, Švica)	– oktanojska kislina (Sigma-Aldrich, ZDA)
– očetna kislina (Fluka, Nemčija)	– 3-metil butanal (Sigma-Aldrich)
– α -pinen (Fluka, Švica)	– 2-metil butanojska kislina (Merck Schuchardt OHG, Nemčija)
– 2-butanol (Fluka Sigma-Aldrich, Germany)	– dekanjska kislina (Merck Schuchardt OHG, Nemčija)
– etil ester očetne kisline (Fluka, Švica)	– 2-pentanol (Merck Schuchardt OHG, Nemčija)
– etil ester heksanojske kisline (Fluka, Švica)	– nonanal (Merck Schuchardt OHG, Nemčija)
– 2-pentanon (Fluka, Švica)	– 2-heptanon (Merck Schuchardt OHG, Nemčija)
– δ -dekalakton (Sigma-Aldrich, ZDA)	– 2-nonanon (Merck Schuchardt OHG, Nemčija)
– 1-oktanol (Sigma-Aldrich, ZDA)	– limonen (Merck Schuchardt OHG, Nemčija)
– 2,3-butandiol (Sigma-Aldrich, ZDA)	– 3-hidroksi-2-butanon (Merck Schuchardt OHG, Nemčija)
– 1-butanol (Sigma-Aldrich, ZDA)	– natrijev sulfat (Sigma-Aldrich, ZDA)
– 3-metil butanojske kisline (Sigma-Aldrich, ZDA)	– etanol 96 vol. % (Sigma-Aldrich, ZDA)
– butanojska kislina (Aldrich, ZDA)	– čistilo, Unisol (Bussetti RCO, Avstrija)
– β -kariofilen (Sigma-Aldrich, ZDA)	– zaščitni premaz za sire, cleriplast (Caglifacio Clerici SpA, Italija)

3.2.3 Aparature in oprema

Uporabljene aparature in oprema v analizah krme, mleka in sira so navedene v preglednici 2.

Preglednica 2: Aparature in oprema, uporabljena v analizah krme, mleka in sira

Table 2: Apparatures and equipment used in the analyses of feed, milk and cheese

Aparature in oprema
Oprema-laboratorijski material
– hladilna torba
– injekcijska brizga (Gas tight)
– pipete
– plastični lončki, posodice
– plastični pladnji
– sirarski sveder
– SPME injekcijska igla (Supelco, Bellefonte, PA, US)
– steklene bučke (10 mL)
– steklene bučke (100 mL)
– ščetke za čiščenje bučk
– štoparica
– tehtnica
– termometer
– viala (20 mL)
– vlakna DVB-CAR-PDMS, CAR-PDMS, PDMS, DVB-PDMS, PA (Supelco)
– zamaški (18 mm, silikon/PTFE) za viala in bučke (Supelco)
– žlička za tehtanje
Aparature
– Agilent ChemStation Software
– BactoScan FC (Foss Electric, Hillerød, Denmark)
– kolona Rtx-20 (60 m, 0.25 mmID, 1µm, Restek, USA)
– Milkoscan 6000FT (Foss Electric, Hillerød, Denmark)
– plinski kromatograf (Agilent 6890 Series) z masno selektivnim spektrometrom (Agilent 5973)
– program Statistica za Windows software
– Somacount 150 (Bentley Instruments, Inc. Minnesota, USA)
– ultrazvočna kopel
– vodna kopel

3.3 METODE

3.3.1 Metode vrednotenja različnih pogojev zorenja na oblikovanje aromatskega profila Nanoškega sira

V 3. sklopu naloge smo opravili dodatne preliminarne poskuse, v katerih smo spreminjali določene parametre, ki bi utegnili vplivati na spremembe aromatskega profila Nanoškega sira. Proučevali smo naslednje parametre: različna surovina, različna lokacija zorenja, različna količina dodanih SK in različna temperatura zorenja ter zorenje sira na tropinah.

3.3.1.1 Različna surovina

Pri proučevanju vpliva surovine na aromatski profil sira smo analizirali sir, narejen iz mleka iz tipičnega območja (Črnovrška planota), kjer odbirajo mleko za predelavo v Nanoški sir (»odbrano« mleko) ter z drugega izbranega območja (okolica Postojne) (»neodbrano« mleko). Iz »odbranega« in »neodbranega« mleka smo nato v sirarni izdelali Nanoški sir po tehnološkem postopku za Nanoški sir, sirjenje iz obeh vrst mleka pa smo izvedli v dveh serijah. Iz vsake serije smo 63. dan zorenja vzorčili 3 hlebce po predhodno navedenem postopku (2.1.2 Tehnološki postopek izdelave Nanoškega sira).

3.3.1.2 Različna lokacija zorenja

Za ovrednotenje vpliva različne lokacije zorenja na profil HOS v zrelem Nanoškem siru, smo izbrali 4 hlebce Nanoškega sira iz ene serije v zimski sezoni. Od tega sta dva hlebca zorela v zorilnici mlekarne Vipava v vinorodnem okolišu (kot je zahtevano v specifikaciji za Nanoški sir), druga dva hlebca Nanoškega sira pa v zorilnici izbrane sirarne, ki leži izven vinorodnega okoliša. Zorilnica v nevinorodnem okolišu, natančneje v Poljanah pri Škofji Loki, je imela primerljive pogoje (vlažnost, temperatura zorenja, ročna nega sirov) kot jih ima zorilnica v mlekarni Vipava. Nanoški sir smo na obeh lokacijah vzorčili 63. dan zorenja. Poleg tega smo s površine hlebcev vzeli brise in določali prisotnost aerobnih mezofilnih bakterij, kvasovk, plesni ter mikrokokov.

Pri proučevanju vpliva različne lokacije zorenja smo odvzeli tudi brise hlebcev sira, ki so zoreli na dveh različnih lokacijah. Za vsak hlebec sira smo glede na velikost zgornje površine hlebca (35 cm²) določili tri mesta oziroma točke odvzema brisa v velikosti 4 cm x 5 cm. Analize brisov hlebcev sira so opravili na Nacionalnem veterinarskem inštitutu enote Nova Gorica, in sicer aerobne mezofilne bakterije po standardu ISO 4833-1 (2013), kvasovke in plesni po standardu ISO 7954 (1987) ter mikrokoke po interni bakteriološki metodi laboratorija.

3.3.1.3 Različna količina dodanih starterskih kultur ter temperature zorenja

Za ugotavljanje vpliva različne količine dodane SK ter temperature zorenja na HOS v siru je bilo mleko odvzeto z območja prireje mleka za proizvodnjo Nanoškega sira. Sirjenje smo izvedli v dveh serijah in obeh izdelali sir skladno s specifikacijo za Nanoški sir, le da smo v eni seriji sirili z dodatkom običajne količine SK, v drugi pa smo sirili z dodatkom večje količine SK. Sire, izdelane z običajno in povišano količino dodane SK, smo 63. dni zoreli pri običajni temperaturi zorenja (12 °C) ter povišani temperaturi zorenja (18 °C).

Poskus smo izvedli v dveh delih, v obeh primerih se je sirilo manjšo količino mleka in sicer 100 l. V prvem delu smo sirili po običajnem tehnološkem postopku za Nanoški sir, v drugem delu pa se je sirilo z večjo količino SK.

3.3.1.4 Zorenje sira na tropinah

Za primerjavo klasičnega zorenja Nanoškega sira smo dali zoreti Nanoški sir tudi na tropine, in sicer na dva načina. Pri prvem načinu zorenja na tropinah smo sire po soljenju za 17 dni potopili v tropine grozdja sorte Cabernet Sauvignon ter nato še za 50 ur v rdeče vino zvrst Barbera-Merlot. Sir je nato zorel do 77. dneva zorenja v zorilnici.

Pri drugem načinu zorenja na tropinah smo po 6 tednih klasičnega zorenja Nanoški sir za 17 dni potopili v tropine grozdja sorte Cabernet Sauvignon in nato za 50 ur v rdeče vino zvrsti Barbera-Merlot. Poleg aromatskega profila sira smo določili tudi aromatski profil vin Cabernet Sauvignon in Barbera-Merlot po isti metodi kot za krmo oziroma mleko. Opravili smo tudi senzorično analizo sirov, in sicer smo se osredotočili predvsem na okus.

3.3.2 Metode določanja hlapnih organskih spojin v siru, krmi in mleku

3.3.2.1 Razvoj in optimizacija metode SPME-GC-MS za določanje hlapnih organskih spojin v siru

Za določanje aromatičnih spojin oziroma HOS, prisotnih v proučevanih sirih, smo uporabili mikroekstrakcijo plinske faze na trdnem nosilcu (SPME). Za identifikacijo in kvantifikacijo izoliranih aromatičnih snovi pa smo uporabili plinsko kromatografijo z masnim spektrometrom (GC-MS). Določene HOS smo potrdili tudi s standardi.

Pri optimizaciji metode ekstrakcije smo testirali različne pogoje oziroma parametre. Predvidevali smo, da vsaka sprememba ekstrakcijskega parametra, ki neposredno vpliva na porazdelitveno razmerje in hitrost adsorpcije, vpliva tudi na izkoristek in ponovljivost ekstrakcije. Glavni kontrolni parametri so bili temperatura vzorca, velikost in oblika vzorčevalne posode, količina vzorca, ekstrakcijski čas ter izbira adsorpcijskega vlakna.

Proučili smo optimalne lastnosti posameznih vlaken. Naš namen je bil izbrati vlakno, ki je ustrezalo ekstrakciji čim večjega števila aromatičnih spojin. Izbira SPME vlakna je namreč odvisna od HOS, ki so prisotne v določeni hrani. V siru so prisotne skupine HOS, ki imajo različno polarnost (Pinho in sod., 2003). Naš namen je bil tudi izbrati najprimernejšo metodo ekstrakcije.

Testiranje vlaken

Testirali smo sivo vlakno, ki ga sestavljajo divinilbenzen–karboksen–polidimetilsiloksan (DVB-CAR-PDMS), črno vlakno iz CAR-PDMS, rdeče iz PDMS, modro iz DVB-PDMS ter belo iz poliakrilata (PA).

Temperatura

S sivim (DVB-CAR-PDMS) in črnim vlaknom (CAR-PDMS) smo testirali ekstrakcijo pri 25 °C in 37 °C. Ti dve temperaturi smo izbrali, ker je prva standardna temperatura, medtem ko je druga telesna temperatura. Po podatkih iz literature nižjih temperatur ni bilo smiselno izbrati.

Velikost in oblika vzorčevalne posode

Uporabili smo dve različni posodi, in sicer 20 ml vialo in 100 ml bučko.

Izbira in priprava internega standarda

Za interni standard smo izbrali 1-oktanol, ki smo ga pred analizo dodali v vse pripravljene vzorce. In sicer smo dali 5 µl 1-oktanola (koncentracije 1,37 mg/ml) v vzorec sira (4 g), mleka (50 ml) in krme (4 g). Pred tem smo za standard testirali 5-metil 2-heksanon, ki so ga že uporabili v predhodnih študijah o HOS v siru (Sunsen in sod., 2002). Izkazalo se je, da smo ob dodatku 5-metil heksanona prekrili vrh 1-heksanola. Izbrani 1-oktanol ni vplival na analizo.

Za interni standard smo izbrali 1-oktanol, ki ima polarni del (-OH skupina) kot tudi nepolarni del (veriga C8). Glede na to, da ima 1-oktanol tako polarno kot nepolarno naravo je primeren za interni standard, poleg tega je to spojina, ki se jo uporablja pri porazdelitvenih koeficientih med organsko in vodno fazo.

Interni standard (1-oktanol) smo pripravili po sledečem postopku: 10 µl standarda vbrizgamo s pipeto v 10 ml bučko ter odtehtamo maso dodanega internega standarda, ki je znašala 13,7 mg. Po dodatku internega standarda smo dolili absolutni etanol do oznake 10 ml bučke.

Povprečna površina vseh meritev 1-oktanola, ki smo jo izračunali ob dodajanju v vzorce sira med spremljanjem zorenja in sezone Nanoškega sira, je znašala 205126699,93 z relativnim standardnim odklonom 0,34. Slednja površina internega standarda ustreza koncentraciji 1-oktanola 17,13 mg/kg sira. V preglednici 3 so poleg vsebnosti podane tudi koncentracije HOS na primeru 63. dneva zorenja Nanoškega sira v poletni sezoni.

Poudariti moramo, da se glede na odzivnost vlakna in glede na komponente (63 spojin) opaža različna afiniteta vlakna do internega standarda v primerjavi s posamično proučevano komponento (alkoholi, ketoni, maščobne kisline, terpeni ...), zato smo se odločili, da je podajanje koncentracije izražene v mg/kg (sira) oz. mg/l (mleka) zgolj orientacijske narave in služi za podajanje okvirne koncentracije posamezne spojine. Statistično pa je bilo bolj korektno operirati s površinami, saj nam pretvarjanje v koncentracijo vnaša dodatno napako in širi negotovost ter tako vnaša dodaten vir variabilnosti. Na podlagi navedenega površin nismo preračunali na interni standard, jih pa lahko kadarkoli izrazimo v predstavitvene namene za orientacijo.

Določanje hlapnih organskih spojin v siru z metodo SPME-GC-MS

Pred meritvami je bilo potrebno SPME vlakno kondicionirati 30 minut pri 250 °C oziroma 2 x 30 minut pri 250 °C v primeru, da vlakno ni bilo rabljeno dlje časa.

V 20 ml vialo smo dali 4 g homogeniziranega sira in dodali 5 µl predpripravljenega standarda. Po iniciranju standarda smo vzorce takoj pokrili s pokrovčki.

Ko smo imeli vzorec pripravljen, smo v pokrovček vbodli s SPME injekcijsko iglo ter nato potisnili SPME vlakno iz igle nad vzorec. SPME vlakno je bilo na injekcijski igli nameščeno tako, da je bila razdalja med konico SPME vlakna in vzorcem 1 cm. SPME vlakno smo prej tudi kondicionirali. Ekstrakcija je potekala 24 h pri 25±1 °C v kondicioniranem in zatemnjenem prostoru, da so se HOS iz sira adsorbirale na SPME vlakno.

Po 24 urah smo vlakna prenesli na injektor plinskega kromatografa, kjer je potekala desorpcija ekstrahiranih komponent.

Iz vsakega posameznega vzorca hlebca smo odvzeli tri enake dele za 3 meritve (podroben opis je opisan v poglavju 3.1 Zasnova poskusa po sklopih). V embalažni enoti smo imeli 3 SPME vlakna. Posamezno vlakno smo oštevilčili. Zaradi zanesljivosti rezultatov smo za vsako meritev istega hlebca uporabili identično SPME-vlakno z isto identifikacijsko številko.

Kromatografski sistem GC-MS je bil sestavljen iz plinskega kromatografa (Agilent 6890 Series) in masnega spektrometra (Agilent 5973).

Injiciranje je potekalo preko dostopnega »splitless« vzhoda. Ločevanje HOS pa je potekalo na analizni koloni GC-MS sistema (60 m, 0,25 mm, 1µm, Restek Rtx-20 USA). Temperaturno-časovni program je bil sledeč: začetna temperatura 50 °C (2 min), 10 °C/min do 150 °C (3 min), 10 °C/min do 250 °C (5 min), v skupnem trajanju 30 min. Elektroionizacija je potekala pri 70 eV, temperatura kvadrupola je bila 150 °C, ionskega izvora pa 230 °C. Nosilni plin je bil helij 5.0 (99,999 % čist He). Temperatura desorpcije je potekala pri 250 °C.

HOS smo identificirali na podlagi njihovega retencijskega časa (Rt) ter s pomočjo masnih spektrov posamezne komponente. Poleg tega smo nekatere HOS identificirali tudi s standardnimi raztopinami posamezne komponente (podano v Preglednici 13). Masne spektre smo nato primerjali s spektri iz spektralne knjižnice (NIST 02). Pri identifikaciji nam je računalniški program predlagal masne spektre z največjim odstotkom ujemanja tako intenzitete kot razmerja med maso in nabojema (m/z). Kromatografske vrhove smo nato integrirali s programsko opremo ChemStation E.02.00

SP2. Tako smo za posamezno komponento dobili površine kromatografskih vrhov, ki smo jih uporabili pri statistični obdelavi podatkov.

3.3.2.2 Določanje hlapnih organskih spojin v mleku ter travni silaži in sveži travi

V 100 ml bučko smo najprej dodali 5 g Na_2SO_4 , ki zviša ionsko moč raztopine in s tem omogoči učinkovitejšo ekstrakcijo. Nato smo dolili 50 ml vzorca mleka. Vzorce mleka smo kondicionirali 45 min pri 37 ± 1 °C. Sledila je 45 min ekstrakcija na SPME sivem vlaknu pri enaki temperaturi (37 ± 1 °C). Desorpcija in ločevanje v GC-MS sta potekala pri istih pogojih kot pri sirih. Za analize krme in mleka smo izbrali sivo vlakno (DVB-CAR-PDMS) zaradi boljše odzivnosti nekaterih terpenov v primerjavi s črnim vlaknom.

Vzorce krme (travne silaže in sveže trave) smo najprej na grobo sesekljali ter nato homogenizirali s paličnim mešalnikom. Po 4 g homogenata krme smo s pinceto prenesli v 100 ml plinotesno bučko. Ostale faze analize so potekale pri istih pogojih kot pri mleku.

3.3.2 Struktura krmnega obroka ter kemijske analize travne silaže, sveže trave in mleka

STRUKTURA KRMNEGA OBROKA

Kot smo že navedli v poglavju 3.2. Material, smo najprej vsem 27 rejcem, ki oddajajo mleko za predelavo v Nanoški sir, poslali vprašalnik, ki je vseboval vprašanja o sestavi krmnega obroka (poletnega in zimskega) ter vprašanja o oddanem mleku (količina oddanega mleka). Predpostavljali smo, da sta osnovni krmi v zimski sezoni silaža in v poletni sezoni paša oziroma sveža trava. Kljub temu smo želeli strukturo krmnega obroka preveriti oziroma potrditi. Tako smo lahko na podlagi zbranih odgovorov iz poslanih vprašalnikov določili osnovno krmo v poletni (paša/sveža trava) in zimski sezoni (travna silaža).

KEMIJSKA ANALIZA TRAVNE SILAŽE IN SVEŽE TRAVE

Vzorce travne silaže (iz zimske sezone) in sveže trave krme (iz poletne sezone), ki so jih zaužile krave molznice, smo analizirali z infrardečo refleksijsko spektroskopijo (NIR) in atomsko absorpcijsko spektroskopijo po internih metodah Agroživilskega laboratorija na Kmetijskem zavodu Nova Gorica. Na ta način smo določili vsebnost surovih maščob, beljakovin in vlaknin ter posameznih mineralov. Vzorce krme oz. trave smo odvzeli pri šestih rejcih. S pomočjo teh podatkov in vprašalnika o sestavi krmnega obroka smo lahko objektivno določili razlike v kakovosti zaužite krme oz. trave krav molznic v zimskem in poletnem času.

KEMIJSKA ANALIZA MLEKA

Vzorci mleka so bili odvzeti ob AT4 kontrolah pri istih šestih rejcih kot smo vzorčili tudi krmo. AT4 je ena izmed metod kontrole prireje mleka in poteka vsake štiri tedne.

Osnovne parametre kemijske kakovosti mleka vsebnosti beljakovin, maščobe, laktoze, sečnine smo določili z aparaturo Milkoscan 6000FT, ki deluje na principu infrardeče spektrometrije, ki je standardizirana po mednarodnem standardu ISO 9622/ IDF 141 (2013). Metoda temelji na količini IR svetlobe določenih valovnih dolžin, ki jo absorbira posamezna komponenta mleka.

Vsebnost somatskih celic smo določili z aparaturo Bentley Somacount-om, ki deluje na principu pretočne citometrije ob osvetljevanju s snopom laserske svetlobe. Skupno število mikroorganizmov pa smo določili z aparaturo Bactoscan po interni metodi v povezavi s standardi ISO 21187/ IDF 196 (2004) in IDF 161A (1995).

3.3.3 Statistična analiza

Rezultate smo zbrali in uredili v programu Microsoft Excel 2010. Urejene podatke smo nato statistično obdelali s statistično programsko opremo Statistica 10. Uporabili smo različne metode statistične obdelave, kot so opisna statistična analiza, analiza variance (ANOVA), primerjava dveh vzorcev ter metoda glavnih osi (angl. principal component analysis, PCA).

3.3.3.1 Opisna statistična analiza

Opisna statistika vključuje različne srednje vrednosti (npr. aritmetična sredina, mediana) in mere razpršenosti (npr. standardni odklon, relativni standardni odklon).

Pri statistični obdelavi površin kromatografskih vrhov smo za računanje povprečne vrednosti ($\bar{A}$) uporabljali naslednjo enačbo:

$$\bar{A} = \frac{\sum_{i=1}^n A_i}{n} \quad \dots (1)$$

kar pomeni:

$\bar{A}$ – povprečno vrednost,

A_i – izmerjeno vrednost,

n – število meritev

Merilo za ponovljivost je bil standardni odklon (s):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_i - \tilde{A})^2}{n-1}} \quad \dots (2)$$

Pri prikazu rezultatov smo ponekod tudi navedli relativni standardni odklon oziroma relativno standardno napako (RSD), ki smo jo izračunali z naslednjo enačbo:

$$RSD = \frac{s}{\tilde{A}} \quad \dots (3)$$

3.3.3.2 ANOVA

Statistični model

S statističnim modelom formaliziramo odnose med spremenljivkami v obliki matematične enačbe. Statistični model opiše, kako ena ali več neodvisnih spremenljivk (vplivov) opiše oziroma pojasni eno ali več odvisnih spremenljivk. V našem primeru smo za analiziranje vplivov na vsebnost posamezne komponente uporabili splošen linearni model z vgnezdjeno analizo variance:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + N_{ij} + h_{ijk} + Z_l + e_{ijkl} \quad \dots (4)$$

y_{ijkl} – vsebnost posamezne hlapne organske spojine, odvisna spremenljivka

μ – srednja vrednost

S_i – sistematski vpliv sezone, kategorična spremenljivka;

$i=1,2$

S_1 – poletna sezona, S_2 – zimska sezona

N_{ij} – sistematski vpliv serije, vgnezden znotraj sezone, kategorična spremenljivka

$j=1,2,3,4$

N_1 – 1. poletna serija, N_2 – 2. poletna serija, N_3 – 1. zimska serija, N_4 – 2. zimska serija

h_{ijk} – naključni vpliv hlebca, vgnezden znotraj serije in sezone, kategorična spremenljivka

$k=1-12$

$k1-k3$ – hlebci iz 1. poletne serije, $k4-k6$ – hlebci iz 2. poletne serije

$k7-k9$ – hlebci iz 1. zimske serije, $k10-k12$ – hlebci iz 2. poletne serije

Z_l – vpliv dneva zorenja, ordinalna spremenljivka

l= 0. dan (sirina), 7. dan, 21. dan, 35. dan, 49. dan, 63. dan, 77. dan, 99. dan

e_{ijkl} – ostanek

Poleg tega smo uporabili tudi Tukey-jev test. To je eden izmed post-hoc testov, s katerim ugotavljamo, kakšne so razlike med povprečnimi vrednostmi posameznih statističnih vzorcev.

3.3.3.3 Analiza primerjave dveh ali več odvisnih vzorcev

t-test za odvisna vzorca

t-test za odvisna vzorca uporabimo za analizo značilnih razlik med dvema povprečnima vrednostima dveh odvisnih vzorcev. Ta statistični test primerja torej povprečne vrednosti dveh vzorcev ob predpostavki, da sta varianci obeh vzorcev enaki (Bastič, 2006).

Wilcoxon-ov test za parne vzorce

Test se uporablja za primerjavo dveh vzorcev in primerja njuni mediani. Ničelna hipoteza pravi, da med medianama vzorcev ni razlik (Bastič, 2006). Wilcoxonov test uporabljamo za ugotavljanje razlik med dvema povprečnima vrednostima za odvisna vzorca (Statistica 10, 2011), ko proučevana številska spremenljivka ni normalno porazdeljena ali za opisne spremenljivke, merjene na ordinalni skali. Test predstavlja neparametrična ekvivalenta parametričnemu *t*-testu. Pri obeh testih se vrednosti številske spremenljivke pretvorijo v range, tako da se najmanjši vrednosti pripiše rang 1, naslednji najmanjši rang 2 itd. Za izračun testne statistike se uporabijo vrednosti rangov (Bastič, 2006).

3.3.3.4 Analiza z metodo glavnih osi (PCA)

Metoda glavnih osi (angl. principal component analysis, PCA) spada v multivariatno analizo. PCA je statistična tehnika, ki analizira medsebojno soodvisnost spremenljivk z namenom, da se število spremenljivk zmanjša. Pri tem osnovni nabor spremenljivk preslikamo v množico novih spremenljivk, ki jih imenujemo glavne osi (Košmelj, 2007). PCA je linearna transformacija (rotacija) *m*-dimenzionalnega merskega prostora v *m*-dimenzionalni vektorski prostor. Prva koordinata zasukanega koordinatnega sistema (glavna os ali os 1) je tista smer, v kateri se celotna varianca sistema vseh obravnavanih podatkov zmanjša. Naslednja glavna os je pravokotna na prejšnjo in je zopet določena s tem, da opiše kar največ preostale variance. PCA je tako projekcija podatkov iz *m*-dimenzionalnega prostora v dvo-dimenzionalni prostor prvih dveh glavnih osi.

Pri tej tehniki torej iščemo linearno kombinacijo m parametrov/spremenljivk z namenom, da se maksimira razdaljo med točkami ali vzorci v m -dimenzionalnem prostoru. PCA nima podatkov, kako naj sestavi skupine. Podatke namreč razvrsti v skupine po tendenci, s čim manjšo izgubo informacij (Pillonel in sod., 2003).

PCA je ena pogostejše uporabljenih multivariatnih metod predvsem v novejših študijah, ki vključujejo določanje HOS v siru (Lawlor in sod., 2002; Pillonel in sod., 2003; Berezińska in sod., 2007; Poveda in sod., 2008; Van Leuven, 2008).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 VPELJAVA IN OPTIMIZACIJA METODE

Vrsta vlakna

Vse vrste SPME vlaken smo testirali na vzorcu istega hlebca Nanoškega sira, ki je zorel 2 meseca. Isto vrsto vlakna smo testirali v treh ponovitvah. Ekstrakcija je potekala 24 h pri 25 °C. Od testiranih vrst modrega (DVB-PDMS), belega (PA), rdečega (PDMS), sivega (DVB-CAR-PDMS) in črnega (CAR-PDMS) SPME vlakna sta se glede na število ekstrahiranih HOS kot najboljši vlakni za ekstrakcijo izkazali sivo vlakno (DVB-CAR-PDMS) z 41 identificiranimi HOS ter črno vlakno (CAR-PDMS) s 37 identificiranimi HOS (Priloga B). Rezultati testiranj ostalih SPME vlaken so prikazani v prilogi A.

Opazili smo, da se na črno vlakno (CAR-PDMS) bolje adsorbirajo komponente z nižjim vreliščem kot so 2-butanon, 2-butanol, 3-metil 1-butanol, etil ester butanojske kisline, na sivo vlakno (DVB-CAR-PDMS) pa HOS z višjim vreliščem, ki smo jih identificirali v drugem delu kromatograma (npr. oktanojska kislina, dekanoska kislina, δ -dekalakton) (Priloga B).

Nekatere HOS smo zaznali le s črnim vlaknom (CAR-PDMS) (npr. 2,3-butandione, etil ester očetne kisline), nekatere HOS pa le s sivim vlaknom (DVB-CAR-PDMS) (npr. δ -oktalakton, 2-undekanon) (Priloga B).

Zaradi zgoraj navedenih ugotovitev smo ves čas izvajanja poskusa iz sklopa 2, kjer smo spremljali spremembe v aromatskem profilu Nanoškega sira med zorenjem, uporabljali obe vlakni, črno vlakno (CAR-PDMS) in sivo vlakno (DVB-CAR-PDMS), saj smo želeli identificirati čim večje število HOS. Poleg tega nas je zanimalo tudi spreminjanje vsebnosti posameznih HOS med zorenjem. Po končanih meritvah smo za vsako HOS naredili t-test z rezultati sivega (DVB-CAR-PDMS) in črnega vlakna (CAR-PDMS) (Priloga C). Glede na zadnji del kromatograma, kjer smo identificirali bolj kompleksne HOS, se je izkazalo kot boljše sivo vlakno (DVB-CAR-PDMS). Sicer pa smo več komponent bolje zaznali s črnim vlaknom (CAR-PDMS).

Terpene α -pinen, limonen in p-cimen smo uspeli potrditi tudi s standardnimi razstopinami. Za limonen in p-cimen se je kot boljše izkazalo sivo vlakno (DVB-CAR-PDMS).

Temperatura in čas ekstrakcije

Učinkovitost SPME ekstrakcije je odvisna od temperature in časa. Zato smo ta dva parametra optimizirali (Priloga D). Temperatura močno vpliva na stabilnost preiskovanega vzorca. Z uporabo nižjih temperatur ohranimo stabilnost vzorca brez

sprememb matriksa, medtem ko višje temperature lahko povzročijo proces razgradnje. Po drugi strani pa povišanje temperature za 10 °C pospeši hitrost reakcije za 2-4 krat, zato smo poiskali kompromis med temperaturo in časom ekstrakcije. Najprej smo s sivim (DVB-CAR-PDMS) in črnim (CAR-PDMS) vlaknom testirali 45-minutno ekstrakcijo pri 37 °C ter z obema vlaknoma pri teh pogojih identificirali le 16 komponent. V nadaljevanju se je za najučinkovitejšo kombinacijo izkazalo, da smo vzorce izpostavili 24-urni ekstrakciji pri temperaturi 25 °C ± 1°C, kjer se matriks (sir) ni spreminjal (npr. topljenje). Pri optimizaciji smo upoštevali tudi dejstvo, da se posamezna komponenta v plinski fazi hitreje adsorbira s površine vlakna kot iz matriksa (Abilliera in sod., 2010b). Zato smo uporabili daljše čase za vzpostavitev ravnotežja. Podobno metodo so v svoji študiji uporabili tudi Frank in sod. (2004).

Velikost in oblika vzorčevalne posode

Glede na uporabo 100 ml plinotesne bučke in 20 ml komercialne viala ni bilo razlik v kromatogramih. V naslednjih analizah smo uporabljali 20 ml viala, ker smo jih lažje čistili.

Na podlagi omenjenih rezultatov smo izbrali metode, ki smo jih navedli v predhodnem poglavju Metode.

Ponovljivost

Kot kriterij za izražanje ponovljivosti meritev vsebnosti HOS v siru smo uporabili relativni standardni odklon. Ponovljivost meritev smo testirali v poletni sezoni na 63. dan zorenja Nanoškega sira, ko smo identificirali 51 HOS. Relativni standardni odklon meritev znotraj poletne sezone v obeh serijah na vseh šestih hlebcih se je za HOS gibal od 0,13 do 1,70 (Preglednica 3). Poudariti moramo, da sta imeli le dve HOS relativni standardni odklon višji od 1, in sicer etilbenzen ter p-krezol. Povprečni standardni odklon za vse HOS je bil 0,41. V 4 g vzorca sira je bila vsebnost internega standarda (1-oktanol) $6,85 \cdot 10^{-3}$ mg, povprečna površina kromatografskih vrhov 1-oktanola pa 205126699,93.

Ponovljivost metode ekstrakcije (vključno z ekstrakcijo, injiciranjem, separacijo, detekcijo) za HOS je bila testirana z analizo istega vzorca Nanoškega sira, ki smo ga trikrat pomerili z istim identifikacijskim vlaknom. Pri analizi na CAR-PDMS vlaknu je bila ponovljivost od 0,02 do 1,03, na DVB-CAR-PDMS vlaknu pa od 0,02 do 1,05. Povprečni standardni odklon za vse HOS je bil na CAR-PDMS vlaknu 0,17, na DVB-CAR-PDMS vlaknu pa 0,35 (izračunano na podlagi podatkov iz priloge B). Za ostale meritve je ponovljivost nakazana v prilogah.

Preglednica 3: Vsebnost in koncentracija hlapnih organskih spojin (HOS) v Nanoškem siru

Table 3: The content and concentration of volatile organic compounds

HOS	Vsebnost ¹	s ²	RSD ³	Koncentracija ⁴ (mg/kg)
Pinan	$4,70 \cdot 10^6$	$6,03 \cdot 10^5$	0,13	0,0393
Benzaldehid	$4,50 \cdot 10^6$	$6,67 \cdot 10^5$	0,15	0,0375
Dekanal	$7,97 \cdot 10^5$	$1,28 \cdot 10^5$	0,16	0,0066
Pentanojska kislina	$1,95 \cdot 10^6$	$3,16 \cdot 10^5$	0,16	0,0163
2-heptanon	$3,77 \cdot 10^8$	$6,97 \cdot 10^7$	0,18	3,1450
Heksanojska kislina	$5,19 \cdot 10^7$	$9,78 \cdot 10^6$	0,19	0,4332
Etil ester heksanojske kisline	$6,31 \cdot 10^6$	$1,26 \cdot 10^6$	0,20	0,0527
2-butanon	$5,27 \cdot 10^5$	$1,12 \cdot 10^5$	0,21	0,0044
2-etil 1-heksanol	$6,60 \cdot 10^5$	$1,41 \cdot 10^5$	0,21	0,0055
δ-dekalakton	$2,79 \cdot 10^6$	$6,19 \cdot 10^5$	0,22	0,0233
Oktanal	$7,92 \cdot 10^5$	$1,79 \cdot 10^5$	0,23	0,0066
Undekan	$3,68 \cdot 10^5$	$8,53 \cdot 10^4$	0,23	0,0031
Ocetna kislina	$5,90 \cdot 10^6$	$1,37 \cdot 10^6$	0,23	0,0493
Dekanojska kislina	$7,92 \cdot 10^6$	$1,91 \cdot 10^6$	0,24	0,0661
β-kariofilen	$1,36 \cdot 10^6$	$3,45 \cdot 10^5$	0,25	0,0113
1-heksanol	$2,44 \cdot 10^6$	$6,31 \cdot 10^5$	0,26	0,0203
δ-oktalakton	$1,23 \cdot 10^6$	$3,27 \cdot 10^5$	0,27	0,0102
2-heptanol	$3,48 \cdot 10^7$	$9,52 \cdot 10^6$	0,27	0,2907
Heptanojska kislina	$4,38 \cdot 10^5$	$1,25 \cdot 10^5$	0,29	0,0037
Oktanojska kislina	$8,95 \cdot 10^6$	$2,76 \cdot 10^6$	0,31	0,0747
p-cimen	$1,09 \cdot 10^6$	$3,38 \cdot 10^5$	0,31	0,0091
Limonen	$9,29 \cdot 10^5$	$3,02 \cdot 10^5$	0,32	0,0078
Etil ester oktanojske kisline	$9,55 \cdot 10^5$	$3,20 \cdot 10^5$	0,33	0,0080
2-pentanol	$2,57 \cdot 10^7$	$9,16 \cdot 10^6$	0,36	0,2149
2-pentanon	$1,39 \cdot 10^8$	$5,01 \cdot 10^7$	0,36	1,1619
2-metil butanojska kislina	$2,42 \cdot 10^6$	$8,99 \cdot 10^5$	0,37	0,0202
Butanojska kislina	$1,50 \cdot 10^8$	$5,86 \cdot 10^7$	0,39	1,2504
2,3 butandiol	$1,04 \cdot 10^7$	$4,27 \cdot 10^6$	0,41	0,0869
1-butanol	$4,91 \cdot 10^6$	$2,01 \cdot 10^6$	0,41	0,0410
Sabinen	$1,05 \cdot 10^6$	$4,39 \cdot 10^5$	0,42	0,0088
Dimetil sulfon	$4,91 \cdot 10^5$	$2,15 \cdot 10^5$	0,44	0,0041
Etil ester butanojske kisline	$7,01 \cdot 10^7$	$3,10 \cdot 10^7$	0,44	0,5853
Toluen	$1,04 \cdot 10^7$	$4,60 \cdot 10^6$	0,44	0,0866
3-metil butanojska kislina	$6,25 \cdot 10^6$	$2,95 \cdot 10^6$	0,47	0,0522
Heptanal	$3,08 \cdot 10^6$	$1,47 \cdot 10^6$	0,48	0,0257
3-metil butanal	$1,57 \cdot 10^6$	$7,54 \cdot 10^5$	0,48	0,0131
3-metil 1-butanol	$1,57 \cdot 10^6$	$7,54 \cdot 10^5$	0,48	0,0131
α-pinen	$6,59 \cdot 10^6$	$3,17 \cdot 10^6$	0,48	0,0550
Undekanon	$3,79 \cdot 10^6$	$1,84 \cdot 10^6$	0,49	0,0317
2-nonanol	$8,53 \cdot 10^5$	$4,49 \cdot 10^5$	0,53	0,0071
2-butanol	$9,48 \cdot 10^5$	$5,15 \cdot 10^5$	0,54	0,0079
8-nonen-2-on	$5,60 \cdot 10^5$	$3,14 \cdot 10^5$	0,56	0,0047
2-hidroksi 3-pentanon	$1,45 \cdot 10^6$	$8,35 \cdot 10^5$	0,57	0,0121
Diacetil	$4,74 \cdot 10^6$	$3,10 \cdot 10^6$	0,65	0,0396
2-oktanon	$8,52 \cdot 10^6$	$5,75 \cdot 10^6$	0,68	0,0711
Acetoin	$6,28 \cdot 10^6$	$4,60 \cdot 10^6$	0,73	0,0524
Benzeneacetaldehid	$3,61 \cdot 10^5$	$3,11 \cdot 10^5$	0,86	0,0030
Etil ester ocetne kisline	$1,84 \cdot 10^6$	$1,63 \cdot 10^6$	0,88	0,0154
p-kresol	$9,18 \cdot 10^5$	$1,05 \cdot 10^6$	1,14	0,0077
Etilbenzen	$9,25 \cdot 10^5$	$1,57 \cdot 10^6$	1,70	0,0077

¹povprečna površina kromatografskih vrhov; ²standardni odklon; ³relativni standardni odklon;

⁴koncentracija posamezne HOS preračunana glede na površino in povprečno koncentracijo internega standarda (1-oktanol)

4.2 SKLOP 1: KRMA IN MLEKO

4.2.1 Sestava in struktura krmnih obrokov ter osnovni parametri kemijske kakovosti mleka

Od 27 sodelujočih rejcev je vprašalnik za zimski obrok izpolnilo 16 rejcev, za poletni pa 10 rejcev. Podatki o krmni sestavi v posameznih sezonah so v Preglednici 4 (zimska sezona) in v Preglednici 5 (poletna sezona). S pomočjo vprašalnika, ki so ga izpolnili rejci, vključeni v prirejo mleka za Nanoški sir, smo ugotovili, da je bila osnova krmnega obroka krav molznic v zimskem času travna silaža, medtem ko je bila v poletnem času sveža trava (paša). V zimski sezoni je poleg osnovne krme (travne silaže) krmni obrok sestavljajo še seno, otava, koruzna silaža, specialna krmna mešanica Nanos 1 in Nanos 2 (z večjo vsebnostjo beljakovin), močna krmila (koruza, mešanica koruze in ječmena) ter drugi dodatki. Med druge dodatke smo uvrstili Lacto ProTect (rudninska krmna mešanica), Grovit (vitaminsko-mineralni dodatek), Rumisal (mineralno vitaminska mešanica). Količine posameznega krmila in število rejcev, ki je vključilo navedeno krmilo v zimski krmni obrok smo navedli v Preglednici 4. V poletni sezoni pa je poleg paše (sveže trave) krmni obrok, sestavljalo še seno, specialna krmna mešanica Nanos 1 in Nanos 2, močna krmila (koruza, mešanica koruze in ječmena) ter vitaminski dodatek. Tudi za poletni obrok smo navedli količine posameznega krmila in število rejcev, ki je vključilo navedeno krmilo v krmni obrok (Preglednica 5). V preglednicah 4 in 5 so navedene povprečne vrednosti, ki smo jih dobili na podlagi ankete.

Vzorci osnovne krme (travne silaže oz. sveže trave) in mleka smo v obeh sezonah odvzeli pri istih šestih rejcih, vzorčenje v posamezni sezoni pa je bilo pri vseh šestih rejcih izvedeno v istem dnevu. V vzorcih travne silaže oz. sveže trave smo določali vsebnost surovih maščob, beljakovin, vlaknin, nekaterih mineralov (Preglednica 6) ter HOS (Preglednica 8), pri vzorcih mleka pa smo določali osnovne parametre kemijske kakovosti (Preglednica 7) ter HOS (Preglednica 8).

S pomočjo rezultatov analiz in vprašalnika o sestavi krmnega obroka smo lahko objektivno določili razlike v kakovosti zaužitih obrokov krav molznic v zimskem in poletnem času. Iz rezultatov kemijske kakovosti mleka po sezonah (Preglednica 7) vidimo, da ni bistvenih razlik med povprečnimi vrednostmi parametrov kemijske kakovosti mleka med sezonama.

Preglednica 4: Sestava krmnega obroka v zimski sezoni (n=16)

Table 4: The average composition of feed during the winter season

Krma	Količina (kg)
Seno (kg/žival/dan)	7 (n=15)
Otava (kg/žival/dan)	5,42 (n=8)
Travna silaža (kg/žival/dan)	18,62 (n=16)
Koruzna silaža (kg/žival/dan)	10 (n=1)
KM Nanos 1 (kg/žival/dan)	2,36 (n=7)
KM Nanos 2 (kg/žival/dan)	2,62 (n=4)
Močna krmila (kg/žival/dan)	koruza: 2 kg (n=1); mešanica koruze in ječmena: 1,4 kg (n=5)
Drugi dodatki: Laktoprotekt/Grovit/Rumisal	po potrebi

n – število rejcev, KM – krmna mešanica

Preglednica 5: Sestava krmnega obroka v poletni sezoni (n=10)

Table 5: Composition of feed during the summer season

Krma	Količina
Paša (ur/dan)	15,6 (n=10)
Seno (kg/žival/dan)	7,31 (n=7)
KM Nanos 1 (kg/žival/dan)	1,59 (n=8)
KM Nanos 2 (kg/žival/dan)	1 (n=2)
Močna krmila (kg/žival/dan)	Mešanica koruze in ječmena 3 (n=1); koruza (n=1)
Drugi dodatki: vitaminski dodatek	5 dkg (n=1)

n – število rejcev, KM – krmna mešanica

Preglednica 6: Povprečne vrednosti vsebnosti hranilnih snovi v travni silaži iz zimske sezone in sveže trave iz poletne sezone

Table 6: The average content of nutrients in grass silage of the winter season and fresh grass in the summer season

Hranilne snovi	Travna silaža	Sveža trava
Suha snov (%)	50,43	23,50
Surove beljakovine (%)	6,09	2,28
Surove maščobe (%)	1,28	0,42
Surove vlaknine (%)	14,94	9,27
Pepel (%)	4,20	1,48
Na (g/kg)	0,34	0,30
Ca (g/kg)	12,53	1,83
K (g/kg)	10,05	3,69
Mg (g/kg)	1,87	0,73
Mn (mg/kg)	60,38	18,10
Cu (mg/kg)	4,41	2,01
Zn (mg/kg)	17,01	6,79
Fe (mg/kg)	491,30	50,27
P (g/kg)	1,26	0,50

Preglednica 7: Povprečne vrednosti osnovnih parametrov kemijske kakovosti vzorcev mleka (n=6) po sezonah

Table 7: The average value of basic parameters of chemical quality of the milk samples (n=6) by seasons

Parametri	Zimska sezona	Poletna sezona
Beljakovine (g/100g)	3,16	3,12
Maščoba (g/100g)	3,93	3,83
Laktoza (g/100g)	4,53	4,52
ŠSC ¹ (x1000/ml)	340	259
SŠMO ² (x1000 KE/ml)	11	13

¹ število somatskih celic; ² skupno število mikroorganizmov

4.2.2 Hlapne organske spojine v travni silaži, sveži travi in mleku iz poletne in zimske sezone

Osnovno krmo (travno silažo iz zimske sezone in svežo travo iz poletne sezone) ter mleko smo vzorčili pri 6 rejcih (R1-R6) na območju, namenjenem proizvodnji mleka za predelavo v Nanoški sir. S pomočjo GC-MS analize smo določili aromatski profil in povprečne vrednosti nekaterih identificiranih HOS v vseh 6 vzorcih osnovne krme in mleka iz obeh sezon (Preglednica 8). V vseh vzorcih travne silaže in sveže trave smo identificirali kar 146 različnih HOS, v vzorcih mleka iz obeh sezon pa 54, vendar vse HOS niso bile prisotne v vseh vzorcih travne silaže, sveže trave ter mleka. V preglednicah (Priloga E, Priloga F) so tudi podane povprečne vrednosti HOS vseh

vzorcev, ki smo jih pridobili od šestih rejcev. Iz rezultatov je razvidno, da so se vzorci travne silaže in sveže trave razlikovali tako po prisotnosti kot tudi po vsebnosti HOS. Enako velja tudi za vzorce mleka glede na različno sezono.

V Preglednici 8 so prikazane HOS, ki smo jih identificirali tako v osnovni krmi (travni silaži, sveži travi) kot tudi mleku, prisotne pa so bile tudi v Nanoškem siru. Predstavili smo nekatere HOS v osnovni krmi in mleku, kjer so se vrednosti razlikovale po sezoni (zimsko, poletno). Razlike med sezonama v vzorcih osnovne krme in mleka smo dobili s Wilcoxon-ovim testom za parne vzorce (Preglednica 8). HOS iz osnovne krme in mleka, ki smo jih identificirali tudi v siru, so podrobneje predstavljene v naslednjih poglavjih (5.2.2 Sklop 2: Hlapne organske spojine v Nanoškem siru). Preglednice z vsemi identificiranimi HOS v krmi in mleku ter razlike med sezonama so navedene v prilogah (Priloga E, Priloga F).

Preglednica 8: Nekatere hlapne organske spojine (HOS) (s povprečno površino kromatografskih vrhov), identificirane v krmi in mleku, s statističnimi parametri

Table 8: Some volatile organic compounds (average arbitrary area units) identified in feed and milk with statistical parameters

n ¹ HOS	HOS po funkcionalnih skupinah	Osnovna krma			Mleko		
		Povprečje ⁴ v sezoni		p ⁵	Povprečje ⁴ v sezoni		P
	Maščobne kisline	Poletna ²	Zimska ³		Poletna	Zimska	
V1	Ocetna kislina	5,49 · 10 ⁶	1,90 · 10 ⁸	*	/	/	/
V2	Butanojska kislina	/	2,08 · 10 ⁹	*	1,44 · 10 ⁷	1,22 · 10 ⁷	ns
V3	3-metil butanojska kislina	/	6,53 · 10 ⁷	*	/	/	/
V4	2-metil butanojska kislina	/	4,93 · 10 ⁷	*	/	/	/
V5	Pentanojska kislina	/	1,56 · 10 ⁸	ns	/	/	/
V6	Heksanojska kislina	/	1,47 · 10 ⁸	*	7,86 · 10 ⁵	9,36 · 10 ⁵	ns
Alkoholi							
V10	2-butanol	/	/	/	/	1,82 · 10 ⁶	ns
V11	1-butanol	/	2,67 · 10 ⁷	ns	/	4,52 · 10 ⁵	ns
V13	3-metil 1-butanol	3,68 · 10 ⁶	5,47 · 10 ⁷	*	1,43 · 10 ⁶	7,45 · 10 ⁴	ns
V14	2,3-butanediol	/	1,84 · 10 ⁶	ns	/	/	/
V18	2-etil 1-heksanol	/	/	/	4,69 · 10 ⁵	5,43 · 10 ⁵	ns
Aldehidi							
V20	3-metil butanal	/	6,12 · 10 ⁷	*	3,38 · 10 ⁶	2,03 · 10 ⁵	ns
V21	Heksanal	2,21 · 10 ⁶	/	*	5,94 · 10 ⁵	3,77 · 10 ⁶	*
V22	Heptanal	/	7,99 · 10 ⁵	ns	2,43 · 10 ⁵	7,05 · 10 ⁵	*
V23	Oktanal	/	2,21 · 10 ⁷	*	1,37 · 10 ⁶	1,71 · 10 ⁶	ns
V24	Benzaldehid	/	3,76 · 10 ⁸	*	/	/	/
V25	Nonanal	/	1,37 · 10 ⁷	ns	2,35 · 10 ⁵	3,88 · 10 ⁵	ns
V26	Benzenacetaldehid	/	3,26 · 10 ⁷	*	/	/	/
Estri							
V29	Etil ester očetne kisline	2,81 · 10 ⁸	1,49 · 10 ⁸	ns	2,88 · 10 ⁶	/	*
V30	Etil ester butanojske kisline	/	7,53 · 10 ⁸	*	9,68 · 10 ⁶	1,61 · 10 ⁷	ns
V32	Etil ester heksanojske kisline	/	6,74 · 10 ⁷	*	/	3,16 · 10 ⁶	*
V33	Metil ester oktanojske kisline	/	6,84 · 10 ⁶	ns	/	/	/
V34	Etil ester oktanojske kisline	/	/	/	4,84 · 10 ⁵	8,16 · 10 ⁵	ns
V35	Etil ester dekanjske kisline	/	1,28 · 10 ⁷	ns	/	/	/
Ketoni							
V36	Diacetil	/	/	/	2,04 · 10 ⁵	/	ns
V37	2-butanon	1,02 · 10 ⁶	5,98 · 10 ⁶	ns	5,53 · 10 ⁶	1,76 · 10 ⁸	*
V38	2-pentanon	2,54 · 10 ⁶	1,18 · 10 ⁶	ns	3,01 · 10 ⁵	1,97 · 10 ⁶	*
V40	Acetoin	7,99 · 10 ⁶	1,08 · 10 ⁷	ns	7,88 · 10 ⁵	2,69 · 10 ⁶	ns
V45	6-metil 5-hepten-2-on	8,70 · 10 ⁵	1,63 · 10 ⁷	*	/	/	/
V46	2-nonanon	/	/	/	2,42 · 10 ⁵	1,10 · 10 ⁵	ns
Terpeni							
V49	Pinan	1,51 · 10 ⁸	4,85 · 10 ⁶	*	3,50 · 10 ⁶	3,56 · 10 ⁵	*
V50	α-pinen	1,50 · 10 ⁸	2,21 · 10 ⁷	*	1,03 · 10 ⁷	1,75 · 10 ⁶	*
V51	Sabinen	3,18 · 10 ⁸	2,61 · 10 ⁷	*	6,74 · 10 ⁵	3,89 · 10 ⁵	ns
V52	Limonen	1,31 · 10 ⁸	2,21 · 10 ⁷	*	2,62 · 10 ⁶	1,65 · 10 ⁶	ns
V53	p-cimen	1,60 · 10 ⁸	2,07 · 10 ⁷	*	1,81 · 10 ⁶	3,06 · 10 ⁵	*
V54	β-kariofilen	3,59 · 10 ⁸	3,32 · 10 ⁸	ns	8,44 · 10 ⁵	2,72 · 10 ⁵	*
Druge HOS							
V55	2-okten	2,20 · 10 ⁷	/	/	6,50 · 10 ⁵	/	*
V56	Toluen	5,04 · 10 ⁶	1,28 · 10 ⁶	*	8,77 · 10 ⁶	1,62 · 10 ⁶	*
V59	Undekan	/	/	/	6,98 · 10 ⁵	5,36 · 10 ⁴	*

¹identifikacijske številke HOS v vzorcih krme in mleka, ki smo jih identificirali tudi v Nanoškem siru (Preglednica 11); ²sveža trava; ³travna silaža; ⁴povprečna površina kromatografskih vrhov posamezne HOS v vseh 6 vzorcih in 3 ponovitvah; ⁵p-vrednost: ns – ni statistično značilno p>0,05; * 0,01; / – HOS ni bila identificirana

Nekatere HOS (npr. 3-metil 1-butanol, 3-metil butanal, heksanal) so v krmi ali mleku tako kvalitativno kot kvantitativno zaznamovale poletno oziroma zimsko sezono. Glede na rezultate iz Preglednice 8 bi lahko trdili, da nekatere HOS (npr. butanojska kislina), ki smo jih identificirali v mleku in krmi, nimajo samo izvora v krmi, ampak imajo lahko tudi druge vire (sinteza v mlečni žlezi) (Becker in Kumar, 1965). Njihova koncentracija v krmi namreč ni imela neposredne povezave s koncentracijo iste HOS v mleku. Na primer v krmi je bila butanojska kislina prisotna samo v zimski sezoni, v mleku pa je bila prisotna v obeh sezonah. Poleg tega se vsebnosti butanojske kisline v vzorcih mleka niso statistično razlikovale glede na sezono.

Študij, ki dokazujejo prehod terpenov iz krme v mleko, je veliko (Kalač, 2011), precej manj pa je tistih, ki bi obravnavale prehod tudi drugih HOS, kot so alkoholi, MK, estri, aldehidi in ketoni. Tako so na primer Carpino in sod. (2004) v svoji študiji ugotovili, da naj bi se iz krme (paše), poleg treh terpenov, v mleko preneslo tudi 5 drugih HOS, in sicer 2 estra (geranil acetat, metil jasmonat), 2 aldehida (2,4-oktadienal, dodekanal) ter ena S-snov (metionol). V našem primeru nismo v preiskovanih vzorcih (travna silaža, sveža trava, mleko) identificirali nobene od naštetih HOS.

Etil ester heksanojske kisline smo identificirali le v vzorcih travne silaže in mleka iz zimske sezone, kar namiguje na njegov morebiten prehod iz osnovne krme travne silaže v mleko.

Zanimivo je, da je v krmi oziroma mleku etil ester ocetne kisline (Preglednica 8, V29) zaznamoval poletno sezono. Prisoten je bil sicer v obeh osnovnih krmah, vendar smo ga določili več v sveži travi. Poleg tega smo ga identificirali le v vzorcih mleka iz poletne sezone. Keton 2-butanon (Preglednica 8, V37) je s svojo vsebnostjo zaznamoval zimsko sezono. V zimski sezoni, ko je bila v krmnem obroku osnovna krma travna silaža, so bile v mleku koncentracije 2-butanona večje (do 100 x) v primerjavi z mlekom iz poletne sezone. Tudi Mounchili in sod. (2005) so v svoji študiji opazili, da je travna silaža v krmnem obroku krav prispevala k večji vsebnosti 2-butanona v mleku. Tudi acetoin (Preglednica 8, V 40) je dosegel višje vrednosti v mleku iz zimske sezone. Na njegovo vsebnost naj bi vplival vnos etanola s krmo (travno silažo) (Kalač, 2011).

Po navedbah nekaterih drugih študij naj bi med aldehidi v travni silaži prevladovala predvsem heksanal in pentanal (Kalač, 2011), mi pa smo heksanal (Preglednica 8, V 21) identificirali le v sveži travi. Pentanal (Priloga E) smo identificirali samo v travni silaži, v mleku pa je bil prisoten v obeh sezonah.

Izpostavili bi predvsem toluen, ki je bil prisoten v obeh sezonah v osnovni krmi in mleku, vendar je dosegel večje vrednosti v osnovni krmi in mleku iz poletne sezone. Vsi terpeni, ki smo jih identificirali v Nanoškem siru (rezultati so v nadaljevanju, poglavje 4.3.1 Identifikacija in analiza hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru), so

bili prisotni tako v osnovnih krmah kot tudi v mleku. Poleg tega so terpeni pinan, α -pinen in p-cimen dosegli večje vrednosti v krmi in mleku iz poletne sezone.

Znano je, da krma krav na različne načine vpliva na senzorične lastnosti sira (Carpino in sod., 2004). Nekatere komponente, kot so karoten in terpeni, lahko prehajajo direktno iz krme v mleko (Coulon in sod., 2004; Martin in sod., 2005), medtem ko se nekatere komponente oziroma snovi (npr. butanojska kislina) tvorijo med spravilom in konzerviranjem krme ter z nadaljno fermentacijo (fermentacijo silaže) (Kalač, 2011). V našem primeru ne izključujemo dejstva, da je lahko sezona zaradi različne osnovne krme tudi posredno vplivala na oblikovanje končne arome Nanoškega sira. Silaža (osnovna krma v zimski sezoni) je namreč fermentirana krma in vsebuje MKB ter tudi že delno razgrajene hranilne snovi. V travni silaži je npr. veliko vodotopnih ogljikovodikov, ki veljajo za reaktante med mlečnokislinsko fermentacijo (Kalač, 2011). Znano je tudi, da krma vpliva na metabolizem v vampu, kjer zaradi aktivnosti mikroorganizmov nastajajo spojine, ki lahko prispevajo h končni aromi mleka (Toso in sod., 2002). Ugotovili so že večje koncentracije določenih HOS v sirih, ki so bili iz mleka krav, krmljenih s travno silažo (Kalač, 2011). Tudi v našem primeru je tako lahko krma vplivala na mikrobioto vampa in tudi na nastanek spojin mleka. V poletni krmi (sveži travi) pa smo identificirali večjo vsebnost terpenov, za katere je ugotovljeno, da lahko spremenijo dinamiko mikroorganizmov, in sicer v vampu, v samem mleku ter tudi med izdelavo sira (Coulon in sod., 2004).

Poleg tega Coulon in sod. (2004) navajajo, da je del posrednega vpliva prehrane lahko mikrobiološkega izvora. In sicer so nekatere glede na prehrano ugotovljene razlike v aromi sira iz surovega mleka izginile po pasterizaciji mleka. Mikrobiološke analize vzorcev krme, mleka in sira bi tako lahko bile dodatna informacija k razumevanju vpliva sezone oz. različne krme (sveža trava, travna silaža) na HOS v mleku in siru. V primeru Nanoškega sira je mleko za sir toplotno obdelano s postopkom termizacije, pri čemer se delno uničijo v mleku prisotni encimi in mikroorganizmi, ki bi lahko prispevali h končni aromi sira oziroma nastanku določenih aromatičnih HOS (Delgado in sod., 2011).

Ostale HOS, ki smo jih še identificirali v krmi in/ali mleku ter možne povezave s HOS v siru, so navedene v poglavju 4.3. Sklop 2: Hlapne organske spojine v Nanoškem siru.

4.2.2.1 Primerjava krme (sveže trave) in mleka s tipičnega »nanoškega« in drugega območja

Mleko in krmo smo v poletni sezoni vzorčili tako na tipičnem območju (Črnovrška planota), na katerem potekata prireja mleka za predelavo v Nanoški sir (»nanoško« območje), kot tudi izven tega tipičnega območja (»drugo« območje) in sicer v Batah.

Krmo smo vzorčili v pašni sezoni, ko je bila osnova obroka sveža trava. Glede na znana dejstva, da so terpeni lahko markerji geografskega porekla, smo se pri analizi HOS v vzorcih krme in mleka osredotočili predvsem na slednje (Preglednica 9, Preglednica 10).

Preglednica 9: Terpeni v mleku iz poletne sezone z območja za Nanoški sir (Nanoško) ter izven tega območja (Drugo)

Table 9: Terpenes in the milk from area of Nanos cheese and from other area

Terpeni	Nanoško, R1 ¹		Nanoško, R2		Nanoško, R3		Nanoško, R4	
	Povprečje	RSD ²	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD
Pinan	1,10·10 ⁶	a 0,34	3,21·10 ⁶	b 0,21	6,75·10 ⁶	c 0,07	3,30·10 ⁶	b 0,11
α-pinen	4,83·10 ⁶	a 0,31	7,32·10 ⁶	ab 0,18	1,79·10 ⁷	c 0,01	1,18·10 ⁷	b 0,13
Kampen	1,25·10 ⁶	a 0,48	1,52·10 ⁶	ab 0,00	1,32·10 ⁶	a 1,30	1,16·10 ⁶	a 0,12
Sabinen	/	a	1,17·10 ⁶	bc 0,25	1,52·10 ⁶	c 0,47	5,62·10 ⁵	ab 0,25
β-pinen	5,35·10 ⁶	ab 0,36	9,05·10 ⁶	a 0,19	7,94·10 ⁶	a 0,08	7,39·10 ⁶	ab 0,10
Limonen	3,49·10 ⁶	a 0,15	3,21·10 ⁶	a 0,03	3,07·10 ⁶	ac 0,03	1,80·10 ⁶	bc 0,16
p-cimen	1,83·10 ⁶	ab 0,18	2,30·10 ⁶	a 0,09	2,41·10 ⁶	a 0,09	1,53·10 ⁶	b 0,07
Eukaliptol	/	a	4,39·10 ⁵	b 0,11	/	a	/	a
β-kariofilen	1,06·10 ⁶	e 0,21	9,87·10 ⁵	de 0,11	1,57·10 ⁶	f 0,10	5,15·10 ⁵	bc 0,37
Terpeni	Nanoško, R5		Nanoško, R6		Drugo, B			
	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD		
Pinan	5,82·10 ⁶	c 0,22	8,23·10 ⁵	a 0,02	1,98·10 ⁶	ab 0,17		
α-pinen	1,82·10 ⁷	c 0,21	1,67·10 ⁶	a 0,06	1,63·10 ⁶	a 0,19		
Kampen	/	a	/	a	/	a		
Sabinen	7,92·10 ⁵	bc 0,34	/	a	/	a		
β-pinen	8,08·10 ⁶	a 0,20	3,89·10 ⁶	b 0,18	/	c		
Limonen	2,62·10 ⁶	abc 0,17	1,55·10 ⁶	b 0,12	3,63·10 ⁶	a 0,16		
p-cimen	2,01·10 ⁶	abc 0,11	7,54·10 ⁵	d 0,14	/	c		
Eukaliptol	1,04·10 ⁶	cd 0,20	/	d	/	a		
β-kariofilen	6,66·10 ⁵	cd 0,10	2,66·10 ⁵	ab 0,09	/	a		

¹R1–R6 – rejci iz območja za Nanoški sir, B rejec iz drugega območja; ²relativni standardni odklon; črke a, b, c, d označujejo statistično značilne razlike s Tukey-jevim testom; / – HOS ni bila identificirana

Preglednica 10: Terpeni v krmi (sveži travi) z območja za Nanoški sir (Nanoško) ter izven tega območja (Drugo)

Table 10: Terpenes in the feed (grass) of the protected area for Nanos cheese and from other area

Terpeni	Nanoško, R1 ¹		Nanoško, R2		Nanoško, R3		Nanoško, R4		Nanoško, R5		Nanoško, R6		Drugo, B	
	Povprečje	RSD ²	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD
Pinan	$8,36 \cdot 10^7$ ^a	0,71	$9,02 \cdot 10^7$ ^a	0,46	$1,64 \cdot 10^8$ ^a	0,15	$4,34 \cdot 10^7$ ^a	0,42	$4,96 \cdot 10^8$ ^b	0,32	$2,97 \cdot 10^7$ ^a	0,55	/ ^a	
α -pinen	$6,16 \cdot 10^7$ ^{ab}	0,42	$3,19 \cdot 10^8$ ^d	0,19	$2,14 \cdot 10^8$ ^{cd}	0,08	$7,63 \cdot 10^7$ ^{abc}	0,63	$5,59 \cdot 10^7$ ^{ab}	0,51	$1,74 \cdot 10^8$ ^{bc}	0,49	$1,27 \cdot 10^6$ ^b	0,15
Kampen	$2,03 \cdot 10^7$ ^{ab}	0,08	$1,66 \cdot 10^7$ ^{ab}	0,09	$2,93 \cdot 10^8$ ^c	0,05	$4,18 \cdot 10^7$ ^b	0,54	$1,57 \cdot 10^7$ ^{ab}	0,36	$1,30 \cdot 10^7$ ^{ab}	0,37	/ ^a	
Sabinen	$1,34 \cdot 10^8$ ^a	0,61	$2,51 \cdot 10^8$ ^a	0,43	$3,56 \cdot 10^8$ ^{ab}	0,11	$5,89 \cdot 10^7$ ^a	0,69	$7,45 \cdot 10^8$ ^b	0,39	$3,66 \cdot 10^8$ ^{ab}	0,16	/ ^a	
β -pinen	$7,20 \cdot 10^7$ ^a	0,30	$3,18 \cdot 10^8$ ^{ab}	0,18	$5,81 \cdot 10^8$ ^b	0,04	$8,33 \cdot 10^7$ ^a	0,38	$1,28 \cdot 10^8$ ^a	0,47	$6,43 \cdot 10^8$ ^b	0,48	/ ^a	
α -terpinen	$3,01 \cdot 10^7$ ^a	0,68	$4,64 \cdot 10^7$ ^a	0,40	$6,84 \cdot 10^7$ ^a	0,13	$1,61 \cdot 10^7$ ^a	0,43	$2,70 \cdot 10^8$ ^b	0,40	$1,42 \cdot 10^7$ ^a	0,52	/ ^a	
Limonen	$3,58 \cdot 10^7$ ^a	0,40	$3,80 \cdot 10^8$ ^b	0,35	$1,32 \cdot 10^8$ ^a	0,05	$3,46 \cdot 10^7$ ^a	0,66	$8,13 \cdot 10^7$ ^a	0,45	$1,21 \cdot 10^8$ ^a	0,58	$8,60 \cdot 10^6$ ^a	0,15
p-cimen	$9,53 \cdot 10^7$ ^{abc}	0,40	$1,85 \cdot 10^8$ ^c	0,16	$1,49 \cdot 10^8$ ^{bc}	0,11	$6,13 \cdot 10^7$ ^{ab}	0,45	$4,16 \cdot 10^8$ ^d	0,22	$5,48 \cdot 10^7$ ^{ab}	0,39	/ ^a	
α -felandren	/ ^a		/ ^a		/ ^a		$6,79 \cdot 10^7$ ^b	0,33	/ ^a		/ ^a		/ ^a	
Eukaliptol	$4,43 \cdot 10^7$ ^a	0,25	$2,90 \cdot 10^7$ ^a	0,28	$3,86 \cdot 10^8$ ^b	0,00	$4,70 \cdot 10^7$ ^a	0,39	$4,30 \cdot 10^8$ ^b	0,29	$4,14 \cdot 10^6$ ^a	0,22	$1,26 \cdot 10^7$ ^a	0,18
cis β -terpineol	/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a		$5,58 \cdot 10^7$ ^b	0,21	/ ^a		/ ^a	
β -linalol	/ ^a		$2,99 \cdot 10^8$ ^b	0,49	$3,85 \cdot 10^7$ ^a	0,05	$1,06 \cdot 10^7$ ^a	0,25	$1,41 \cdot 10^8$ ^{ab}	0,48	$2,96 \cdot 10^7$ ^a	0,38	/ ^a	
3-tujanon	$1,65 \cdot 10^7$ ^b	0,86	/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a	
Lavandulol	/ ^a		/ ^a		$9,25 \cdot 10^6$ ^b	0,34	/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a	
Kampor	$2,55 \cdot 10^7$ ^{bc}	0,36	$3,98 \cdot 10^6$ ^{ab}	0,22	$4,63 \cdot 10^8$ ^d	0,03	$2,17 \cdot 10^7$ ^{ab}	0,61	$4,76 \cdot 10^7$ ^c	0,29	$1,33 \cdot 10^6$ ^{ab}	0,29	/ ^a	
Borneol	$5,83 \cdot 10^6$ ^{ab}	0,23	/ ^a		$1,28 \cdot 10^8$ ^c	0,00	$2,71 \cdot 10^7$ ^b	0,80	$1,03 \cdot 10^7$ ^{ab}	0,47	$1,19 \cdot 10^6$ ^{ab}	0,41	/ ^a	
α -terpineol	/ ^a		/ ^a		$4,53 \cdot 10^7$ ^c	0,09	/ ^a		/ ^a		$9,29 \cdot 10^6$ ^b	0,30	/ ^a	
α -kubeben	$1,20 \cdot 10^7$ ^a	0,39	$2,80 \cdot 10^7$ ^a	0,22	$1,49 \cdot 10^8$ ^b	0,26	$1,98 \cdot 10^7$ ^a	0,53	$1,81 \cdot 10^8$ ^b	0,15	$2,42 \cdot 10^7$ ^a	0,51	$1,55 \cdot 10^6$ ^a	0,31
Ilangen	$9,83 \cdot 10^6$ ^a	0,29	$1,44 \cdot 10^7$ ^a	0,22	$7,75 \cdot 10^7$ ^b	0,28	$1,12 \cdot 10^7$ ^a	0,43	$7,78 \cdot 10^7$ ^b	0,24	$1,11 \cdot 10^7$ ^a	0,34	/ ^a	
Kopaen	$1,80 \cdot 10^7$ ^a	0,23	$5,81 \cdot 10^7$ ^a	0,16	$1,47 \cdot 10^8$ ^b	0,25	$2,43 \cdot 10^7$ ^a	0,46	$2,28 \cdot 10^8$ ^c	0,18	$5,35 \cdot 10^7$ ^a	0,38	$3,33 \cdot 10^6$ ^a	0,23

(se nadaljuje)

Nadaljevanje preglednice 10: Terpeni v krmi (sveži travi) z območja za Nanoški sir (Nanoško) ter izven tega območja (Drugo)

Terpeni	Nanoško, R1 ¹		Nanoško, R2		Nanoško, R3		Nanoško, R4		Nanoško, R5		Nanoško, R6		Drugo, B	
	Povprečje	RSD ²	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD
β-elemen	/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a		$1,89 \cdot 10^7$ ^b	0,08	/ ^a	
β-bourbonen	/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a		$2,29 \cdot 10^7$ ^b	0,09	/ ^a	
β-kariofilen	$4,84 \cdot 10^7$ ^a	0,41	$2,79 \cdot 10^8$ ^a	0,07	$9,63 \cdot 10^8$ ^b	0,10	$9,13 \cdot 10^7$ ^a	0,58	$4,18 \cdot 10^8$ ^a	0,88	$3,57 \cdot 10^8$ ^a	0,18	$1,10 \cdot 10^7$ ^a	0,03
γ-murolen	/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a		$9,46 \cdot 10^8$ ^b	0,13	$1,48 \cdot 10^8$ ^a	0,52	/ ^a	
α-murolen	/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a		$5,26 \cdot 10^8$ ^b	0,21	$1,08 \cdot 10^8$ ^a	0,36	/ ^a	
Kalamenen	/ ^a		/ ^a		$9,05 \cdot 10^7$ ^{cd}	0,11	$4,85 \cdot 10^7$ ^{bc}	0,50	$1,18 \cdot 10^8$ ^d	0,23	$2,87 \cdot 10^7$ ^{ab}	0,34	$1,92 \cdot 10^6$ ^{ab}	0,11
β-kadinen	/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a		/ ^a		$1,05 \cdot 10^7$ ^b	0,06
α-kalakoren	$7,66 \cdot 10^6$ ^a	0,29	$1,11 \cdot 10^7$ ^a	0,09	$4,00 \cdot 10^7$ ^b	0,24	$6,95 \cdot 10^6$ ^a	0,43	$5,10 \cdot 10^7$ ^b	0,26	$8,76 \cdot 10^6$ ^a	0,35	/ ^a	

¹R1 – R6 – rejci iz območja za Nanoški sir, B – rejec iz drugega območja;

²relativni standardni odklon; črke a, b, c, d označujejo statistično značilne razlike s Tukey-jevim testom; / – HOS ni bila identificirana

Tako v krmi – sveži travi kot tudi v mleku s tipičnega »nanoškega« območja smo identificirali več različnih terpenov v primerjavi s krmo – svežo travo in mlekom z »drugega« območja (Preglednica 9 in Preglednica 10). Poleg tega je imela večina terpenov v krmi-sveži travi večjo vsebnost s tipičnega »nanoškega« območja, med njimi tudi terpeni, ki smo jih identificirali v Nanoškem siru (α -pinen, limonen, β -kariofilen) (Preglednica 10). V vzorcih mleka pa razlike v vsebnosti terpenov (pinan, α -pinen, β -kariofilen) med obema območjema (tipično »nanoško«, drugo) niso bile tako izrazite (Preglednica 9). Sicer pa smo pri rejcih s tipičnega območja za Nanoški sir poleg terpenov, ki smo jih identificirali tudi v Nanoškem siru, tako v mleku kot tudi v krmi – sveži travi identificirali še druge terpene (kampen, β -pinen, eukaliptol). Zanimivo je, da smo β -pinen identificirali v vzorcih mleka in krme-sveže trave s tipičnega »nanoškega« območja pri vseh šestih rejcih. V vzorcih krme in mleka z drugega območja pa ga nismo identificirali. Prav tako je bil monoterpen kampen prisoten le v vzorcih sveže trave (pri vseh šestih rejcih) in mleka (pri štirih rejcih) s tipičnega »Nanoškega« območja. Eukaliptol smo identificirali tudi v krmi iz »drugega« območja. To bi lahko navezali na dejstvo, da je vsebnost terpenov odvisna od lege pašnika oziroma travnika (Cornu in sod., 2005). Omeniti moramo tudi, da smo v krmi (Preglednica 10) iz obeh območij identificirali še druge terpene, ki niso bili prisotni v vzorcih mleka. Glede na majhno vsebnost terpenov v mleku bi bilo potrebno kromatografsko metodo za identifikacijo HOS v mleku še dodelati, da bi dokazali možne razlike v vsebnosti terpenov z različnih območij.

4.3 SKLOP 2: Hlapne ORGANSKE SPOJINE V NANOŠKEM SIRU

4.3.1 Identifikacija in analiza hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru

4.3.1.1 Identifikacija hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru, njihove aromatične note ter parametri modela

V Nanoškem siru smo med zorenjem do 99. dneva identificirali 62 HOS. V model smo vključili le vrednosti HOS, identificiranih do 99. dneva zorenja, ki je potekalo pri običajni temperaturi za zorenje Nanoškega sira med 9 in 15 °C, medtem ko je v času od 99.–187. dne (6 mesecev) zorenje potekalo pri temperaturi 6 °C (kar bi doprineslo dodatno spremenljivko pri pojasnjevanju variabilnosti). Po 6 mesecih zorenja smo na novo identificirali le še butil ester ocatne kisline. Aromatične note identificiranih HOS smo zbrali v Preglednici 11. V nadaljevanju smo za posamezno HOS predstavili F-statistiko in p-vrednost vplivov iz izbranega statističnega modela (Preglednica 12). Pri čemer je F-vrednost razmerje med pojasnjenim in nepojasnjenim delom variabilnosti. Poleg tega smo zbrali tudi podatke o deležu posameznih vplivov in delež nepojasnjene variabilnosti (Preglednica 13). Ob HOS smo pripisali tudi retencijske čase HOS ter podatke, na kakšen način smo HOS identificirali. S Tukey-jevim testom smo pregledali, ali obstajajo razlike

med povprečnimi vrednostmi vsebnosti HOS na določen dan zorenja (0.–187. dan) v posamezni sezoni (poletna, zimska) (Priloga G, Priloga H). Od 62 HOS, ki smo jih identificirali v Nanoškem siru do 99 dneva zorenja, smo 32 HOS uspeli pojasniti tudi s standardnimi razstopinami (Preglednica 13). Pri vplivih smo se osredotočili le na rezultate vplivov sezone in zorenja. Ostala dva vpliva (serija, hlebec) smo vključili v model zato, da smo pojasnili čim večji vir variabilnosti. Pojasniti moramo, da vpliv hlebca vključuje tudi možno variabilnost zaradi različnih identifikacijskih vlaknen, ki smo jih uporabili pri analizah. Za določen hlebec smo namreč vedno uporabili isto identifikacijsko številko vlakna. Vpliv zorenja je bil statistično značilen pri večjem številu HOS kot vpliv sezone (Preglednica 12). Poleg tega smo v primerjavi z vplivom sezone pri vplivu zorenja ugotovili večje deleže pojasnjene variabilnosti za posamezne HOS (Preglednica 13). Navedene rezultate smo podrobneje interpretirali v nadaljevanju (poglavje 4.3.1.2 Analiza hlapnih organskih spojin Nanoškega sira, njihov trend vsebnosti med zorenjem ter vpliv sezone).

Preglednica 11: Hlapne organske spojine (HOS) v Nanoškem siru in njihove aromatične note

Table 11: Volatile organic compounds (VOCs) identified in Nanos cheese and VOCs' flavour notes

n ¹ HOS	HOS po skupinah	Aromatične note HOS
MAŠČOBNE KISLINE		
V1	Ocetna kislina	ostra, po grenkem kisu (Frank in sod., 2004)
V2	Butanojska kislina	ostra, po gnilem (Frank in sod., 2004); po siru (Curioni in Bosset, 2002)
V3	3-metil butanojska kislina	po siru, gnilem (Frank in sod., 2004)
V4	2-metil butanojska kislina	sadna (Sympoura in sod., 2009)
V5	Pentanojska kislina	oreškasta, po zelenjavi, švicarskem siru, drobnici (Curioni in Bosset, 2002)
V6	Heksanojska kislina	ostra, po kozah (Frank in sod., 2004)
V7	Heptanojska kislina	po kozah, siru (Frank in sod., 2004)
V8	Oktanojska kislina	ostra, po potu, maščobah, žarkem, skorji sira (Curioni in Bosset, 2002)
V9	Dekanojska kislina	po maščobah, kozah, siru s podaljšanim zorenjem (Curioni in Bosset, 2002)
ALKOHOLI		
V10	2-butanol	po alkoholu (Chemicalland21, 2013a)
V11	1-butanol	sadna, oreškasta (Engels in sod., 1997)
V12	2-pentanol	sadna, sveža, po zelenju (Curioni in Bosset, 2002)
V13	3-metil 1-butanol	nečista (McSweeney in Sousa, 2000); prijetna nota svežega sira (Engels in sod., 1997)
V14	2,3-butandiol	/
V15	2-metil 3-pentanol	/
V16	1-heksanol	sadna, oreškasta (Engels in sod., 1997)
V17	2-heptanol	sladkobna, po zeliščih, sadju, olju (Curioni in Bosset, 2002)
V18	2-etil 1-heksanol	/
V19	2-nonanol	po maščobah, zelenju (Curioni in Bosset, 2002)
ALDEHIDI		
V20	3-metil butanal	po zelenju, sladna, po zeliščih, ostra; pri nizkih koncentracijah prijetna sadna (Curioni in Bosset, 2002)
V21	Heksanal	nežno sadna, po zelenju (Curioni in Bosset, 2002)
V22	Heptanal	po citrusih (Cornu in sod., 2009); zeliščna (Curioni in Bosset, 2002)
V23	Oktanal	po maščobah, po zelenju (Curioni in Bosset, 2002)
V24	Benzaldehid	po mandljih, grenki mandlji (Singh in sod., 2003)
V25	Nonanal	po zelenju, po maščobah, travi, živalih, zatohla (Curioni in Bosset, 2002)
V26	Benzenacetaldehid	po pečenem / praženem (Mallia in sod., 2005); cvetna (Jung in sod., 2013)
V27	2-nonenal	po lepenki, zelenju (Cornu in Bosset, 2002); po kumarah, maščobah (Frank in sod., 2004)
V28	Dekanal	po zelenju (Curioni in Bosset, 2002)
ESTRI		
V29	Etil ester očetne kisline	sadna, po zelenju (Curioni in Bosset, 2002); sadna, po ananasu, oreškasta (Liu in sod., 2004)
V30	Etil ester butanojske kisline	sadna (Mallia in sod., 2005); po banani, jabolkah, sladka, sadna, dišeča (Liu in sod., 2004)
V31	Butil ester očetne kisline	sadna, po ananasu, maščobah (Abilleira in sod., 2010b)

(se nadaljuje)

Nadaljevanje preglednice 11: Hlapne organske spojine (HOS) v Nanoškem siru in njihove aromatične note

n ^o HOS	HOS po skupinah	Aromatične note HOS
ESTRI		
V32	1-butanol 3-metil acetat	sadna, karamelna, po bananah, arašidih (Curioni in Bosset, 2002)
V33	Etil ester heksanojske kisline	sadna, sladna, po nezrelem sadju, jabolkah, pomarančah, zelenju (Curioni in Bosset, 2002)
V34	Metil ester oktanojske kisline	/
V35	Etil ester oktanojske kisline	sadna, cvetna, po hruški, banani, ananasu, vinu (Liu in sod., 2004)
V36	Etil ester dekanjske kisline	sadna (Mallia in sod., 2005); sadna, po jabolkah, žganju, olju (Liu in sod., 2004)
KETONI		
V37	2,3-butandion (diacetil)	po maslu (Calbert and Price, 1949; Engels in sod., 1997); po oreških (Engels in sod., 1997)
V38	2-butanon	po juhi in rastlinskem soku, acetonu (Frank in sod., 2004); sladka, po senu, po kravah, nečista (Shipe in sod., 1962)
V39	2-pentanon	po pomarančni lupini (Jung in sod., 2013)
V40	2,3-pentandion	/
V41	3-hidroksi 2-butanon (acetoin)	po maslu (Poveda in sod., 2008)
V42	2-hidroksi 3-pentanon	po maščobah/kremi (Poveda in sod., 2008); po zemlji, oreških, tartufih (Curioni in Bosset, 2002)
V43	2,3-heptandion	po maslu, siru, sladkem, oreških, sadju, kremi, karameli (Chemicalland2, 2013b)
V44	2-heptanon	po sirih z modro plesnijo, sadna, po potu, plesni (Singh in sod., 2003); sadna, cvetna, zatohla (Curioni in Bosset, 2002); sladko-grenka, po janežu (Alewijn, 2006)
V45	2-oktanon	po sadju, zelenju (Frank in sod., 2004); sadna, cvetna, zatohla (Curioni in Bosset, 2002)
V46	6-metil 5-heptan-2-on	po lesu, mahu (Sympoura in sod., 2009)
V47	2-nonanon	po mleku (Mallia in sod., 2005); sadna, cvetna, zatohla (Curioni in Bosset, 2002)
V48	8-nonen-2-on	živalska, smrdljiva (Mallia in sod., 2005)
V49	2-undekanon	sadna, cvetna, zatohla (Curioni in Bosset, 2002)
TERPENI		
V50	Pinan	ostra po alkoholu (Langler, 1966)
V51	α -pinen	po boru, zelenju (Curioni in Bosset, 2002)
V52	Sabinen	dišeča, po lesu, smoli (Mariaca in sod., 1997)
V53	Limonen	po pomaranči (Bendall, 2001)
V54	p-cimen	po sadju, limoni (Högnadóttir in Rouseff, 2003); zeliščna, sveža, po citrusih (Mariaca in sod., 1997)
V55	β -kariofilen	po pomaranči, jagodičevju (Bendall, 2001); sladkobna, po lesu (Mariaca in sod., 1997)

(se nadaljuje)

Nadaljevanje preglednice 11: Hlapne organske spojine (HOS) v Nanoškem siru in njihove aromatične note

¹ n HOS	HOS po skupinah	Aromatične note HOS
OSTALE KOMPONENTE		
V56	2-okten	/
V57	Toluen	po oreških (Curioni in Bosset, 2002; Delgado in sod., 2011); grenka (Curioni in Bosset, 2002)
V58	Etilbenzen	po topilu, barvi (Curioni in Bosset, 2002)
V59	Dimetil sulfon	v visokih koncentracijah neprijetena (Tosso in sod., 2002)
V60	Undekan	/
V61	p-krezol	po hlevu (Frank in sod., 2004); po fekalijah, slabem zraku (Avsar in sod., 2004)
V62	δ-oktalakton	po kokosu, sadju, breskvah (Curioni in Bosset, 2002)
V63	δ-dekalakton	Po kokosu, breskvah, sladko, po smetani (Curioni in Bosset, 2002)
KOMPONENTE IZ 2. POLETNE SEZONE		
V64	cis-karan (terpen)	/
V65	Oktil ester butanojske kisline	/
V66	Kopaen (terpen)	sveža, po zemlji, meloni (Mariaca in sod., 1997)
KOMPONENTA V SIRU IZ »NEODBRANEGA« MLEKA		
V67	nonanojska kislina	po kozah (Curioni in Bosset, 2002)

¹ oznake identificiranih hlapnih organskih spojin

Preglednica 12: F-vrednost in p-vrednost vplivov na posamezno hlapno organsko spojino (HOS) v uporabljenem statističnem modelu

Table 12: F-values and p-values of the effects on the individual volatile organic compound from statistical model used

HOS po funkcionalnih skupinah	Sezona		Serija		Zorenje		Hlebec	
	F ¹	p ²	F	p	F	p	F	p
MAŠČOBNE KISLINE								
Ocetna kislina	3,34	ns	11,33	***	4,71	***	3,44	***
Butanojska kislina	10,68	**	1,86	ns	9,73	***	10,56	***
3-metil butanojska kislina	9,63	**	4,58	**	46,91	***	2,98	**
2-metil butanojska kislina	13,97	**	5,11	*	64,17	***	2,74	**
Pentanojska kislina	85,05	***	0,00	ns	34,50	***	2,53	**
Heksanojska kislina	139,44	***	18,88	***	62,21	***	1,66	ns
Heptanojska kislina	4,19	ns	0,82	ns	22,87	***	2,46	**
Oktanojska kislina	212,85	***	17,13	***	14,38	***	5,46	***
Dekanojska kislina	52,26	***	3,78	*	3,44	**	4,93	***
ALKOHOLI								
2-butanol	7,30	*	1,58	ns	6,36	***	1,29	ns
1-butanol	14,72	***	5,07	*	7,70	***	2,27	*
2-pentanol	9,95	**	0,68	ns	49,28	***	4,29	***
3-metil 1-butanol	1,37	ns	1,61	ns	8,38	***	1,14	ns
2,3-butandiol	3,44	ns	0,23	ns	33,20	***	4,60	***
2-metil 3-pentanol	18,97	***	0,28	ns	153,77	***	3,44	***
1-heksanol	96,16	***	1,26	ns	80,45	***	3,34	***
2-heptanol	0,00	ns	0,92	ns	54,04	***	1,69	ns
2-etil 1-heksanol	6,44	*	1,85	ns	3,10	**	8,33	***
2-nonanol	0,15	ns	0,25	ns	7,14	***	0,85	ns
ALDEHIDI								
3-metil butanal	4,13	ns	3,01	ns	7,10	***	5,40	***
Heksanal	2,42	ns	3,13	ns	72,28	***	2,06	*
Heptanal	0,23	ns	0,01	ns	3,78	***	0,60	ns
Oktanal	208,52	***	1,72	ns	1,94	ns	3,68	***
Benzaldehid	1,15	ns	0,47	ns	216,62	***	3,82	***
Nonanal	8,89	**	0,36	ns	12,14	***	5,05	***
Benzeneacetaldehid	5,01	*	5,97	**	7,40	***	0,25	ns
2-nonenal	3,82	ns	0,309	ns	5,22	***	1,74	ns
Dekanal	16,85	***	0,30	ns	15,90	***	0,78	ns
ESTRI								
Etil ester ocetne kisline	7,02	*	0,02	ns	8,31	***	1,41	ns
Etil ester butanojske kisline	0,57	ns	0,72	ns	4,66	***	4,97	***
1-butanol 3-metil acetat	6,81	*	1,20	ns	43,90	***	0,83	ns
Etil ester heksanojske kisline	35,88	***	0,76	ns	22,92	***	1,70	ns
Metil ester oktanojske kisline	87,33	***	0,27	ns	12,17	***	8,28	***
Etil ester oktanojske kisline	180,19	***	0,85	ns	5,82	***	0,92	ns
Etil ester dekanjske kisline	56,25	***	5,90	*	3,54	**	7,56	***
KETONI								
2,3-butandion	1,20	ns	1,70	ns	89,64	***	10,49	***
2-butanon	1,12	ns	2,71	ns	4,22	***	0,67	ns
2-pentanon	2,82	ns	0,43	ns	13,64	***	4,86	***
2,3-Pentandion	12,81	**	1,25	ns	120,91	***	14,77	***
3-hidroksi 2-butanon	1,71	ns	0,62	ns	80,29	***	4,94	***

(se nadaljuje)

Nadaljevanje preglednice 12: F-vrednost in p-vrednost vplivov na posamezno hlapno organsko spojino (HOS) v uporabljenem statističnem modelu

Hlapne organske spojine po funkcionalnih skupinah	Sezona		Serija		Zorenje		Hlebec	
	F ¹	p ²	F	p	F	p	F	p
KETONI								
2-hidroksi 3-pentanon	21,41	***	0,24	ns	148,55	***	4,03	***
2,3-heptandion	13,94	**	0,71	ns	0,00	ns	47,96	***
2-heptanon	1,52	ns	0,34	ns	11,27	***	0,23	ns
2-oktanon	0,12	ns	0,23	ns	5,92	***	1,33	ns
6-metil 5-hepten-2-on	13,10	**	1,17	ns	0,00	ns	64,25	***
2-nonanon	0,15	ns	0,14	ns	6,90	***	2,21	*
8-nonen-2-on	87,34	***	0,27	ns	12,17	***	8,28	***
2-undekanon	93,83	***	0,76	ns	29,58	***	7,62	***
OSTALE HOS								
2-okten	8,76	*	3,26	ns	8,62	***	17,62	***
Toluen	100,60	***	2,07	ns	16,23	***	2,80	**
Etilbenzen	2,95	ns	3,22	ns	13,15	***	1,46	ns
Dimetil sulfon	23,29	***	0,69	ns	28,14	***	2,30	*
Undekan	208,84	***	0,00	ns	3,36	**	1,05	ns
p-krezol	12,46	**	2,17	ns	9,13	***	2,43	**
δ-oktalakton	56,49	***	1,35	ns	26,49	***	3,31	***
δ-dekalakton	22,32	***	0,04	ns	1,39	ns	9,25	***
TERPENI								
Pinan	77,84	***	8,74	**	17,07	***	11,47	***
α-pinen	74,91	***	0,18	ns	33,47	***	6,00	***
Sabinen	139,44	***	18,88	***	62,21	***	1,66	ns
Limonen	0,09	ns	0,71	ns	7,55	***	1,63	ns
p-cimen	8,24	*	0,094	ns	2,15	*	8,35	***
β-kariofilen	21,49	***	1,74	ns	2,76	*	13,16	***

¹F-vrednost in ²p-vrednost iz splošnega linearnega modela; ns – ni statistično značilno p>0.05; * 0.01<p<0.05; **0.001<p<0.01; *** p<0.001

Preglednica 13: Hlapne organske spojine (HOS) v Nanoškem siru s statističnimi parametri v uporabljenem statističnem modelu

Table 13: Volatile organic compounds in Nanos cheese with statistical parameters from statistical model used

HOS	Rt ¹	ID ²	Delež vplivov (%)				SSE ³ (%)
			Zorenje	Sezona	Serijsa	Hlebec	
MAŠČOBNE KISLINE							
Ocetna kislina	6,91	ST	7,61	2,01	13,93	10,21	66,24
Butanojska kislina	11,13	ST	12,27	13,76	2,08	24,40	47,49
3-metil butanojska kislina	12,09	ST	48,77	3,45	3,28	5,68	38,81
2-metil butanojska kislina	12,30	ST	57,20	4,11	3,01	4,49	31,20
Pentanojska kislina	13,10	MS	33,27	24,66	0,00	4,47	37,60
Heksanojska kislina	15,58	MS	43,86	21,77	5,90	2,14	26,32
Heptanojska kislina	17,85	ST	35,37	1,96	0,77	6,99	54,91
Oktanojska kislina	20,04	ST	7,41	58,09	9,40	5,16	19,94
Dekanojska kislina	23,73	ST	4,22	33,06	4,79	11,10	46,82
ALKOHOLI							
2-butanol	7,51	ST	13,34	2,88	1,27	4,97	77,54
1-butanol	8,81	ST	11,53	5,97	4,15	6,24	72,10
2-pentanol	9,45	ST	49,51	4,63	0,63	7,90	37,34
3-metil 1-butanol	10,29	ST	17,79	0,52	1,22	4,43	76,05
2,3-butandiol	11,93	ST	41,13	2,09	0,28	10,45	46,04
2-metil 3-pentanol	12,38	MS	74,30	3,31	0,10	3,04	19,25
1-heksanol	13,17	ST	51,15	21,51	0,57	3,89	22,89
2-heptanol	13,76	MS	58,17	0,00	0,46	3,34	38,03
2-etil 1-heksanol	17,09	ST	4,99	8,22	4,76	24,59	57,44
2-nonanol	18,55	MS	15,42	0,05	0,17	3,38	80,98
ALDEHIDI							
3-metil butanal	8,89	ST	11,74	3,71	5,44	16,35	62,76
Heksanal	11,99	ST	61,72	0,52	1,36	3,23	33,16
Heptanal	14,22	MS	8,95	0,07	0,01	2,61	88,35
Oktanal	16,76	ST	1,51	64,61	1,07	5,26	27,55
Benzaldehid	17,11	ST	83,86	0,07	0,06	2,71	13,29
Nonanal	19,03	ST	19,65	7,37	0,59	14,97	57,42
Benzenacetaldehid	19,13	MS	15,29	1,04	2,48	0,94	80,25
2-nonenal	20,56	MS	5,81	0,99	0,16	3,56	89,49
Dekanal	21,22	MS	27,38	4,27	0,15	2,46	65,74
ESTRI							
Etil ester očetne kisline	7,87	ST	17,81	3,08	0,02	5,53	73,56
Etil ester butanojske kisline	11,70	MS	9,07	0,53	1,35	17,72	71,34
1-butanol 3-metil acetat	13,37	MS	51,05	1,20	0,43	1,78	45,54
Etil ester heksanojske kisline	16,29	ST	32,15	11,12	0,47	4,37	51,90
Metil ester oktanojske kisline	19,22	MS	9,18	50,28	0,31	11,45	28,78
Etil ester oktanojske kisline	20,69	MS	7,92	39,31	0,37	2,31	50,10
Etil ester dekanjske kisline	24,17	MS	3,31	39,02	8,18	12,97	36,51
KETONI							
2,3-butandion (Diacetil)	7,58	MS	60,92	0,70	2,19	13,08	23,11
2-butanon	7,76	ST	11,94	0,42	2,04	3,48	82,12
2-pentanon	9,59	ST	22,08	2,34	0,71	14,43	60,43
2,3-pentandion	9,73	MS	58,38	7,84	1,55	13,08	19,15
3-hidroksi 2-butanon (Acetoin)	10,43	ST	62,73	0,66	0,48	7,08	29,04

(se nadaljuje)

Nadaljevanje preglednice 13: Hlapne organske spojine (HOS) v Nanoškem siru s statističnimi parametri v uporabljenem statističnem modelu

HOS	Rt ¹	ID ²	Delež vplivov (%)				SSE ³ (%)
			Zorenje	Sezona	Serijsa	Hlebec	
KETONI							
2-hidroksi 3-pentanon	12,51	MS	73,81	4,52	0,10	3,67	17,89
2,3-heptandion	12,57	MS	0,00	30,35	3,11	45,62	20,93
2-heptanon	13,93	ST	23,04	0,32	0,14	0,86	75,64
2-oktanon	16,42	ST	13,17	0,05	0,20	5,43	81,14
6-metil 5-hepten-2-on	16,54	MS	0,00	29,98	5,35	48,18	16,49
2-nonanon	18,73	ST	14,36	0,08	0,15	8,42	76,98
8-nonen-2-on	19,42	MS	9,18	50,28	0,31	11,45	28,78
2-undekanon	22,74	MS	83,00	9,35	0,15	5,32	2,19
OSTALE HOS							
2-okten	11,20	MS	8,33	12,67	9,50	12,67	38,30
Toluen	11,35	MS	17,27	34,85	1,43	5,46	40,98
Etilbenzen	13,55	MS	22,50	1,04	2,80	4,18	69,48
Dimetil sulfon	16,89	MS	38,13	9,09	0,54	5,71	46,53
Undekan	17,64	MS	4,19	44,58	0,00	2,40	48,83
p-krezol	19,07	MS	16,39	6,60	2,30	8,00	66,72
δ-oktalakton	24,35	MS	28,57	22,65	1,08	6,55	41,16
δ-dekalakton	27,74	ST	1,82	26,35	0,11	22,20	49,51
TERPENI							
Pinan	14,37	MS	9,44	47,20	10,60	11,64	21,11
α-pinen	14,77	ST	26,66	34,81	0,17	8,76	29,60
Sabinen	15,94	ST	43,86	21,77	5,90	2,14	26,32
Limonen	17,25	ST	15,83	0,04	0,66	6,26	77,20
p-cimen	17,43	ST	3,71	12,39	0,29	26,40	57,21
β-kariofilen	25,63	ST	2,94	30,48	4,95	25,73	35,90

¹retencijski čas; ²uporabljena identifikacija, ³nepojasnjeno del variabilnosti; ST – identifikacija s pomočjo Rt in masnih spektrov standardnih raztopin posameznih komponent, MS – identifikacija s pomočjo spektralne knjižnice;

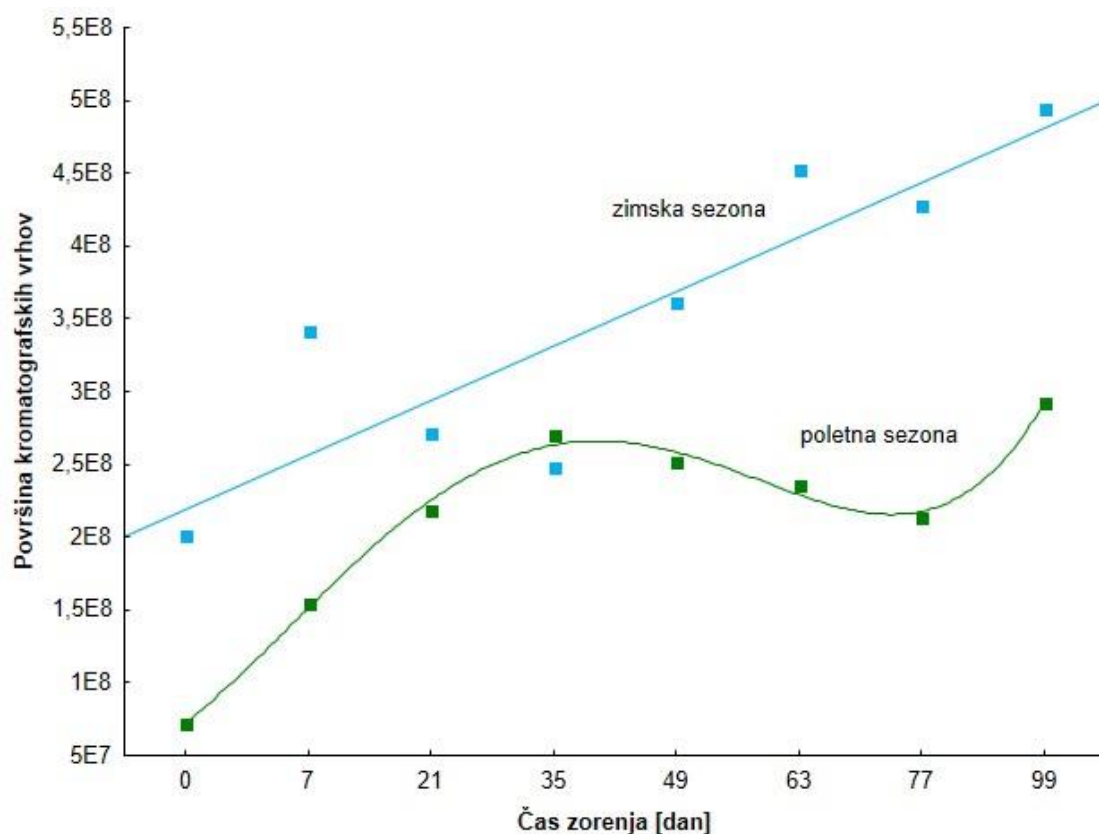
4.3.1.2 Analiza hlapnih organskih spojin Nanoškega sira, njihov trend vsebnosti med zorenjem ter vpliv sezone

4.3.1.2.1 Proste maščobne kisline

V vzorcih Nanoškega sira iz obeh sezon smo identificirali 9 različnih prostih MK. Pentanojska kislina je bila prisotna samo v sirih poletne sezone medtem ko so bile ostale proste MK prisotne v sirih obeh sezon. Ves čas zorenja so bile prisotne štiri proste MK in sicer očetna, butanojska, heksanojska ter oktanojska kislina, kar je skladno z literaturnimi podatki o najbolj pogostih prostih MK (Aminifar in sod., 2014). Tudi v našem primeru sta bili od omenjenih prostih MK butanojska in heksanojska kislina prisotni v največjih koncentracijah, ki so 99. dan zorenja dosegle vrednost $1,76 \cdot 10^8$ za butanojsko oz. $7,61 \cdot 10^7$ za heksanojsko kislino. Vsebnost posamezne kisline je izražena kot velikost površine kromatografskega vrha po času (Priloga H). V nobeni od sezon (zimsko, poletno) v sirnini (0. dan zorenja) nismo identificirali 3-metil butanojske kisline, 2-metil butanojske kisline ter pentanojske kisline. Po 3 mesecih zorenja se je v obeh sezonah delež prostih MK povečal glede na začetni delež prostih MK v sirnini (0. dan) (Priloga I). V zimski sezoni je

bil po 3 mesecih zorenja delež prostih MK v primerjavi z ostalimi skupinami HOS kot so alkoholi, ketoni, aldehidi, terpeni ter ostale HOS največji. V poletni sezoni pa je bil delež prostih MK nižji le od ketonov (Priloga I). Znano je, da se med zorenjem proste MK sproščajo iz trigliceridov (Perotti in sod., 2009), vendar to ne pomeni, da njihova vsebnost med zorenjem zgolj povečevala. Še posebej se je z zorenjem v obeh sezonah povečevala vsebnost 3-metil butanojske kisline (izovalerična kislina), 2-metil butanojske kisline ter heksanojske kisline. Butanojska kislina je v celotnem obdobju zorenja v obeh sezonah med prostimi MK dosegla največje koncentracije. Za to kislino je znano, da pomembno vpliva na oblikovanje končne arome sira (Curioni in Bosset, 2002) in da spada med najbolj zastopane aromatično aktivne snovi (Cornu in sod., 2009). Glede na visoko vsebnost butanojske kisline v primerjavi z drugimi prostimi MK bi lahko zaključili, da je ta kislina oblikovala skupni trend koncentracije prostih MK med zorenjem.

Skupna vsebnost prostih MK je bila v zimski sezoni v primerjavi s poletno večja tako v sirnini kot tudi po 99 dnevih zorenja (Slika 13), kar nakazuje, da na končno vsebnost prostih MK v siru vpliva koncentracija prostih MK v sirnini. Alewijn (2006) v svoji študiji piše, da naj bi večina prostih MK v sirnini izvirala iz mleka. V našem primeru v vzorcih mleka razlik v vsebnosti prostih MK nismo opazili. Omeniti moramo, da je mleko, namenjeno za predelavo v Nanoški sir, tipizirano na 3,05 % do 3,15 % mlečne maščobe, zato možnemu vplivu zaradi različne vsebnosti mlečne maščobe ne moremo pripisati. Poleg tega je potrebno poudariti, da so MK v mleku večinoma vezane v trigliceride. Chávarri in sod. (1999) razlagajo, da je bila v španskem siru Idiazábal v zimski sezoni večja vsebnost kratkoverižnih prostih MK (do 12 C-atomov) zaradi delovanja lipoproteinskih lipaz. Pomemben vpliv na vsebnost MK imajo tudi lipaze mikroorganizmov (Aminifar in Emam-Djomeh, 2014). Na obseg lipolize med drugim vpliva tudi prehrana krav (Park, 2001), lipolitični encimi, ki izvirajo iz mleka (Collins in sod., 2003), encimi različnih mikroorganizmov (MKB, plesni) (Curioni in Bosset, 2002) ter tudi sirišče (Aminifar in Emam-Djomeh, 2014). Urbach (1990) trdi, da lahko tudi neustrezen vnos hranilnih snovi s krmnim obrokom pri kravah spodbudi v mleku spontano lipolizo mlečne maščobe. V nasprotju z našimi rezultati so Perotti in sod. (2009) v svoji študiji dokazali, da je bila vsebnost prostih MK večja v poletni sezoni zaradi večjega števila psihrotrofnih bakterij v surovem mleku, ki so znane kot proteolitične in lipolitične bakterije (Bergère in Lenoir, 2000), s čimer prispevajo k večji koncentraciji prostih MK. Za psihrotrofne bakterije je tudi značilno, da jim ustreza daljše skladiščenje mleka pri nizkih temperaturah (2–4 °C), njihovi lipolitični in proteolitični encimi so navadno odporni proti postopkom toplotne obdelave mleka (Hermier in Cerf, 2004). Večina prostih MK s 4 do 20 C-atomi nastane pri lipolizi trigliceridov zaradi lipolitične aktivnosti plesni (Curioni in Bosset, 2002). V našem primeru bi to lahko bil eden izmed možnih vzrokov večje vsebnosti prostih MK v Nanoškem siru v zimski sezoni. V zimski sezoni je bila v zorilnici zaradi zunanjih pogojev vsebnost vlage nekoliko večja. Znano je namreč, da je večja vsebnost vlage primernejša za rast plesni.



Slika 13: Trend vsebnosti prostih maščobnih kislin med zorenjem Nanoškega sira v zimski in poletni sezoni

Figure 13: Trend of fatty acids content during ripening of Nanos cheese in winter and summer season

Na grafu skupne vsebnosti prostih MK med zorenjem bi za poletno sezono lahko narisali polinom 3. reda, kar pomeni, da vrednost oscilira, medtem ko je vsebnost prostih MK v zimski sezoni naraščala premočrtno (Slika 13).

Vpliv časa zorenja je bil pri vseh prostih MK statistično značilen (Preglednica 12, stolpec Zorenje), z največjim deležem vpliva pri 2-metil butanojski kislini in najmanjšim pri dekanovski kislini (Preglednica 13, stolpec Delež vplivov). Vpliv sezone se je izkazal kot statistično značilen pri skoraj vseh prostih MK (razen pri očetni kislini in heptanojski kislini) (Preglednica 12, stolpec Sezona).

OCETNA KISLINA

Med zorenjem se vsebnost očetne kisline ni bistveno spreminjala in je le nekoliko nihala. Njena vsebnost ni naraščala z zorenjem v primerjavi z nekaterimi drugimi identificiranimi prostimi MK, ki nastanejo pri lipolizi (npr. heksanojska) ali iz AK (3-metil butanojska kislina). Očetna kislina ima različne poti nastanka, in sicer lahko nastane v siru v oksidaciji laktoze zaradi aktivnosti SK ali v oksidaciji laktata zaradi aktivnosti nestarterskih MKB. Poleg tega očetna kislina lahko tudi nastane v katabolizmu (oksidativna deaminacija in

dekarboksilacija) AK (alanin, serin) zaradi aktivnosti nestarterskih MKB in SK (Ur-Rehman in sod., 2000).

V primerjavi z ostalimi identificiranimi HOS je očetna kislina v Nanoškem siru dosegla visoko vsebnost. Do podobnih ugotovitev so prišli Gioacchini in sod. (2010) pri proučevanju trdega tipa sira, kjer je očetna kislina dosegla večje vsebnosti v primerjavi z drugimi HOS. V obeh sezonah smo največjo vsebnost te MK v trimesečnem zorenju izmerili 7. dan zorenja (Priloga G, Priloga H). Očetna kislina naj bi prehajala iz krme v mleko (Carpino in sod., 2004). V mleku za Nanoški sir proste očetne kisline nismo identificirali, smo pa potrdili njeno prisotnost v obeh osnovnih krmah z večjo vsebnostjo v travni silaži. Slednje bi lahko bil vzrok večje vsebnosti očetne kisline v sirih iz zimske sezone.

BUTANOJSKA KISLINA

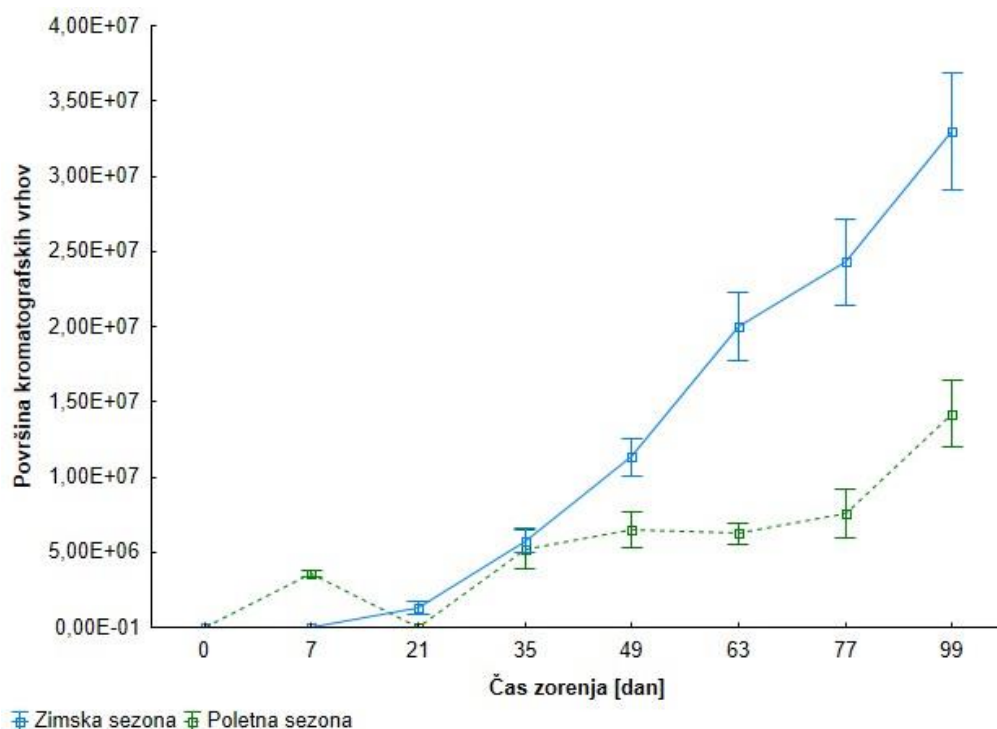
Od vseh MK, identificiranih v Nanoškem siru v obeh sezonah, je dosegla butanojska kislina najvišje vrednosti (Priloga G, Priloga H). Do podobnega zaključka so prišli tudi Stuknyte in sod. (2014), ko je bila v trdem tipu sira »Bitto« slednja spojina z največjo vsebnostjo. Znano je, da je ta MK ena pomembnejših aromatično aktivnih snovi v siru (Cornu in sod., 2009), ki prispeva k oblikovanju končne arome sira (Curioni in Bosset, 2002). Ves čas zorenja (razen 21. in 35. dan) je imela butanojska kislina večjo vrednost v zimski sezoni.

Butanojska kislina je prisotna že v samem mleku, poleg tega pa lahko v siru nastane zaradi prisotnih lipaz ali mikrobiote (McSweeney in Sousa, 2000). Butanojska kislina je tudi glavni produkt klostridijev, ki fermentirajo laktozo oziroma mlečno kislino v butanojsko kislino (Stefanon in Procida, 2004). Spore klostridijev se lahko prenesejo iz krme preko mleka v sir. Rezultat je večja koncentracija butanojske kisline v siru (Danner in sod., 2003). Morda je bil tudi to eden izmed razlogov, zakaj je bila njena vsebnost večja že v sirnini ter v zadnjem delu zorenja sira iz zimske sezone. V zimski sezoni je namreč bila osnovna krma krav travna silaža, ki je lahko včasih tudi ugodno okolje za razvoj klostridijev (Babnik in Verbič, 2003).

3-METIL BUTANOJSKA KISLINA (IZOVALERIČNA KISLINA)

Izovalerična kislina spada med razvejene MK. Prisotnost slednjih je odvisna od razgradnje proteinov. Izovalerična kislina, ki je prisotna predvsem v sirih, ki zorijo dlje časa, nastane iz AK leucina (Curioni in Bosset, 2002) in sicer v katabolizmu leucina najprej nastane aldehid 3-metil butanal, ki se nato oksidira do maščobne kisline (3-metil butanojske kisline) ali reducira do alkohola (3-metil 1-butanola) (Mallia in sod., 2005). Vsebnost prostih MK se je ves čas zorenja v zimski sezoni povečevala, v poletni sezoni pa povečevanje ni bilo tako izrazito (Slika 14). Tudi Delgado in sod. (2011) pišejo v svoji študiji, kjer so spremljali 90-dnevno zorenje sira »Ibores«, da je vsebnost 3-metil butanojske kisline naraščala, vendar le do 60. dneva zorenja. V našem primeru se je ta MK

povečevala vse do 99. dneva v obeh sezonah, večje vsebnosti pa je dosegla v zimski sezoni.



Slika 14: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) 3-metil butanojske kisline v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah

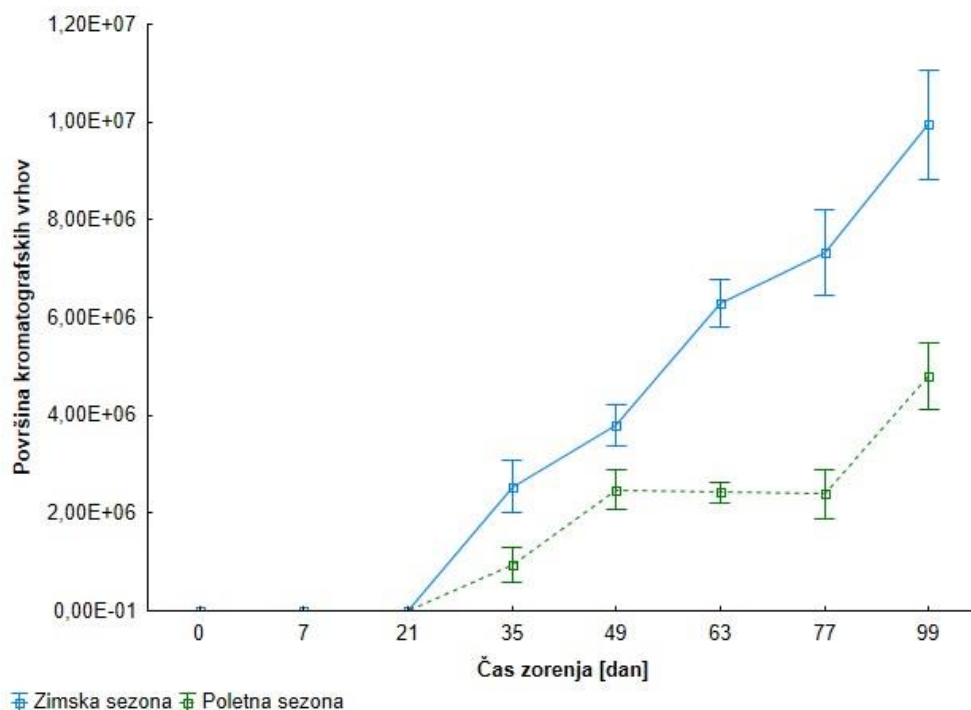
Figure 14: The content (mean $\pm$ standard error) of 3-metil butanoic acid in Nanos cheese during ripening time in both seasons

2-METIL BUTANOJSKA KISLINA

2-metil butanojska kislina nastane iz AK izoleucin (Curioni in Bosset, 2002). V obeh sezonah se je njena vsebnost povečala do 99. dneva (Slika 15). Delgado in sod. (2011) navajajo, da je podobno kot vsebnost 3-metil butanojske kisline, tudi vsebnost 2-metil butanojske kisline naraščala le do 60. dneva zorenja. V našem primeru se je v zimski sezoni med zorenjem njena vsebnost ves čas linearno povečevala, medtem ko se je v poletni sezoni povečevala do 49. dneva, nato pa se njena vsebnost ni spremenila do 77. dneva zorenja.

2-metil butanojska kislina je v zimski sezoni dosegla večje vrednosti. Zanimivo je, da smo to MK identificirali tudi v travni silaži, ne pa tudi v sveži travi in v vzorcih mleka. Zaradi teh vzrokov bi težko nedvoumno dokazali prehod te MK iz krme. Poleg tega je tudi nismo identificirali v sirnini, ampak je bila identificirana šele na 35. dan zorenja.

V obeh sezonah je bila vsebnost 2-metil butanojske kisline manjša od vsebnosti 3-metil butanojske kisline. Nasprotno pa so Delgado in sod. (2011) izmerili večjo vsebnost 2-metil butanojske kisline.



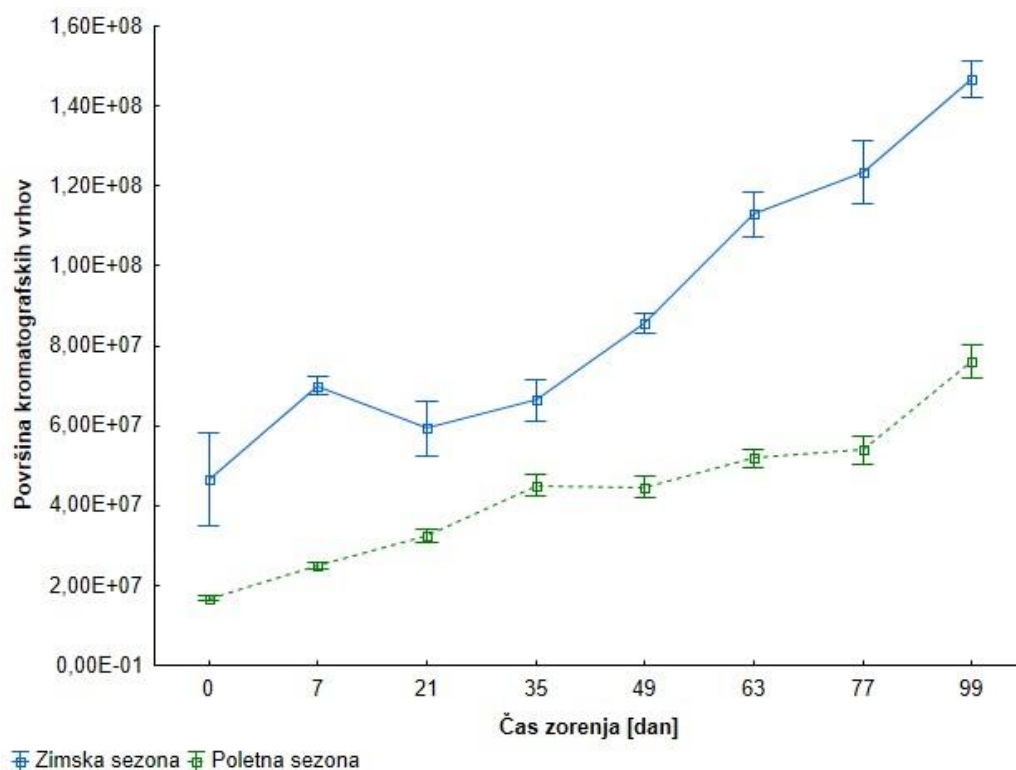
Slika 15: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) 2-metil butanojske kisline v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah

Figure 15: The content (mean $\pm$ standard error) of 2-metil butanoic acid in Nanos cheese during ripening time in both seasons

HEKSANOJSKA KISLINA

Heksanojska kislina je bila ena od bolj zastopanih HOS v Nanoškem siru, predvsem proti koncu zorenja (99. dan). Omenili smo že, da spada heksanojska kislina med glavne MK v mlečni maščobi (Collins in sod., 2003), njena prisotnost v siru pa naj bi bila predvsem posledica lipolize (Delgado in sod., 2011). Večjo vsebnost proste heksanojske kisline, v primerjavi z ostalimi HOS, so izmerili tudi v nekaterih že proučevanih sirih trdega tipa. Poleg tega naj bi tudi pomembno oblikovala končno aromo sira, odgovorna pa je za oster vonj po kozah (Frank in sod., 2004). V Nanoškem siru je vsebnost heksanojske kisline med zorenjem v obeh sezonah linearno naraščala (Slika 16). Večjo vsebnost te HOS smo opazili v zimski sezoni. Carpino in sod. (2004) pa so v svoji študiji zapisali, da v sirih iz mleka krav, ki so bile na paši, niso uspeli potrditi prisotnosti heksanojske kisline. V našem primeru smo heksanojsko kislino identificirali tudi v osnovni krmi in sicer le v travni silaži, vendar se vsebnost te proste MK v vzorcih mleka med sezonama ni razlikovala.

Glede na to težko zaključimo, da bi krma lahko vplivala na vsebnost heksanojske kisline v siru.



Slika 16: Vsebnost (povprečje ± standardna napaka) heksanojske kisline v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah

Figure 16: The content (mean ± standard error) of hexanoic acid in Nanos cheese during ripening time in both seasons

HEPTANOJSKA KISLINA

Heptanojska kislina je bila že identificirana v trdih tipih sirov, kot sta čedar in gauda. Ta MK pa ima izvor v mlečni maščobi (Alewijn, 2006). V našem primeru se njena vsebnost z zorenjem ni spreminjala (Priloga G, Priloga H), poleg tega tudi vpliv sezone zanjo ni bil statistično značilen (Preglednica 12).

OKTANOJSKA KISLINA

Oktanojska kislina je bila prisotna že v sirnini (0. dan zorenja). Zanja je namreč značilno, da izvira iz mlečne maščobe (Delgado in sod., 2011). V poletni sezoni se njena vsebnost med zorenjem (do 99. dneva) ni spreminjala. V zimski sezoni je 35. dan nekoliko zmanjšala in nato povečevala do 99. dne, ko je dosegla podobno vsebnost kot na začetku v sirnini. V vzorcih osnovne krme in mleka je nismo identificirali.

DEKANOJSKA KISLINA

Dekanojsko kislino, ki nastane v lipolizi (Delgado in sod., 2011), smo v zimski sezoni zaznali že v sirnini, medtem ko smo jo v poletni sezoni zaznali 7. dan. MK je dosegla največjo vrednost v zimski sezoni, in sicer v zadnjem delu zorenja.

PENTANOJSKA KISLINA

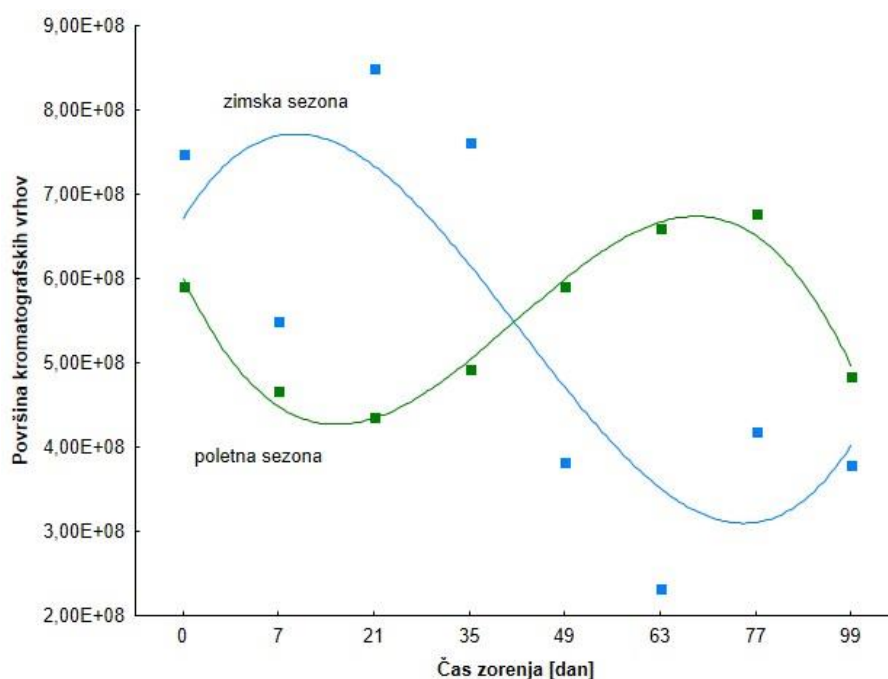
Pentanojsko kislino, ki izvira iz proteinov in tudi lipidov (Alewijn, 2006), smo do 99. dneva zorenja zaznali le v vzorcih Nanoškega sira iz poletne sezone, vendar nismo našli nobenih povezav s krmo ali mlekom. Njena vsebnost se od njenega pojava (35. dan) do 99. dneva ni spreminjala.

4.3.1.2.2 Ketoni

V vzorcih Nanoškega sira smo identificirali 13 ketonov, od katerih sta bila 2,3 heptadion in 6-metil 5-hepten-2-on prisotna samo v poletni sezoni. V obeh sezonah bi lahko spreminjanje skupne vsebnosti ketonov med zorenjem (do 99. dneva) opisali s polinomom 3. stopnje (Slika 17), ki je bil v zimski sezoni nekoliko manj izrazit. V zimski sezoni je vsebnost ketonov začela prej povečevati in je maksimalno vsebnost dosegla že 21. dan, medtem ko je bila v poletni sezoni maksimalna vrednost šele 77. dan. Poleg tega je bila maksimalna vsebnost ketonov manjša v poletni sezoni.

Glede na spreminjajoči se trend ketonov med zorenjem bi lahko povzeli, da so ketoni nekakšen produkt in hkrati prekurzor za druge komponente. Znano je, da metil ketoni nastanejo v oksidaciji MK in da se lahko pretvorijo v sekundarne alkohole (Brulè in sod., 2000). Tudi Delgado in sod. (2010) v svoji študiji navajajo, da se je trend vsebnosti ketonov spreminjal, in sicer je njihova vsebnost najprej narasla in nato padla.

V obeh sezonah sta večje vsebnosti dosegla ketona 2-heptanon in 2-nonanon. Večje vrednosti sta dosegla še diacetil in acetoin, in sicer predvsem na začetku zorenja. V poletni sezoni je večjo vsebnost dosegel še 2-pentanon.



Slika 17: Trend skupne vsebnosti ketonov v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah glede na dan zorenja v zimski in poletni sezoni

Figure 17: Trend of the total content of ketones in Nanos cheese during ripening in both seasons

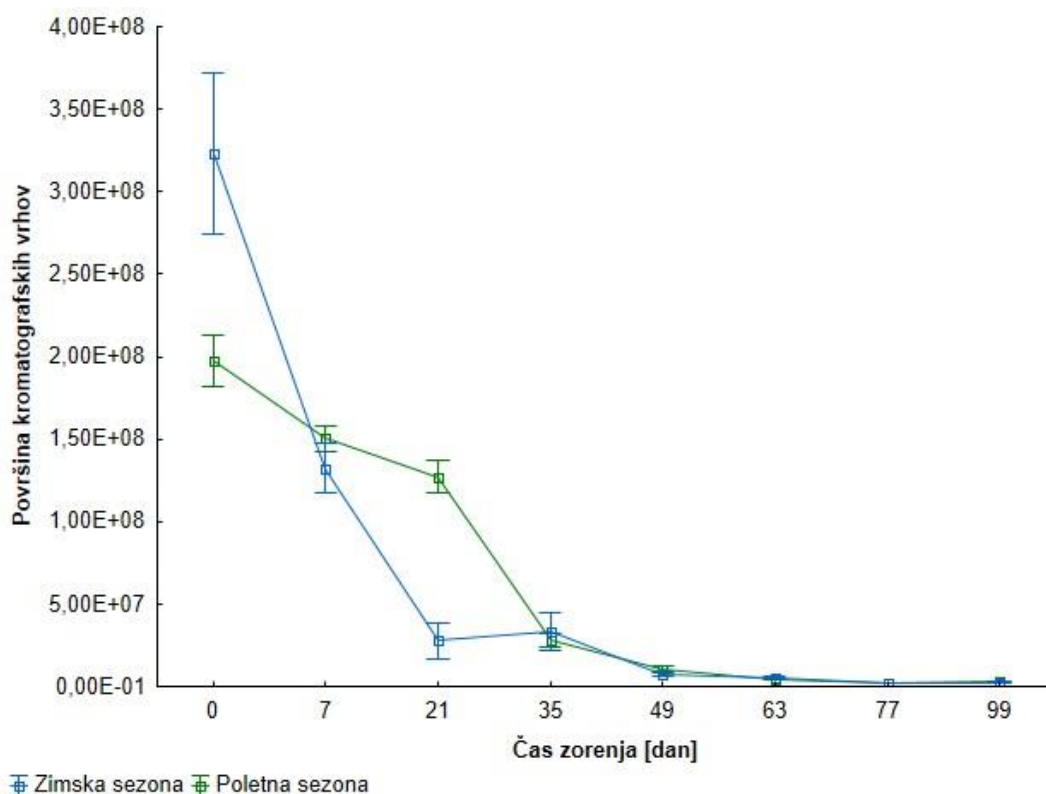
DIACETIL (2,3-butandion)

Diacetil lahko nastane po različnih metabolnih poteh (Slika 10). V eni od možnih poti nastane zaradi delovanja encimov iz acetaldehida-tiamin pirofosfata (TPP) in acetil-CoA. Nastane lahko tudi iz nestabilnega prekursorja α -ketolaktata (McSweeney in Sousa, 2000), ki nastane v metabolizmu citrata (Attaie, 2009). α -ketolaktat pa je produkt v reakciji piruvata in acetaldehida-TPP (McSweeney in Sousa, 2000).

Na vsebnost diacetila naj bi poleg procesov, ki potekajo med zorenjem, vplivala tudi aktivnost bakterij (Zeppa in Rolie, 2008), med njimi *Leuconostoc mesenteroides* in *Lactobacillus casei* (Attaie, 2009). Poleg tega se v metabolizmu citrata lahko diacetil pretvori v acetoin, 2,3 butandiol ter 2-butanon (McSweeney in Sousa, 2000). Ugotovili so, da pretvorba poteka tudi zaradi aktivnosti nestarterskih bakterij (Engels in sod., 1997).

V našem primeru je bilo diacetila največ v sirnini. V mleku smo ga identificirali le v vzorcu iz poletne sezone. Z zorenjem je vsebnost diacetila v Nanoškem siru padala, v zimski sezoni nekoliko hitreje (Slika 18). Po 49. dneh zorenja je njegova vsebnost padla za približno 40-krat. V poletni sezoni je dosegel diacetil na 63. dan podobno vsebnost, kot jo je imel v zimski sezoni na 49. dan. Ugotovljeno je bilo, da je diacetila več prav v nezorjenih mladih sirih (Fox in sod., 2000). Diacetil je namreč eden izmed glavnih produktov v začetni fermentaciji citrata zaradi aktivnosti SK (Choisy in sod., 2000b) ter se

lahko pretvarja v druge snovi (McSweeney in Sousa, 2000). Iz rezultatov (bolj strm padajoči trend vsebnosti diacetila v zimski sezoni) bi lahko zaključili, da je na podlagi diacetila sir v zimski sezoni nekoliko hitreje zorel. In sicer ob predpostavki, da se je diacetil hitreje pretvarjal v druge HOS in se mu je zato vsebnost v zimski sezoni prej zmanjšala. Poleg tega lahko trend padanja njegove vsebnosti razložimo z dejstvom, da je pogosto prekurzor za druge snovi (McSweeney in Sousa, 2000).



Slika 18: Vsebnost (povprečje ± standardna napaka) diacetila v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah

Figure 18: The content (mean ± standard error) of diacetyl in Nanos cheese during ripening in both seasons

2-BUTANON

2-butanon je bil v siru prisoten le občasno, in sicer v obeh sezonah. Nekateri prisotnost 2-butanona v sirih povezujejo s prijetno aromo (Keen in sod., 1974), medtem ko Shipe in sod. (1962) navajajo, da povzroča 2-butanon v mleku nezaželeno aromo. 2-butanon naj bi imel značilen vonj po rastlinskem soku in acetonu (Frank in sod., 2004).

2-butanon nastane zaradi aktivnosti nekaterih bakterij, in sicer iz 2,3 butandiola (2,3-butilen glikola), ki izvira iz citrata (Keen in sod., 1974). 2-butanon naj bi nato vplival na nastanek alkohola 2-butanola (Randazzo in sod., 2007). Na tvorbo 2-butanona vplivajo različne bakterije. Garde in sod. (2005) so ugotovili, da je SK, ki je vključevala

Lactococcus lactis subsp. *lactis*, vplivala na povečano vsebnost 2-butanona v siru. Randazzo in sod. (2007) pa navajajo, da so na prisotnost 2-butanona v trdem siru vplivale tako SK kot tudi nekateri nestarterski sevi MKB. SK so vključevale *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leu. mesenteroides*, od nestarterskih sevov oz. vrst MKB, ki so vplivali na nastanek 2-butanona, pa so sodelovali *Lb. plantarum*, *Lb. mesenteroides*, *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus* (Randazzo in sod., 2007). Iz tega je razvidno, da na vsebnost 2-butanona vplivajo najrazličnejše bakterije. V našem primeru je tako težko definirati, katere bakterije oz. kateri dejavnik bi lahko vplival na nastanek tega ketona. Verjetno pa v našem primeru vpliv dodane SK lahko izključimo, saj sta jo sestavljali *Str. thermophilus* in *Lb. helveticus*.

V zimski sezoni je 2-butanon dosegel maksimalno vsebnost 7. dan zorenja, medtem ko smo ga v poletni sezoni zaznali 35. dan zorenja, ko je tudi dosegel maksimalno vrednost, vendar v precej manjših koncentracijah v primerjavi z maksimalno vrednostjo iz zimske sezone. Prisoten je bil v osnovni krmi in mleku iz obeh sezon. V osnovni krmi je imel večjo vsebnost v travni silaži ter tudi v mleku iz zimske sezone. Poleg tega smo v literaturi zasledili, da naj bi bil 2-butanon prisoten v travni silaži, v mleko krav pa naj bi prišel tudi preko vdihanega zraku (Shipe in sod., 1962). V literaturi sicer nismo posebej zasledili, da bi navajali vpliv silaže (v obroku krav) na vsebnost 2-butanona v sirih.

2,3-PENTANDION

Keton 2,3-pentadion se le redko obravnava kot spojina, ki je prisotna v siru. Morales in sod. (2004) ugotavljajo, da naj bi na večjo vsebnost tega ketona prispevali nekateri sevi iz rodu *Enterobacteriaceae*. V našem primeru je bil vpliv sezone statistično značilen in sicer je v poletni sezoni dosegel nekoliko večje vrednosti. V obeh sezonah se kaže padajoči trend. Po 35. dnevu zorenja v poletni sezoni oziroma po 49. dnevu zorenja v zimski sezoni tega ketona nismo več zaznali.

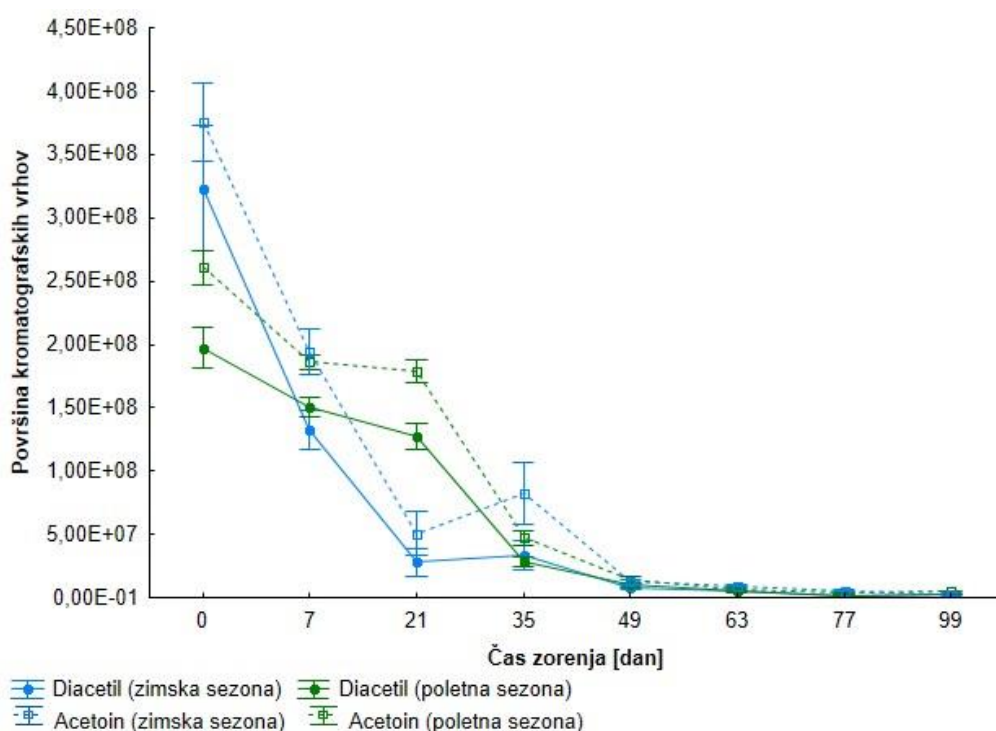
ACETOIN (3-hidroksi 2-butanon)

Kot je bilo že navedeno, acetoin nastane iz diacetila ali iz α -acetolaktata, v obeh primerih pa posredno izvira iz citrata. Acetoin je lahko nato prekurzor za alkohol 2-butanol (McSweeney in Sousa, 2000). Alewijn (2006) pa navaja, da naj bi acetoin izviral iz ogljikovodikov oziroma proteinov.

V Nanoškem siru je acetoin dosegel nekoliko večje vsebnosti v zimski sezoni v sirnini. Poleg tega smo tudi v mleku iz zimske sezone opazili nekoliko večje vsebnosti acetoina v primerjavi z mlekom iz poletne sezone. Acetoin je bil prisoten tudi v osnovnih krmah iz obeh sezon, vendar razlike v vsebnosti niso bile statistično značilne. Na začetku zorenja (v sirnini) je bila vsebnost tega ketona zelo visoka, vendar pa je z zorenjem zelo hitro padla.

63. dan zorenja je njegova vsebnost primerljiva z vsebnostjo večine ostalih ketonov, identificiranih na ta dan. Sicer je bil acetoin prisoten vse do 99. dneva zorenja.

V obeh sezonah je imel acetoin nekoliko večje vrednosti v primerjavi z diacetilom, ki velja za njegovega prekurzorja (Slika 19). Kot smo že navedli, lahko acetoin izvira tudi iz α -acetolaktata (McSweeney in Sousa, 2000). Tako diacetil kot tudi acetoinu je vsebnost zorenjem padala. Padajoči trend acetoina bi lahko podprli z dejstvom, da je prekurzor 2,3-butandiol (McSweeney in Sousa, 2000), ki smo ga tudi identificirali v Nanoškem siru.



Slika 19: Primerjava trendov vsebnosti (povprečje $\pm$ standardna napaka) diacetila in acetoina v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah

Figure 19: Comparison of trends of diacetyl and acetoin content (mean $\pm$ standard error) in Nanos cheese during ripening in both seasons

2-HIDROKSI-3-PENTANON

V poletni in zimski sezoni je bil 2-hidroksi-3-pentanon prisoten že v sirnini. V obeh sezonah je v vzorcih Nanoškega sira dosegel maksimalno vsebnost 7. dan zorenja, nato pa je začela njegova vsebnost upadati. Vpliv sezone je bil statistično značilen (Preglednica 12). V poletni sezoni je dosegel večje vsebnosti in je bil prisoten do 99. dneva zorenja, medtem ko je bil v zimski sezoni prisoten do 63. dneva zorenja.

V literaturi le redko naletimo nanj kot na HOS, prisotno v proučevanih sirih, so ga pa identificirali v siru mocarela (Curioni in Bosset, 2002) ter v poltrdem kozjem siru (Poveda

in sod., 2008). Za njegovo tautomero 3-hidroksi-2-pentanon Alewijn (2006) navaja, da naj bi izvirala iz ogljikovodikov in proteinov.

2,3-HEPTADION

Centeno in sod. (2004) navajajo, da naj bi v siru na odsotnost 2,3-heptadiona vplivala toplotna obdelava mleka, verjetno zaradi manjšega vpliva nestarterske mikrobiote. 2,3-butandion so namreč identificirali le v sirih iz surovega mleka, kot SK pa so bile dodane bakterije *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in *Lc. lactis* subsp. *lactis strains*. Fernández-García (2002a) pa še v svoji študiji še ugotavlja, da je bilo tega diketona več v siru iz surovega mleka in da vpliv zorenja zanj ni bil statistično značilen. V našem primeru je bil prisoten samo v sirnini iz poletne sezone. Povezav s krmo in mlekom ne moremo izpostaviti, saj ni bil identificiran v nobenem od vzorcev osnovne krme in mleka.

2-PENTANON

2-pentanon je metil keton in nastane v β -oksidaciji prostih MK. Njegova tvorba je torej odvisna od lipolize in katabolizma MK (Choisy in sod., 2000b).

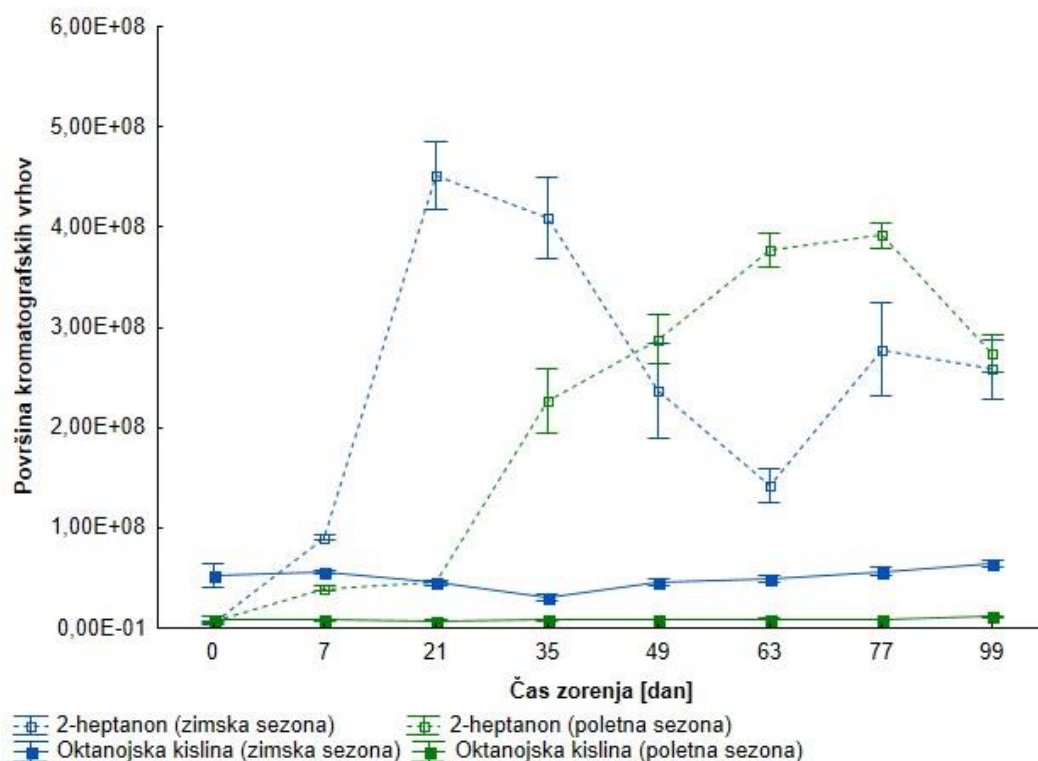
Na začetku zorenja je imel 2-pentanon nekoliko večje vsebnosti v vzorcih Nanoškega sira v zimski sezoni, večje vsebnosti pa je v zimski sezoni dosegel tudi v vzorcih mleka. Kljub temu pa je v siru nato dosegel večje vrednosti v poletni sezoni. Identificiran je bil tudi v obeh osnovnih krmah, vendar med sezonama ni bilo razlik. V siru je njegova vsebnost najprej naraščala ter nato v obeh sezonah 77. dan zorenja padla. Po 99. dnevu zorenja pa je ponovno narasla. Povezave med 2-pentanonom ter njegovim prekurzorjem heksanojsko kislino nismo opazili. V nasprotju z 2-pentanonom je imela heksanojska kislina večjo vsebnost v zimski sezoni. Poleg tega se pri heksanojski kislini z zorenjem jasno odraža naraščajoči trend vsebnosti.

2-HEPTANON

2-heptanon izvira iz maščobe (Alewijn, 2006) ter nastane v β -oksidaciji oktanojske kisline (Choisy in sod., 2000b). Ugotovili smo, da je 2-heptanon dosegel največje vsebnosti v zimski sezoni, kakor tudi njegov prekurzor oktanojska kislina (Slika 20). Kot smo že navedli, je 2-heptanon med vsemi identificiranimi ketoni dosegel visoke vsebnosti. Na nastanek 2-heptanona naj bi vplivale plesni iz rodu *Penicilium*, poleg tega je zato tudi značilna spojina v sirih z modro plesnijo. 2-heptanon pa so tudi že identificirali v različnih trdih sirih (gauda, čedar) (Alewijn, 2006). Večjo količino 2-heptanona so odkrili v parmezanu (Parmigiano-Reggiano) (Collins in sod., 2003). Navajajo ga tudi kot pomembno spojina ementalnega sira (Curioni in Bosset, 2002).

Sam 2-heptanon (metil keton) pa je prekurzor za 2-heptanol (sekundarni alkohol) (Delgado in sod., 2011). Trend vsebnosti obeh komponent je natančneje opisan v podpoglavju

4.3.1.2.3 Alkoholi. Ugotovili smo, da naj bi bila 2-heptanol in 2-heptanon v nekakšnem ravnotežju.



Slika 20: Vsebnost (povprečje ± standardna napaka) 2-heptanona in oktanojske kisline (prekursor 2-heptanona) v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah

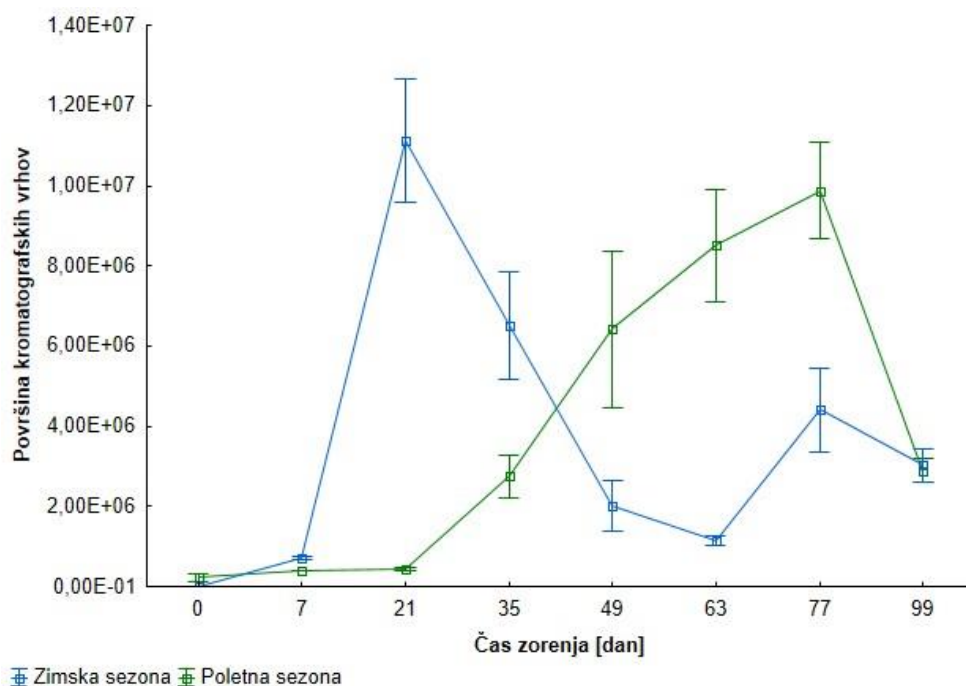
Figure 20: The content (mean ± standard error) of 2-heptanone and octanoic acid (precursor of 2-heptanone) in Nanos cheese during ripening in both seasons

2-OKTANON

2-oktanon je značilna spojina sirov z modro plesnijo (Berezińska in sod., 2007), poleg tega pa je tudi pogosta HOS trdih sirov (grojer, Manchago, Regusano, gauda) (Mallia in sod., 2005; Van Leuven, 2008).

Tako kot drugi metil ketoni 2-pentanon izvira iz maščobe in nastane na enak način kot 2-heptanon (Choisy in sod., 2000b; Alewijn, 2006). V zimski sezoni je dosegel svoj maksimum 21. dan zorenja, sledil je padajoči trend do 63. dneva ter nato ponovno naraščal do 77. dneva, medtem ko je v poletni sezoni dosegel svoj maksimum šele 77. dan zorenja, nato je njegova vsebnost do 99. dneva padala (Slika 21).

Povezav s krmo in mlekom ne moremo nakazati, saj ga v mleku nismo uspeli identificirati, medtem ko je bil v osnovni krmi prisoten samo v travni silaži.



Slika 21: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) 2-oktanona v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah

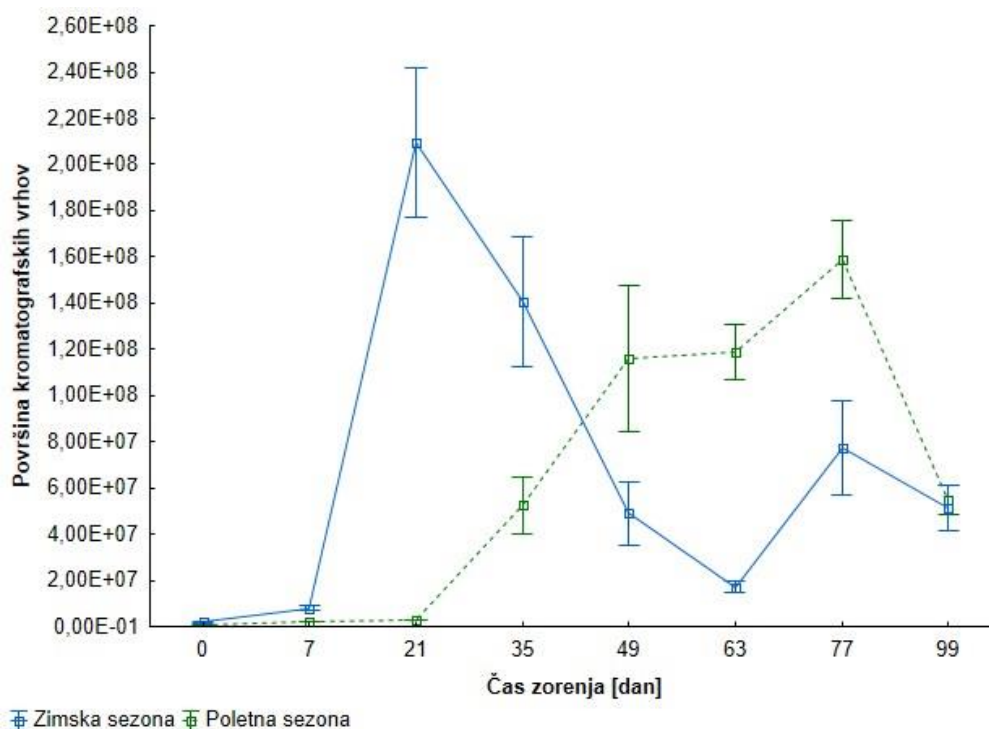
Figure 21: The content (mean $\pm$ standard error) of 2-octanone in Nanos cheese during ripening in both seasons

2-NONANON

2-nonanon večkrat omenjajo skupaj z 2-heptanonom kot enega bolj zastopanih metil ketonov v sirih z modro plesnijo (Collins in sod., 2003). Tako kot metil ketona 2-heptanon in 2-oktanon je imel podoben trend vsebnosti po sezonah in sicer je imel v zimski sezoni dva vrha z največjo doseženo vsebnostjo 21. dan zorenja, v poletni sezoni pa se njegova vsebnost povečuje do 77. dneva zorenja in nato pade (Slika 22). Vpliv sezone ni bil statistično značilen (Preglednica 12).

Povezav z njegovim prekursorjem dekanojsko kislino nismo posebej ugotovili, razen da je imel 2-nonanon, tako kot dekanojska kislina, svoj maksimum večji v zimski sezoni, ki pa ga je keton dosegel prej kot dekanojska kislina. To bi lahko razložili s tem, da nastanejo metil ketoni tudi iz keto kislin (Fox in sod., 2000).

2-nonanon smo identificirali tudi v nekaterih vzorcih mleka, vendar pa razlike v vsebnosti med sezonama niso bile statistično značilne.



Slika 22: Vsebnost (povprečje ± standardna napaka) 2-nonanona v Nanoškem siru med zorenjem v obeh sezonah

Figure 22: The content (mean ± standard error) of 2-nonanone in Nanos cheese during ripening in both seasons

2-UNDEKANON

Metil keton 2-undekanon izvira iz maščobe (Alewijn, 2006) in je pomembna aromatična spojina v siru kamember, nastal naj bi zaradi aktivnosti *P. camemberti* (Curioni in Bosset, 2002). Poleg tega, da je bil identificiran v sirih z modro plesnijo, so ga v manjših količinah našli tudi v nekaterih trdih sirih. Njegova vsebnost pa se je z zorenjem povečevala (Alewijn, 2006). V našem primeru v obeh sezonah trend naraščanja vsebnosti 2-undekanona ni bil konstanten. Večje vsebnosti je v vzorcih Nanoškega sira dosegel v poletni sezoni, njegove prisotnosti pa nismo potrdili niti v osnovnih krmah niti v mleku.

METIL KETONI – SPLOŠNO

Za identificirane metil ketone 2-pentanon, 2-heptanon, 2-oktanon, 2-nonanon, 2-undekanon se je vsebnost na začetku zorenja povečevala in se nato spreminjala, in sicer predvsem v zimski sezoni. Pri 2-oktanonu in 2-nonanonu smo opazili, da sta imela podobna trenda (Slika 21, Slika 22). Omenili smo že, da nastanejo metil ketoni v oksidaciji prostih MK (McSweeney in Sousa, 2000). Velika količina metil ketonov je navadno v sirih s plesnijo ter tudi v nekaterih trdih tipih sirov (Verzera in sod., 2004), ki zorijo daljši čas, s

čemer lahko razložimo zgoraj naveden trend naraščanja. Vsebnost metil ketonov je tudi padala. To lahko navežemo z dejstvom, da so metil ketoni prekurzorji za sekundarne alkohole (Delgado in sod., 2011).

6-METIL 5-HEPTEN-2-ON

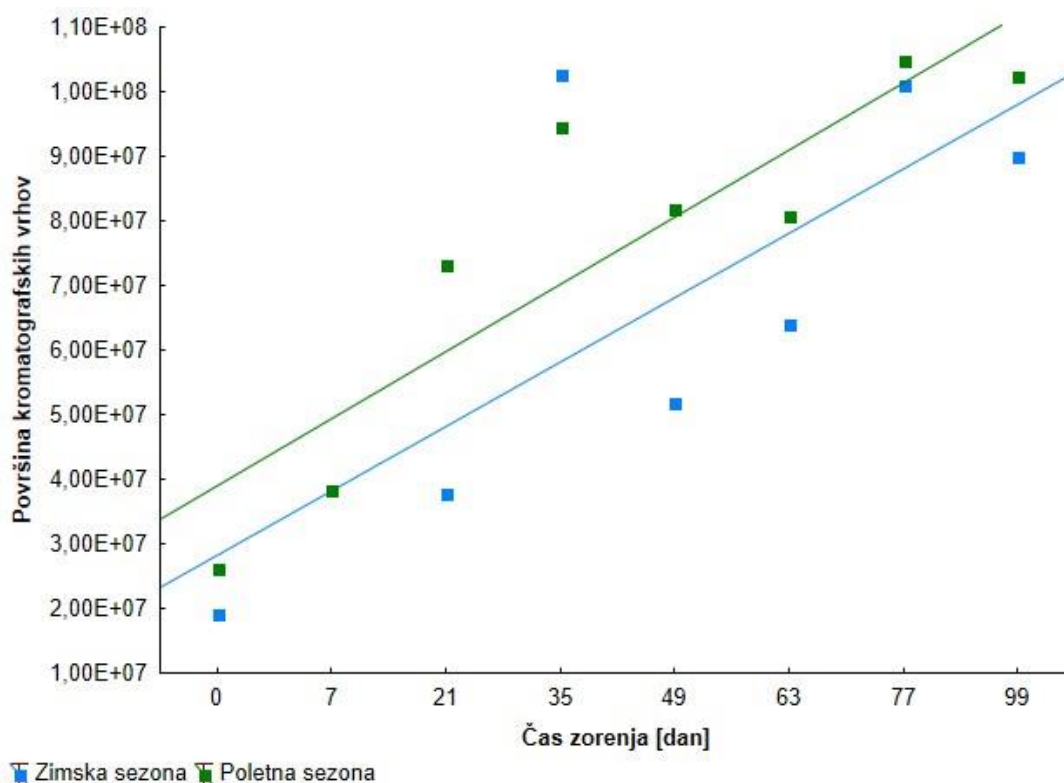
6-metil 5-heptan-2-on je bil prisoten samo v sirnini poletne sezone. Identificirali smo ga tudi v osnovnih krmah iz obeh sezon, vendar povezav s krmo in prisotnostjo v siru nismo ugotovili. V literaturi ga le redko navajajo kot HOS v siru. Njegovo prisotnost v siru opisujejo Sympoura in sod. (2009).

8-NONEN-2-ON

Nenasičen keton 8-nonen-2-on ima izvor v maščobi (Alewijn, 2006). V vzorcih Nanoškega sira poletne sezone je dosegel večje vrednosti, nismo pa ga identificirali v nobenem od vzorcev osnovne krme oz. mleka.

4.3.1.2.3 Alkoholi

Delež alkoholov se je v obeh sezonah v primerjavi z začetnim deležem v sirnini po 99 dnevih zorenja povečal (Priloga I). Splošen trend skupne vsebnosti alkoholov do 99. dneva zorenja je bil med sezonama skoraj enak (Slika 23). Večje vsebnosti alkoholov je opaziti v poletni sezoni. Maksimalna koncentracija alkoholov je v obeh sezonah dosegla vrh po 6 mesecih zorenja.



Slika 23: Trend skupne vsebnosti alkoholov v vzorcih Nanoškega sira do 99. dneva zorenja v obeh sezonah

Figure 23: Trend of the total content of alcohols in samples of Nanos cheese to 99th day ripening in both seasons

V Nanoškem siru smo v obeh sezonah identificirali 10 različnih alkoholov, od katerih sta bila samo 1-heksanol in 2-etil 1-heksanol prisotna med zorenjem tako v poletni kot zimski sezoni. Skupna vsebnost alkoholov je bila večja v poletni sezoni (Priloga I), vendar pa nismo našli pomembnih povezav s krmo ali mlekom.

Med alkohole, ki so imeli v poletni sezoni večje koncentracije, bi lahko uvrstili 2-pentanol in 2-heptanol. Oba sta dosegla svoj vrh po 6 mesecih zorenja, v primerjavi z ostalimi alkoholi pa sta dosegla visoke vrednosti tudi 99. dan zorenja. Poleg njiju je dosegel visoko vsebnost v poletni sezoni tudi 2,3-butandiol v 35. dnevu zorenja, ki je bila hkrati maksimalna.

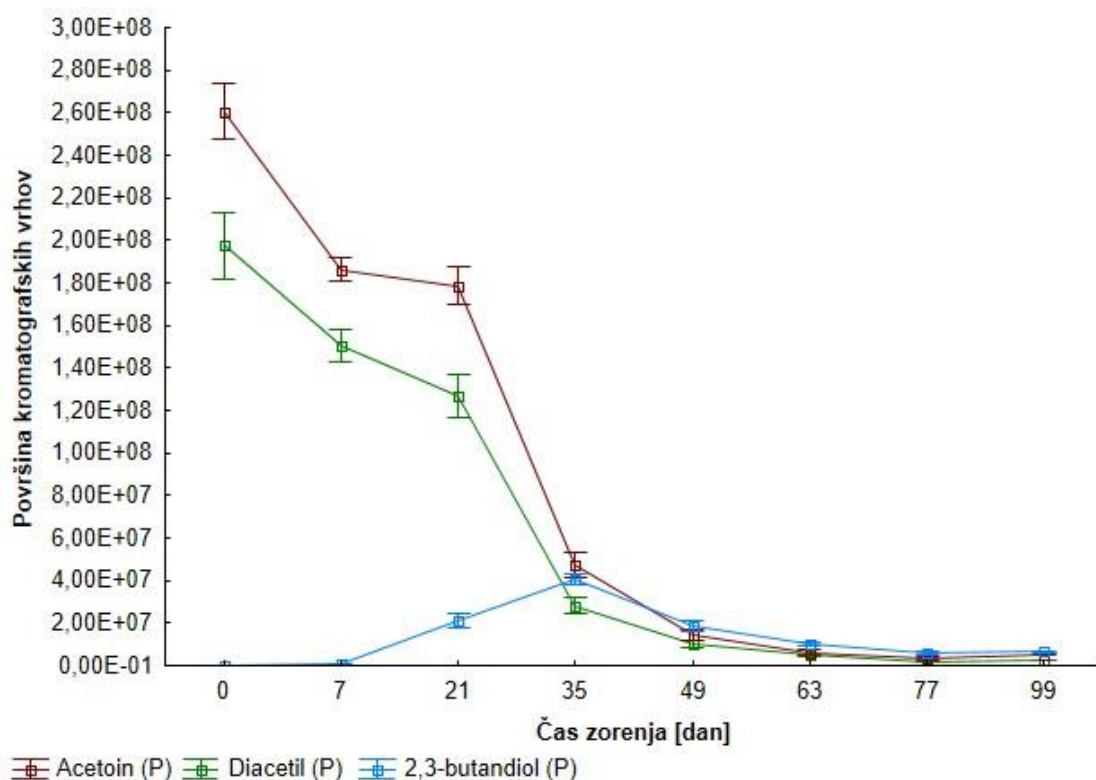
V obeh sezonah je 2-heptanol dosegel nekoliko večje koncentracije v primerjavi z 2-nonanolom. To bi lahko razložili z večjo koncentracijo 2-heptanona (prekurzor 2-heptanola) v primerjavi z 2-nonanom (prekurzor 2-nonanola).

2,3-BUTANDIOL (ter povezava z ACETOINOM in DIACETILOM)

2,3-butandiol nastaja iz citrata, ker imajo nekateri laktokoki sposobnost metabolizirati citrat v 2,3-butandiol. Ena od poti nastanka 2,3-butandiola je metabolizem citrata v

diacetil, ki se nato pretvori v acetoin. Iz acetoina nato nastane 2,3-butandiol. Ta pa lahko nastane tudi po drugi krajši poti: citrat $\Rightarrow$ acetoin $\Rightarrow$ 2,3-butandiol (McSweeney in Sousa, 2000).

Kot prikazuje Slika 24, sta vsebnosti acetoina in diacetila med zorenjem v poletni sezoni eksponentno padali, je pa acetoin dosegal večje vrednosti v primerjavi z diacetilom. Acetoin namreč lahko nastane po različnih poteh, medtem ko se diacetil pretvarja iz citrata v acetoin. Trend padanja teh HOS bi lahko ovrednotili z nastankom 2,3-butandiola. Sezona na vsebnost HOS acetoina, diacetila in 2,3-butandiola ni imela statistično značilnega vpliva (Preglednica 12). Vsebnost 2,3-butandiola je naraščala do 35. dneva zorenja, ko so tudi vsebnosti vseh treh HOS dosegle podobne vrednosti. V 49. dnevu zorenja je 2,3-butandiolu koncentracija padla, saj se ta alkohol lahko pretvarja v keton 2-butanon (Keen in sod., 1974).



Slika 24: Primerjava vsebnosti (povprečje $\pm$ standardna napaka) acetoina, diacetila ter 2,3-butandiola med zorenjem Nanoškega sira v poletni sezoni (P)

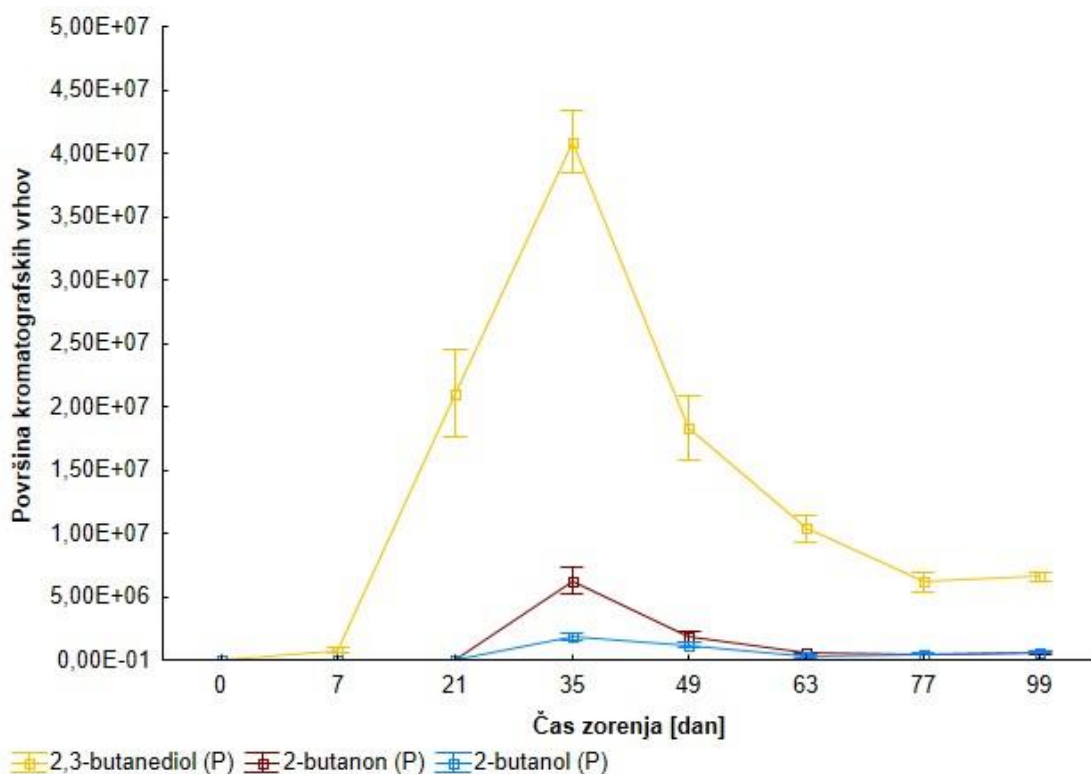
Figure 24: Comparison of trends of acetoin, diacetyl and 2,3-butanediol content (mean $\pm$ standard error) during ripening Nanos cheese in the summer season

V nasprotju s poletno sezono po 6 mesecih zorenja v zimski sezoni 2,3-butandiola, acetoina in diacetila nismo identificirali.

2-BUTANOL

Alkohol 2-butanol povezujejo z razvojem nezaželenne arome v sirih. Nastane v treh korakih iz 2-butanona pod vplivom delovanja različnih bakterij. V prvem koraku nastane najprej 2,3-butandiol, ki se nato pretvori v 2-butanon (McSweeney, 2004). Temu nato sledi redukcija 2-butanona v 2-butanol (Keen in sod., 1974).

V poletni sezoni smo v Nanoškem siru tako 2-butanol kot tudi njegovega možnega prekursorja-2-butanon identificirali šele 35. dan. 2,3-butandiol (prekursor 2-butanona) pa smo v poletni sezoni identificirali 7. dan zorenja (Slika 25 in Priloga G). Poleg tega so vse tri navedene HOS dosegle maksimalno vrednost 35. dan zorenja, s tem da je 2,3-butandiol dosegel najvišje vrednosti. Lahko bi zaključili, da je trend 2-butanola sledil trendu 2-butanona, ta pa je sledil 2,3 butandiolu (Slika 25).



Slika 25: Trend vsebnost (povprečje ± standardna napaka) 2,3-butandiola, 2-butanona in 2-butanola med zorenjem Nanoškega sira v poletni sezoni (P)

Figure 25: Trend of 2,3-butanediol, 2-butanone and 2-butanol content (mean ± standard error) during ripening Nanos cheese in the summer season

V poletni sezoni se je 2-butanol v večji količini pojavil od 35. dneva naprej, v zimski pa nekoliko kasneje, in sicer na 49. dan (Priloga G, Priloga H). 2-butanol je v Nanoškem siru dosegel največje vrednosti v poletni sezoni, kljub temu da je bil v mleku prisoten samo v vzorcih iz zimske sezone.

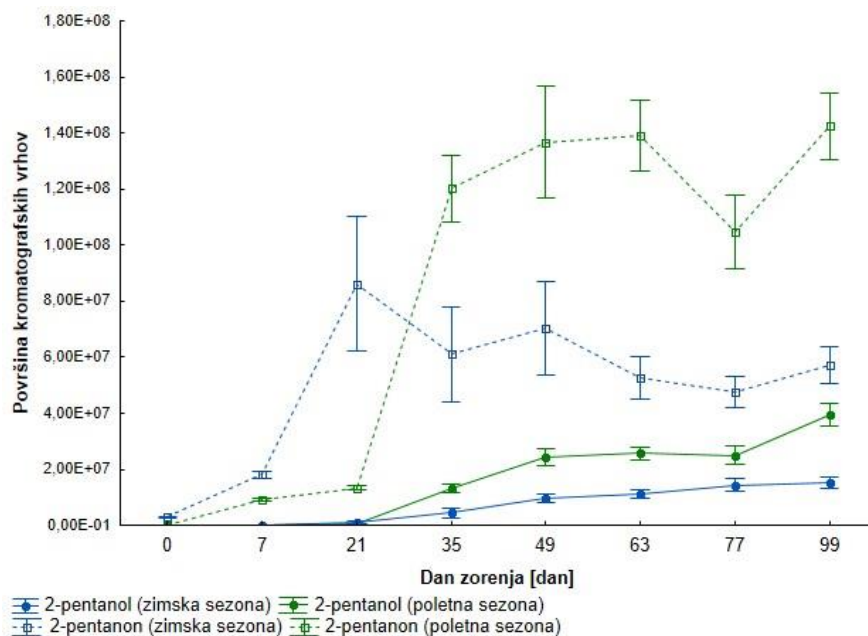
1-BUTANOL

1-butanol je eden izmed najbolj aromatičnih alkoholov in ima noto po vrtnici (Curioni in Bosset, 2002). Proizvajajo ga tudi nekateri sevi nestarterskih MKB (Randazzo in sod., 2007). Večje vsebnosti tega alkohola je opaziti v Nanoškem siru v poletnih sezoni. Tudi Abilleira in sod. (2010b) so ugotovili, da je večje vsebnosti dosegel v poletni sezoni, ki je vključevala pašo krav. V našem primeru ga v sveži travi nismo identificirali, v vzorcih mleka pa je bil prisoten le v zimski sezoni. Abilleira in sod. (2010b) še navajajo, da bi 1-butanol lahko nastal pri redukciji aldehydov.

2-PENTANOL

V obeh sezonah je vsebnost 2-pentanol naraščala in je dosegla maksimalne vrednosti ob koncu 99. dneva zorenja Nanoškega sira. Podobno pišejo v svoji študiji tudi Delgado in sod. (2011), da je bil 2-pentanol ob koncu 90-dnevnega zorenja proučevanega trdega sira alkohol z največjo vsebnostjo. 2-pentanol bi lahko pomembno prispeval h končni aromi sira saj ima pri človeku tudi nizek prag zaznavnosti (Delgado in sod., 2011).

Alkohol 2-pentanol izvira iz maščobe (Alewijn, 2006). Glede na to, da gre za sekundarni alkohol bi njegov nastanek lahko povezali z redukcijo metil ketonov (Delgado in sod., 2011). V poletni sezoni je alkohol dosegel večje vrednosti, poleg tega je takrat večje vrednosti dosegel tudi njegov prekurzor 2-pentanon (Slika 26). V osnovni krmi in mleku ga nismo identificirali.



Slika 26: Vsebnost (povprečje ± standardna napaka) 2-pentanol in 2-pentanona med zorenjem Nanoškega sira v obeh sezonah

Figure 26: The content (mean ± standard error) of 2-pentanol and 2-pentanone during ripening Nanos cheese in both seasons

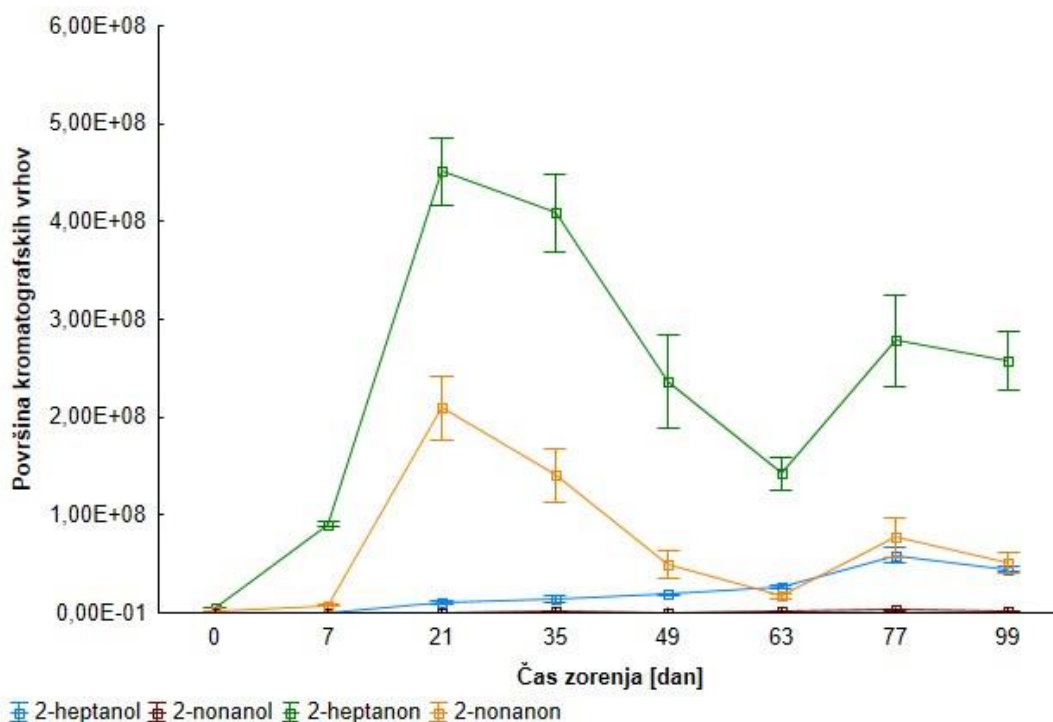
2-HEPTANOL IN 2-NONANOL

Tako 2-heptanol kot tudi 2-nonanol sta imela v obeh sezonah med zorenjem podobna trenda vsebnosti, in sicer povečevanje do 77. dne zorenja in nato padec. Sezona ni bila statistično značilna za ta dva sekundarna alkohola kot tudi za njuna prekursorja metil ketona 2-heptanon in 2-nonanon (Preglednica 12).

V obeh sezonah je 2-heptanol dosegel nekoliko večje vrednostni v primerjavi z 2-nonanolom. To bi lahko utemeljili z večjimi vrednostmi njegovega prekursorja 2-heptanona v primerjavi z 2-nonanonom (prekursor 2-nonanola) (Curioni in Bosset, 2002).

V zimski sezoni sta imela alkohola kot njuna prekursorja ketona podobna trenda, medtem ko sta v zimski sezoni prekursorja (2-heptanon, 2-nonanon) dosegla svoj maksimum veliko prej, in sicer že 21. dan zorenja v primerjavi z alkoholoma (Slika 27).

V krmi in mleku ju nismo identificirali.



Slika 27: Vsebnost (povprečje ± standardna napaka) 2-heptanola in 2-nonanola ter njunih prekursorjev med zorenjem Nanoškega sira v zimski sezoni

Figure 27: The content (mean ± standard error) of 2-heptanol and 2-nonanol and their precursor during ripening Nanos cheese in the winter season

3-METIL 1-BUTANOL

Primarni razvejani alkohol 3-metil 1-butanol izvira iz proteinov (Alewijn, 2006). Spada med Streckerjeve komponente in lahko nastane v katabolizmu razvejanih AK (McSweeney in Sousa, 2000). Randazzo in sod. (2007) v svoji študiji pišejo, da verjetno izvira iz določenih AK (alanina, valina in leucina) ter povezujejo njegov nastanek s prisotnostjo in aktivnostjo nekaterih sevov laktobacilov. Natančneje naj bi nastal iz aldehida, ki nastane s pretvorbo leucina. Identificirali so ga tudi že v drugih trdih in poltrdih sirih, v katerih naj bi prispeval k prijetni aromi svežega sira (Engels in sod., 1997). Po drugih podatkih pa naj bi prispeval k nečisti aromi sira (McSweeney in Sousa, 2000).

Vpliv sezone pri tej HOS ni bil statistično značilen. Trend vsebnosti 3-metil 1-butanola kaže na naraščanje do 35. dneva zorenja in nato padec. 3-metil 1-butanol smo identificirali tudi v obeh osnovnih krmah, kjer je dosegal večje vrednosti v travni silaži. V mleku razlike niso bile statistično značilne.

1-HEKSANOL

Vsebnost 1-heksanola se je z zorenjem povečevala, kar bi lahko razložili z dejstvom, da ima izvor v prostih MK, ki se med zorenjem pretvarjajo v druge snovi (Alewijn, 2006). Tudi Fernández-García in sod. (2002a) poročajo o značilno naraščajočem trendu vsebnosti 1-heksanola med zorenjem sira, medtem ko so Petersen in sod. (2010) ugotovili, da tudi dodatek nekaterih sevov *Lb. helveticus* (pri Nanoškem siru dodan kot SK) vpliva na večjo vsebnost 1-heksanola v siru. V drugi študiji pa so ugotovili prisotnost 1-heksanola v siru, ki so mu v procesu izdelave dodali *Lb. casei* ter tudi v siru brez teh MKB (Kourkoutas in sod., 2006).

V našem primeru je bilo vse od začetka zorenja Nanoškega sira 1-heksanola več v zimski sezoni. Primarni alkoholi nastanejo tudi v redukciji aldehydov (McSweeney in Sousa, 2000). Poleg stimulacije nastanka s pomočjo SK je ena izmed možnosti torej tudi, da je nastajal iz heksanala, ki ga je bilo v mleku iz zimske sezone več.

2-ETIL 1-HEKSANOL

2-etil 1-heksanol je primarni razvejani alkohol in izvira iz maščobe. Identificirali so ga že v različnih sirih kot so čedar (Alewijn, 2006), parmezan (Barbieri in sod., 1994) in mocarela (Curioni in Bosset, 2002).

V obeh sezonah je bil 2-etil 1-heksanol prisoten ves čas zorenja Nanoškega sira, večje vrednosti je dosegel v zimski sezoni. Identificirali smo ga tudi v mleku iz obeh sezon, vendar pa povezav glede količine alkohola v mleku na njegovo vsebnost v siru ne moremo potrditi.

2-METIL 3-PENTANOL

2-metil 3-pentanol smo identificirali samo v siru in sicer v obeh sezonah. Na to komponento je bil vpliv zorenja statistično značilen in je pojasnil velik del variabilnosti (Preglednica 12, Preglednica 13). Tudi vpliv sezone je bil statistično značilen in sicer smo v poletni sezoni opazili večje vrednosti. Zanimivo, da smo ta alkohol v obeh sezonah identificirali do 35. dneva zorenja ter je v obeh sezonah dosegel maksimalno vrednost 7. dan zorenja. Iz tega bi lahko sklepali, da je 2-metil 3-pentanol najverjetneje nekakšen prekursor drugim spojinam.

4.3.1.2.4 Estri

V Nanoškem siru smo identificirali 9 estrov, od katerih smo metil ester oktanojske kisline in etil ester dekanajske kisline identificirali samo v zimski sezoni (Priloga G, Priloga H).

Med pomembnejše aromatične HOS v sirih prištevamo etil estre karbonilnih kislin kot so etil ester očetne kisline, etil ester butanojske kisline, etil ester oktanojske kisline ter etil ester heksanojske kisline (Singh in sod., 2003). Naštete estre smo identificirali tudi v Nanoškem siru, največ pa je bilo etil estra butanojske kisline in etil estra heksanojske kisline. Podobne ugotovitve navajajo tudi Wolf in sod. (2010), in sicer da sta bila v siru Grana Padano to prevladujoča estra s pomembno vlogo pri oblikovanju arome sira. V Nanoškem siru je večina estrov dosegla maksimalne vrednosti po 6. mesecu zorenja. Tudi do 99. dneva se kaže trend naraščanja za skupno vsebnost estrov. Omenili smo že, da estri nastajajo med zorenjem (McSweeney, 2004), kar se je pokazalo tudi v našem primeru, saj se je skupna vsebnost estrov v obeh sezonah povečevala z zorenjem Nanoškega sira (Priloga I). Do 99. dneva je večjo vrednost dosegla v zimski sezoni. V obeh sezonah je bilo največ etil estra butanojske kisline. Poleg tega je bilo največ tudi njegovega prekursorja - butanojske kisline (najobsežnejša med vsemi identificiranimi MK). To potrjuje dejstvo, da nastanejo estri tudi z esterifikacijo prostih MK in alkoholov (Gioacchini in sod., 2010). Na nastanek estrov naj bi vplivale različne esteraze raznih MKB, med drugim tudi *Lb. helveticus* (Aminifar in sod., 2014).

Znano je, da je vsebnost etil estrov odvisna od vsebnosti prostih MK (Liu in sod., 1998; Mallia in sod., 2005). Pri Nanoškem siru smo to opazili za estre kot etil ester butanojske kisline, etil ester heksanojske kisline in etil ester očetne kisline ter njihove prekursorje.

ETIL ESTER OCETNE KISLINE

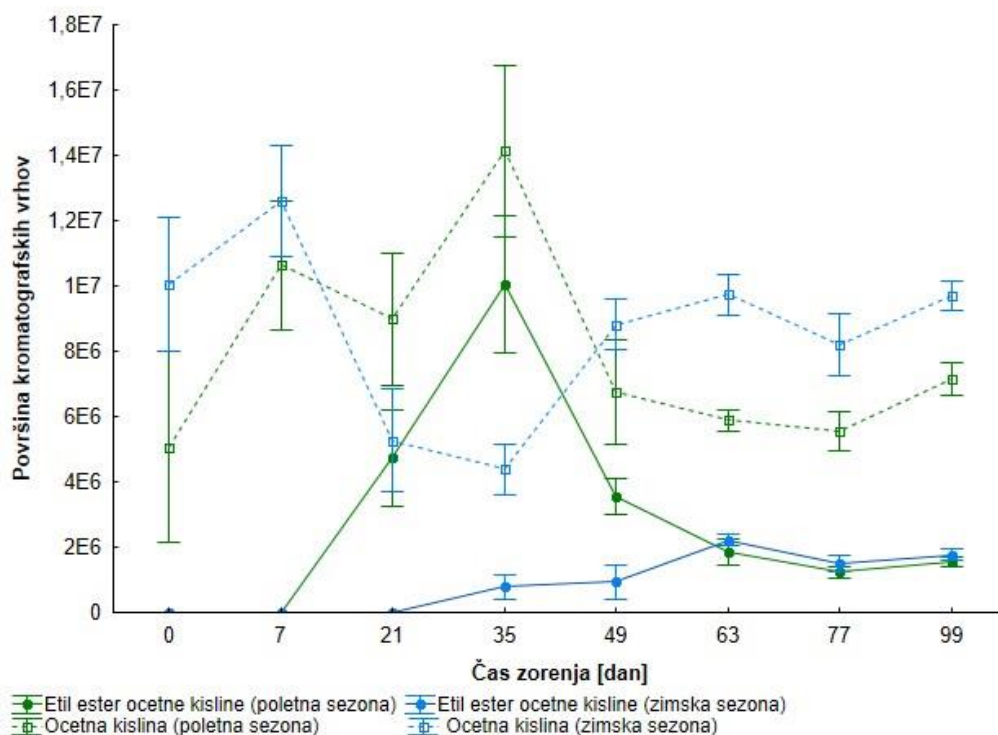
Etil ester očetne kisline (etil acetat) smo v vzorcih Nanoškega sira v poletni sezoni identificirali 21. in v zimski sezoni 35. dan zorenja. Ta ester izvira iz ogljikovodikov (Alewijjn, 2006), je namreč ester etanola in očetne (etanojske) kisline, ki nastane v metabolizmu laktata (Delgado in sod., 2011). V poletni sezoni je dosegel etil ester očetne kisline maksimalno vrednost 35. dan zorenja. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi

Delgado in sod. (2011), ko so med 90-dnevnim spremljanjem zorenja kozjega sira zaznali maksimalno vsebnost etil estra očetne kisline 30. dan zorenja.

V Nanoškem siru je v obeh sezonah etil ester očetne kisline od dneva pojava sledil trendu vsebnosti očetne kisline (Slika 28). Lahko bi torej trdili, da je na koncentracijo tega estra vplivala koncentracija očetne kisline.

Liu in sod. (2004) povezujejo vsebnost etil estra očetne kisline pri ementalnem siru z aromo po oreških, ki naj bi jo po nekaterih podatkih imel tudi Nanoški sir (Rondič, 1996).

Etil ester očetne kisline smo identificirali v obeh osnovnih krmah, vendar se vsebnost med sezonama ni razlikovala. Poleg tega smo ta ester identificirali tudi v mleku iz poletne sezone. V Nanoškem siru je v poletni sezoni imel etil ester očetne kisline sicer večje vrednosti, vendar ga v sirnini nismo zaznali.



Slika 28: Vsebnost (povprečje $\pm$ standardna napaka) etil estra očetne kisline in prekursorja-očetne kisline med zorenjem Nanoškega sira v obeh sezonah

Figure 28: Trend of octanoic acid, ethyl ester content (mean $\pm$ standard error) and its precursor-acetic acid during ripening of Nanos cheese in both seasons

ETIL ESTER BUTANOJSKE KISLINE

Etil estru butanojske kisline pripisujejo pomembno vlogo pri oblikovanju arome v različnih trdih tipih sirov (Curioni in Bosset, 2002), kar verjetno velja tudi v našem primeru. Glede

na njegovo visoko vsebnost v Nanoškem siru bi ga lahko uvrstili med pomembnejše aromatične snovi.

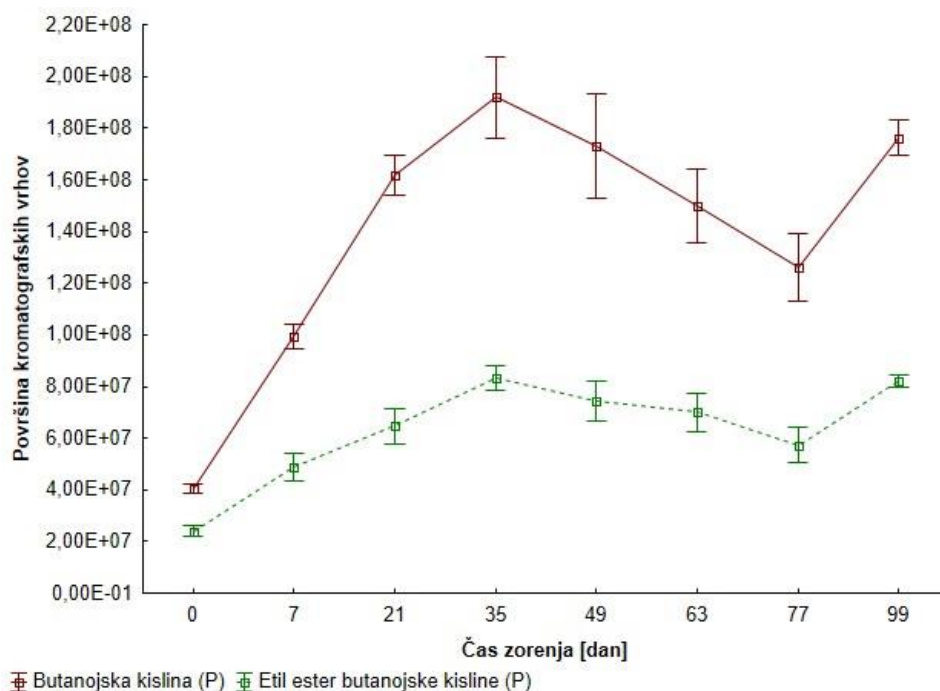
Dokazali so že, da k nastanku etil estra butanojske kisline s svojim delovanjem prispevajo tako starterske kot tudi nestarterske MKB, na njegovo vsebnost pa naj bi MKB vplivale zelo različno (Alewijn, 2006). Predvsem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* in *Str. thermophilus* naj bi pripomogla k večji vsebnosti etil estra butanojske kisline, pri njegovem nastanku pa sodelujejo tudi lipaze nekaterih vrst gliv (*Rhizomucor miehei*) in kvasovk (*Kluyveromyces lactis*), ki se nahajajo na površini sira ter nekatere plesni iz rodu *Penicillium* (Liu in sod., 2004).

Etil ester butanojske kisline izvira iz ogljikovodikov in maščob (Alewijn, 2006) in sicer nastane v esterifikaciji etanola in butanojske kisline (Liu in sod., 1998). Liu in sod. (2003) so ugotovili, da je ob dodatku komercialnih lipaz gliv ta ester nastal v esterifikaciji etanola in tributirina in ne iz butanojske kisline. Tributirin je ester butanojske kisline ter glicerola in izvira iz mlečne maščobe (Liu in sod., 2003).

Znano je, da k nastanku etil estra butanojske kisline pomembno prispeva *Str. thermophilus* (Liu in sod., 1998), ki je pri Nanoškem siru dodan kot SK. To je morda razlog, da smo prisotnost etil estra butanojske kisline potrdili že v sami sirnini v obeh sezonah.

Poleg tega trend vsebnosti etil estra butanojske kisline izrazito sledi trendu vsebnosti butanojske kisline, predvsem v poletni sezoni (Slika 29), iz česar bi lahko zaključili, da je njegov nastanek v Nanoškem siru močno povezan z esterifikacijo etanola in butanojske kisline.

Etil ester butanojske kisline smo identificirali v travni silaži ter v mleku iz obeh sezon. V obdobju krmljenja s travno silažo so bile v mleku koncentracije etil estra butanojske kisline nekoliko večje v primerjavi s pašno sezono. V siru kljub temu ni bilo opaziti pomembnih razlik med sezonama.



Slika 29: Vsebnost (povprečje ± standardna napaka) etil estra butanojske kisline in njegovega možnega prekursorja-butanojske kisline med zorenjem Nanoškega sira v poletni sezoni (P)

Figure 29: The content (mean ± standard error) of butanoic acid ethyl ester and its precursor-butanoic acid during ripening of Nanos cheese in the summer season

BUTIL ESTER OCETNE KISLINE

Butil ester ocetne kisline (butil acetat) nastane z esterifikacijo butanola in ocetne kisline, predvsem na račun aktivnosti nekaterih bakterij, ki izvirajo s površine sira (Gandolfi in sod., 2000). V vzorcih Nanoškega sira smo butil ester ocetne kisline identificirali po 6 mesecih zorenja v obeh sezonah. Tudi Abilleira in sod. (2010b) so identificirali ester po 6 mesecih zorenja v ovčjem siru iz surovega mleka, identificirali pa so ga tudi v nekaterih trdih sirih, kot so grojer in Regusano (Delgado in sod., 2011) ter parmezan (Barbieri in sod., 1994). Za te sire je značilno, da zorijo dlje časa, in sicer grojer 6 mesecev (Casey in sod., 2006), Regusano 4 mesece (Carpino in sod., 2004) ter parmezan 16–24 mesecev (Barbieri in sod., 1994).

1-BUTANOL 3-METIL ACETAT

1-butanol 3-metil acetat (3-metil butil ester ocetne kisline) smo identificirali šele po 99 dnevih zorenja. Deetae in sod. (2009) so identificirali ta ester v siru, ki je bil cepljen s *Proteus vulgaris* (bakterija iz rodu *Enterobacteriaceae*), ki so jo izolirali s površine skorje sira. Identificirali pa so ga tudi že v siru Grana Padano (Curioni in Bosset, 2002).

Na prisotnost tega estra v Nanoškem siru so morda vplivale bakterije na površini sira ter daljši čas zorenja. Seveda bi bilo potrebno opraviti natančnejše mikrobiološke analize sira.

ETIL ESTER HEKSANOJSKE KISLINE

Etil ester heksanojske kisline (etil heksanoat) je bil prisoten ves čas zorenja v obeh sezonah, njegova vsebnost pa je naraščala. Po vsebnosti je bil drugi pomembnejši ester. Tudi v primerjavi z drugimi HOS, ki smo jih identificirali v Nanoškem siru, je dosegel visoko koncentracijo. Glede na njegovo visoko vsebnost in dejstvo, da imajo etil estri nizek prag zaznavnosti (Curioni in Bosset, 2002), ga lahko ovrednotimo kot pomembnejšo HOS, ki oblikuje aromo Nanoškega sira. Prav tako Curioni in Bosset (2002) navajata, da je etil ester heksanojske kisline ključna HOS, ki oblikuje končno aromo v različnih trdih tipih sirov.

Etil ester heksanojske kisline izvira iz ogljikovodikov in maščobe (Alewijn, 2006). Dokazano je že bilo, da k nastanku etil estra heksanojske kisline prispevajo dodane MKB, med njimi tudi *Str. thermophilus* (Liu in sod., 2004). V primeru izdelave Nanoškega sira je sestavni del SK. *Str. thermophilus* vpliva na nastanek etanola (Liu in sod., 2004), ki sodeluje v esterifikaciji z MK in je pomemben dejavnik pri nastanku estrov (McSweeney, 2004).

Ester proizvaja tudi *Pseudomonas fragi*, ki spada med psihrotrofe. Njegova prisotnost v toplotno obdelanem mleku je lahko znak sekundarne kontaminacije (Liu in sod., 2004).

V zimski sezoni je po 99. dnevu zorenja Nanoškega sira dosegal večje vrednosti, kot tudi njegov prekurzor heksanojska kislina, kar nakazuje na odvisnost vsebnosti etil estra heksanojske kisline od MK. Poleg tega je bil prisoten le v vzorcih mleka iz zimske sezone, identificirali pa smo ga tudi v travni silaži, ne pa v sveži travi. Za to HOS bi lahko nakazali vpliv krme na njeno vsebnost v siru.

METIL ESTER OKTANOJSKE KISLINE

Metil ester oktanojske kisline je poleg 1-butanol 3-metil acetata edini metilni ester, ki smo ga identificirali v Nanoškem siru, prisoten pa je bil samo v zimski sezoni. Razen v nekaj osamljenih študijah, ki obravnavajo aromatičen profil ementalskega sira (Curioni in Bosset, 2002), sira z modro plesnijo (Alewijn, 2006) ter kozjega sira (Delgado in sod., 2011) je metil ester oktanojske kisline redko navajan.

Ester izvira iz maščob (Alewijn, 2006) in je rezultat esterifikacije metil alkohola in MK (Cakmakci in sod., 2012).

ETIL ESTER OKTANOJSKE KISLINE

Tako etil ester oktanojske kisline kot tudi njegov prekurzor – oktanojska kislina sta bila prisotna ves čas zorenja z večjimi vsebnostmi v zimski sezoni. Po vsebnosti spada etil ester oktanojske kisline med med manj pomembne estre, v primerjavi z metil estrom oktanojske kisline je dosegel večje vsebnosti. So pa prisotnost etil estra oktanojske kisline potrdili tudi v nekaterih drugih trdih tipih sirov, kot so Grana Padano, Parmigiano-Reggiano in čedar (Wolf in sod., 2010) ter ementalški sir (Curioni in Bosset, 2002).

V krmi tega estra nismo zaznali, v mleku med sezonama ni bilo razlik. Nakažemo lahko prehod iz mleka, poleg tega smo ester identificirali že v siru, ko je dosegel večje vrednosti v zimski sezoni.

ETIL ESTER DEKANOJSKE KISLINE

Razen redkih objav (Mallia in sod., 2005; Liu in sod., 2004) se etil ester dekanajske kisline ne pojavlja kot pomembnejša HOS v študijah, ki obravnavajo aromatske profile sirov.

Etil ester dekanajske kisline je bil v Nanoškem siru prisoten v zimski sezoni, poleg tega smo njegovo prisotnost potrdili le v travni silaži, kar je eden od možnih vplivov na njegovo prisotnost v siru iz zimske sezone. V mleku v nobeni od sezon etil estera dekanajske kisline nismo identificirali.

Na njegovo prisotnost v zimski sezoni je morda vplivala tudi večja vsebnost njegovega prekursorja dekanajske kisline v zimski sezoni.

4.3.1.2.5 Aldehidi

Trend skupne vsebnosti aldehydov je bil v obeh sezonah podoben (Priloga I), ko se je njihova vsebnost do 7. dneva zorenja povečevala, nato pa zmanjševala. To bi lahko pojasnili z dejstvom, da se lahko aldehydi hitro reducirajo do primarnih alkoholov ali se oksidirajo do določenih kislin (Curioni in Bosset, 2002). Vsebnost aldehydov je bila večja v zimski sezoni. Delež skupne vsebnosti aldehydov v primerjavi z ostalimi skupinami je bil ves čas zorenja zelo nizek in sicer poleti 0,84–4,58 %, pozimi pa 1,18–4,71 % (Priloga I). Tudi Gioacchini in sod. (2010) so ugotovili, da so aldehydi dosegli zelo nizek delež (8 %) v primerjavi z ostalimi spojinami v trdem siru »Fossa«.

V Nanoškem siru smo identificirali 9 aldehydov, po vsebnosti pa so bili najpomembnejši benzaldehid, heptanal, oktanal ter nonanal. Vpliv sezone je bil statistično značilen pri 5 aldehydih. Znano je, da lahko s prehrano bolj vplivamo na vsebnost in sestavo mlečne maščobe kot pa na vsebnost beljakovin (Cornu in sod., 2009). Večina aldehydov, ki smo jih identificirali, ima izvor v maščobah (heksanal, heptanal, oktanal, nonanal, 2-nonanal, dekanal). Glede na to, da je bila vsebnost MK večja v zimski sezoni in da nekateri aldehydi izvirajo iz MK, je morda to vplivalo tudi na večjo vsebnost aldehydov v zimski sezoni.

O vplivu sezone na vsebnost aldehydov v siru so poročali tudi (Fernández-García in sod. (2004b) ter Abilleira in sod. (2010b). V Nanoškem siru smo ugotovili večjo vsebnost oktanela in nonanala v siru iz zimske sezone ter opazili možno povezavo s krmo in mlekom.

3-METIL BUTANAL

3-metil butanal izvira iz proteinov (Alewijn, 2006), in sicer nastane iz AK leucin. V različnih tipih trdih sirov so ugotovili, da ima HOS 3-metil butanal pomembno vlogo pri

oblikovanju končne arome sira (Curioni in Bosset, 2002). V Nanoškem siru ga po 63. dnevu zorenja nismo več identificirali.

Kalač (2011) navaja razlike v vsebnosti 3-metil butanala v mleku kot posledica različnega načina krmljenja. V našem primeru vpliv sezone ni bil statistično značilen na vsebnost te HOS v siru.

HEKSANAL

Heksanal je bil prisoten le na začetku zorenja, in sicer do 21. dneva. Izvira iz maščobe (Alewijn, 2006). Van Leuven (2008) je heksanal identificiral tudi v siru gauda, kjer pa je bil prisoten tudi še po 10 mesecih zorenja.

V sirnini smo večjo vsebnost heksanala izmerili v poletni sezoni. Poleg tega je bil heksanal prisoten samo v krmi iz poletne sezone (sveža trava). Prisotnost heksanala v mleku glede na sezono ni bila statistično značilna. Kot smo že omenili, se aldehidi lahko hitro reducirajo do primarnih alkoholov ali oksidirajo do določenih kislin (Curioni in Bosset, 2002), kar se je v našem primeru najverjetneje zgodilo.

HEPTANAL

Heptanal izvira iz maščob (Alewijn, 2006). Nastane z razgradnjo nenasičenih MK, ki so prisotne že v mlečni maščobi (McSweeney in Sousa, 2000). Vpliv sezone ni bil statistično značilen, medtem ko je bil vpliv zorenja statistično značilen. V študiji Cornu in sod. (2009) navajajo, da noben od proučevanih vplivov, kot so prehrana, sezona in čas zorenja ni bil statistično značilen za vsebnost heptanala v siru.

V vzorcih mleka smo heptanal zaznali v obeh sezonah. Glede na to, da smo ga identificirali že ob začetku zorenja (v poletni sezoni že v sirnini), bi lahko nakazali prehod te komponente iz mleka.

OKTANAL

Oktanal izvira iz maščob (Alewijn, 2006). V zimski sezoni je dosegel večje vrednosti, kar lahko povežemo z dejstvom, da nastanejo nerazvejeni aldehidi v β -oksidaciji nenasičenih MK (Gioacchini in sod., 2010) oziroma z razgradnjo nenasičenih MK, ki so prisotne že v mlečni maščobi (McSweeney in Sousa, 2000).

V zimski sezoni je bila v siru vsebnost oktanala večja. Poleg tega je tudi v vzorcih mleka dosegel nekoliko višje vrednosti v zimski sezoni, vendar pa razlike niso bile statistično značilne (Preglednica 12). V krmi smo ga identificirali samo v travni silaži.

BENZALDEHID

Benzaldehid spada med zaželeno aromatične HOS, saj ima značilno aromo po grenkih mandljih (Singh in sod., 2003), izvira iz AK fenilalanina (Klein in sod., 2001; (Bourdat-Deschamps in sod., 2004). Ugotovili so, da nastanek benzaldehida stimulira tudi *L. lactis*

(Bourdat-Deschamps in sod., 2004) in nekateri sevi *Lb. helveticus* (Petersen in sod., 2010) oziroma njihovi intracelularni encimi (Klein in sod., 2001). Metabolno nastaja najprej s transaminacijo iz AK fenilalanina fenil piruvat, ki se nato oksidira do benzaldehida. Slednji se lahko oksidira tudi do benzojske kisline, ki pa ni aromatična spojina (Bourdat-Deschamps in sod., 2004). Singh in sod. (2003) še dodajajo, da izvira benzaldehid tudi iz AK triptofan. Vsebnost benzaldehida je od 7. dneva zorenjem padala. Podobno so v svoji študiji ugotovili tudi Randazzo in sod. (2010).

Povezav s preходом iz mleka ali krme ne moremo nakazati, saj je bil prisoten samo v vzorcih travne silaže.

NONANAL

Nonanal izvira iz maščob (Alewijn, 2006). Nastane z razgradnjo nenasičenih MK, ki so prisotne že v mlečni maščobi (McSweeney in Sousa, 2000). V siru je imel nonanal večje vrednosti v poletni sezoni, vendar pa je v siru v zimski sezoni dosegel nekoliko večje vrednosti. V krmi smo nonanal identificirali le v travni silaži. Poleg tega je imel večje vrednosti v mleku iz zimske sezone.

BENZENACETALDEHID

Benzenacetaldehid spada med HOS, ki so bile prisotne le občasno. Največjo vsebnost je dosegel po 6 mesecih zorenja v obeh sezonah. Jung in sod. (2013) pišejo, da so ga v siru identificirali šele po 3 mesecih zorenja ter predvidevajo, da bi njegova vsebnost še narasla z daljšim zorenjem. V Nanoškem siru je bil v zimski sezoni prisoten že 21. dan zorenja. Njegova vsebnost pa je po 6 mesecih precej narasla (npr. v zimski sezoni za 2,5-krat). Nekoliko drugačne rezultate o vsebnosti benzenacetaldehida v poltrdem tipu sira pa podajajo Delgado in sod. (2010), ko naj bi njegova vsebnost z zorenjem padala ter ga po 90 dneh zorenja ni bilo moč več identificirati. Prisotnost benzenacetaldehida so v trdem tipu sira potrdili tudi Mallia in sod. (2005).

V vzorcih mleka iz obeh sezon ga nismo identificirali, v krmi je bil prisoten le v travni silaži.

2-NONENAL

V vzorcih Nanoškega sira smo ga identificirali le v zimski sezoni v nekaterih dnevih zorenja (21., 49. in 77. dan), medtem ko njegove prisotnosti nismo potrdili ne v krmi ne v mleku iz obeh sezon.

Kot prisotno HOS v trdem siru ga navajajo tudi drugi avtorji (Curioni in Bosset, 2002; Frank in sod., 2004). 2-nonenal ima izvor v maščobah (Alewijn, 2006).

DEKANAL

Kot drugi nerazvejeni aldehidi tudi dekanal izvira iz maščob (Alewijn, 2006). V Nanoškem siru smo ga identificirali samo na nekatere dneve zorenja, in sicer v zimski sezoni le na 77. dan, v poletni sezoni pa na 7., 35., 63., 77., 99. dan ter po 6 mesecih zorenja.

4.3.1.2.6 Terpeni

V Nanoškem siru smo identificirali 6 terpenov, ki so bili večinoma prisotni ves čas zorenja v obeh sezonah. Med identificiranimi terpeni je bilo 5 monoterpenov (pinan, α -pinen, sabinen, limonen, p-cimen) ter en seskviterpen (β -kariofilen). Delež vsebnosti terpenov se je med zorenjem gibal med 0,39 in 4,12 %.

V Nanoškem siru le sabinena nismo zaznali v zimski sezoni. Terpene so identificirali že v sirih iz mleka živali, ki so zaužile različno krmo, kot so seno, travna silaža in koruzna silaža (Stefanon in Procida, 2004) in ne le v sirih iz mleka živali, ko so se te pasle (Zeppa in sod., 2004).

Vpliv sezone je bil statistično značilen pri vseh terpenih razen pri limonenu. V poletni sezoni so dosegali terpeni večje vsebnosti. Vsebnost terpenov v zimskem času je bila morda manjša zaradi dejstva, da sušenje krme zmanjšuje vsebnost terpenov (Tomba, 2005). Poleg tega na to vpliva dejstvo, da spravilo in paša ne potekata nujno v istem obdobju vegetacije. Znano je, da se vsebnost terpenov spreminja tudi med sezono (Tornambé in sod., 2006).

Kljub dejstvu, da terpeni izvirajo iz krme (Tornambé in sod., 2006) in da jih mikroorganizmi prisotni v siru, ne razgradijo (Tomba, 2005), vsebnost terpenov med zorenjem ni bila konstantna. Podobno so ugotovili tudi Randazzo in sod. (2010). V našem primeru se je v poletni sezoni vsebnost terpenov najbolj spreminjala. Največje nihanje vsebnosti je opaziti v poletni sezoni pri α -pinenu ter pri limonenu. Fernández-García in sod. (2002b) v svoji študiji ne izključujejo dejstva, da ta dva terpena nastaneta tudi zaradi aktivnosti mikroorganizmov.

Vse terpene, ki smo jih identificirali v siru iz obeh sezon, smo identificirali tudi v krmi in mleku, in sicer tako v poletni kot tudi v zimski sezoni. V mleku iz poletne sezone in osnovni krmi iz poletne sezone (sveži travi) smo identificirali vseh 6 terpenov v večjih koncentracijah v primerjavi z zimsko sezono. V vzorcih mleka in krme iz zimske sezone terpeni namreč niso bili vedno prisotni.

Izpostavili bi še terpen limonen, za katerega smo ugotovili, da zanj sezona ni bila statistično značilna. V krmi smo ga identificirali pri vseh rejcih, tako v sveži travi kot tudi v travni silaži. Višje vrednosti tega terpena so bile v sveži travi. V mleku razlike med sezonama niso bile statistično značilne.

Pri terpenu β -kariofilen so se pokazale v vzorcih mleka večje vrednosti v poletni sezoni, vendar pa v krmi razlike niso bile tako očitne.

4.3.1.2.7 Druge snovi

Razen cikličnih estrov (laktonov), žveplovih in fenolnih snovi z našo metodo nismo uspeli določiti HOS iz drugih skupin, vendar so lahko prav tako pomembni akterji pri oblikovanju arome.

LAKTONI

Od laktonov smo identificirali δ -oktalakton in δ -dekalakton, ki sta odgovorna za sadno aromo sira. Oba laktona so že definirali kot pomembni aromatični HOS v različnih tipih sira (Curioni in Bosset, 2002). Ob koncu zorenja je δ -dekalakton dosegel večje vrednosti. Delgado in sod. (2011) δ -dekalakton v svoji študiji navajajo kot eno izmed pomembnejših HOS, ki oblikujejo aromo sira »Ibores«.

Vpliv sezone je bil pri Nanoškem siru v primeru obeh laktonov statistično značilen. V zimski sezoni sta dosegla nekoliko večje vrednosti. Laktona sta bila prisotna ves čas zorenja. Kot je bilo že navedeno, smo v Nanoškem siru identificirali tudi oktanojsko in dekanjsko MK. Po eni od teorij naj bi se laktoni tvorili iz ustreznih hidroksikislin, ki se sprostijo iz trigliceridov v procesu lipolize (Collins in sod., 2003) in v procesu termične obdelave mleka (McSweeney and Sousa, 2000). Glede na to, da ju nismo identificirali niti v krmi niti v mleku, bi lahko nastanek laktonov pripisali tudi procesu lipolize in/ali toplotni obdelavi mleka.

Vsebnost δ -oktalaktona kot tudi δ -dekalaktona je v zimski sezoni najprej narasla do 7. dneva. Tudi Collins in sod. (2003) navajajo, da je koncentracija laktonov hitro narasla predvsem na začetku zorenja. V poletni sezoni pa je bila koncentracija δ -oktalaktona bolj konstantna, medtem ko je δ -dekalakton v poletni sezoni povečeval vse do 49. dneva zorenja.

2-OKTEN

2-okten smo v vzorcih Nanoškega sira zaznali le na začetku zorenja v poletni sezoni. Ker pa smo ga identificirali tudi v mleku iz poletne sezone predpostavljamo, da njegova prisotnost v siru izvira iz mleka. Glede na to, da smo ga identificirali le v enem vzorcu sveže trave, prehoda iz krme ne moremo vključiti.

2-okten spada med ogljikovodike, ki so možni prekursorji za nastanek aromatičnih snovi (Ortigosa in sod., 2001). Bugaud in sod. (2001) navajajo, da je lahko rezultat oksidacije nenasičenih MK. Identificirali so ga tudi v trdem siru grojer (Mallia in sod., 2005) in siru »Roncal« (Ortigosa in sod., 2001).

ETILBENZEN

Trend vsebnosti etilbenzena, ki je alkil benzen, se je v obeh sezonah med zorenjem spreminjal. V mleku in krmi iz obeh sezon ni bil prisoten. Cornu in sod. (2009) so v svoji študiji ugotovili, da je vsebnost etilbenzena v siru povečevala od 3. do 6. meseca zorenja. V našem primeru velja podobno v poletni sezoni, medtem ko se v zimski sezoni vsebnost etilbenzena ni bistveno spremenila. Mnenja o prispevku k aromi te HOS so različna; nekateri ji pripisujejo noto po topilu in barvi (Cornu in sod., 2009), medtem ko nekateri navajajo, da ni aromatična spojina (Frank in sod., 2004).

TOLUEN

Toluen je fenolna komponenta (Curioni in Bosset, 2002; Alewijn, 2006), ki tudi spada med alkil benzene (Frank in sod., 2004), nahajala naj bi se že v mleku (Alewijn, 2006). Tudi v našem primeru smo ga identificirali v mleku, in sicer ga je bilo več v poletni sezoni. Poleg tega smo ga identificirali v sveži travi, medtem ko ga v travni silaži ni bilo. Ta dejstva kažejo na možen prehod komponente iz krme v sir.

Vpliv sezone je bil za to HOS statistično značilen (Preglednica 12). V poletni sezoni so bile vrednosti toluena večje. Podobno pišejo v svoji študiji tudi Abilleira in sod. (2010b), in sicer da je v sirih iz sezone, kjer je bila prisotna tudi paša, vsebnost toluena narasla. Poleg tega tudi navajajo, da naj bi nekateri aromatični ogljikovodiki, kot je toluen, nastali z razgradnjo karotena, ki je prisoten v sveži travi. Za toluen velja podobno kot za etilbenzen glede njegove vloge v aromi. Frank in sod., (2004) trdijo, da ni imel nobenega prispevka v aromi, medtem ko mu Curioni in Bosset (2002) ter Delgado in sod. (2011) pripisujejo noto po oreških.

DIMETILSULFON

Dimetilsulfon spada med spojine, ki vsebujejo S (Burbank in Qian, 2005; Alewijn, 2006). Kot druge snovi, ki vsebujejo S, izvira tudi dimetilsulfon iz AK metionin neposredno ali posredno preko spojin, ki jim je AK izvor. V študijah je dimetilsulfon redko navajan kot HOS, identificirana v siru. Alewijn (2006) v svoji raziskavi piše, da je bil prisoten kot HOS v nekaterih trdih tipih sirov. Toso in sod. (2002) pa navajajo, da so ga identificirali v mleku in da visoke koncentracije povzročajo nezaželeno aromo. V Nanoškem siru smo ga večkrat zaznali v poletni sezoni z višjimi vrednostmi kot v zimski sezoni. Burbank in Qian (2005), ki sta prisotnost dimetilsulfona potrdila v čedarju, navajata, da ta spojina nima direktnega vpliva na aromo.

UNDEKAN

Undekan je ogljikovodik, ki je bil v vzorcih Nanoškega sira iz poletne sezone prisoten ves čas zorenja, smo v zimski sezoni pa smo ga identificirali le po 6 mesecih zorenja. Podatkov o njegovi aromatični noti nismo zasledili, vendar jo nekateri navajajo kot aromatično HOS, ki so jo že identificirali v siru (Mauriello in sod., 2003; Iličić in sod., 2012). Poleg tega je

najverjetneje, kot tudi nekateri n-alkeni, prekursor za tvorbo drugih aromatičnih HOS (Iličić in sod., 2012).

V krmi undekana sicer nismo zaznali, vendar pa smo ga zaznali v vzorcih mleka, kjer je v poletni sezoni imel večjo vsebnost. Glede na to, da smo undekan zaznali le v sirnini iz poletne sezone in da je imel v mleku iz poletne sezone večje vrednosti, bi lahko nakazali prehod undekana iz mleka.

p-KREZOL

p-krezol spada med fenole. V siru je med fenoli najpogostejše naveden p-krezol (4-metilfenol), ki nastaja iz AK tirozin pod vplivom kvasovk, mikrokokov in *B. linens* (Curioni in Bosset, 2002), nestarterskih laktobacilov (McSweeney in Sousa, 2000). P-krezol je produkt atipične Streckerjeve razgradnje (McSweeney in Sousa, 2000). V Nanoškem siru smo ga identificirali le v poletni sezoni, njegova vsebnost pa se je spreminjala.

4.3.2 PCA organskih spojin Nanoškega sira iz poletne in zimske sezone

V Nanoškem siru smo vsebnosti HOS na 63. in 99. dan zorenja obravnavali s PCA. S to metodo smo poiskali HOS, ki največ prispevajo k razlikovanju hlebcev sira iz dveh različnih sezon, iz poletne in zimske. Naše vprašanje je torej bilo, ali se profil HOS sira ločijo med sezonama. Poleg tega nas je zanimalo, katere HOS kar največ doprinesejo k variabilnosti med profilom HOS sira iz različnih sezon. Rezultati PCA komponent na 63. in 99. dan zorenja prikazujeta Slika 30 in Slika 31.

Oznake (npr. V1) posamezne HOS se nanašajo na podatke, zbrane v Preglednici 11. Analizirali smo vsebnosti HOS po hlebcih sira (označenih s črko K) na 63. in 99. dan. Hlebci sira z oznakami K1–K6 pripadajo poletni sezoni, hlebci z oznakami K7–K12 pa zimski sezoni.

V obeh primerih (na 63. in 99. dan) se hlebci ločijo le po osi 1. S to funkcijo 1 (os 1) pojasnimo približno 20 % variabilnosti, skupaj pa 29 %. Predvsem na 99. dan zorenja os 1 jasno loči hlebce po sezonah. Hlebci iz zimske sezone (K7–K12) so na pozitivni (desni) strani osi 1, medtem ko so hlebci iz poletne sezone (K1–K6) na levi strani osi 1. Kot je razvidno s Slike 30, bi lahko pet hlebcev iz poletne sezone ločili tudi po osi 2 v primerjavi s hlebci iz zimske sezone. Komponente, ki so ločile sezone na 63. dan in 99. dan zorenja po osi 1 in osi 2, so podane v Preglednici 14.

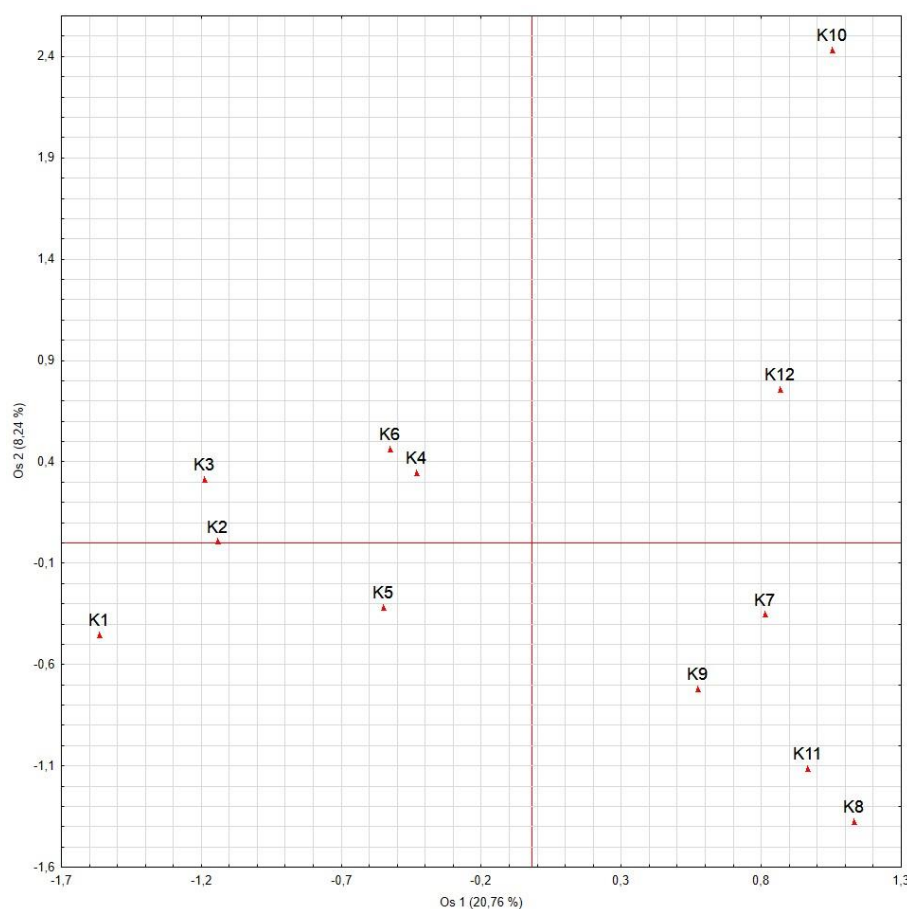
4.3.2.1 Rezultati PCA na 99. dan zorenja

Pri 99. dnevu zorenja velja za spremenljivke, ki imajo pri osi 1 (faktor 1) pozitiven predznak (Preglednica 14), da so bile njihove vsebnosti večje v zimski sezoni oziroma so bile prisotne le v zimski sezoni, medtem ko za poletno sezono velja ravno obratno. V nadaljevanju analiziramo le HOS, ki so imele večjo težo pri pojasnjevanju variabilnosti.

Večjo vsebnost v zimski sezoni so imele oktanojska kislina (V8), dekanajska kislina (V9), heksanojska kislina (V6) ter etil ester heksanojske kisline (V33). Metil ester oktanojske kisline (V34) in etil ester dekanajske kisline (V36) pa sta bila prisotna samo v zimski sezoni. Poudarili bi predvsem vlogo prostih MK pri oblikovanju arome Nanoškega sira v zimski sezoni. Glede na vsebnost posameznih identificiranih HOS v Nanoškem siru so na 99. dan zorenja proste MK oktanojska, dekanajska ter heksanojska na 4., 9. oziroma 10. mestu.

Poletno sezono so zaznamovali kar trije terpeni. Pinana (V50) in α -pinena (V51) je bilo v poletni sezoni več, medtem ko je bil terpen sabinen (V52) prisoten samo v poletni sezoni. Glede na njihovo koncentracijo te HOS sicer nimajo večje teže pri oblikovanju arome Nanoškega sira, bi pa lahko bili pomembni markerji pri definiranju poletne sezone.

Poleg tega so le siri iz poletne sezone vsebovali naslednje HOS, in sicer undekan (V60), p-krezol (V61), pentanojsko kislino (V5), benzenacetaldehid (V26) ter dekanal (V28). 2-hidroksi-3-pentanon (V42) pa je v poletni sezoni dosegel večje koncentracije. Vendar navedene HOS nimajo pomembne vloge pri oblikovanju arome glede na njihovo majhno vsebnost.



Slika 30: PCA identificiranih hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru na 99. dan zorenja, glede na hlebce sira iz poletne (K1–K6) in zimske (K7–K12) sezone

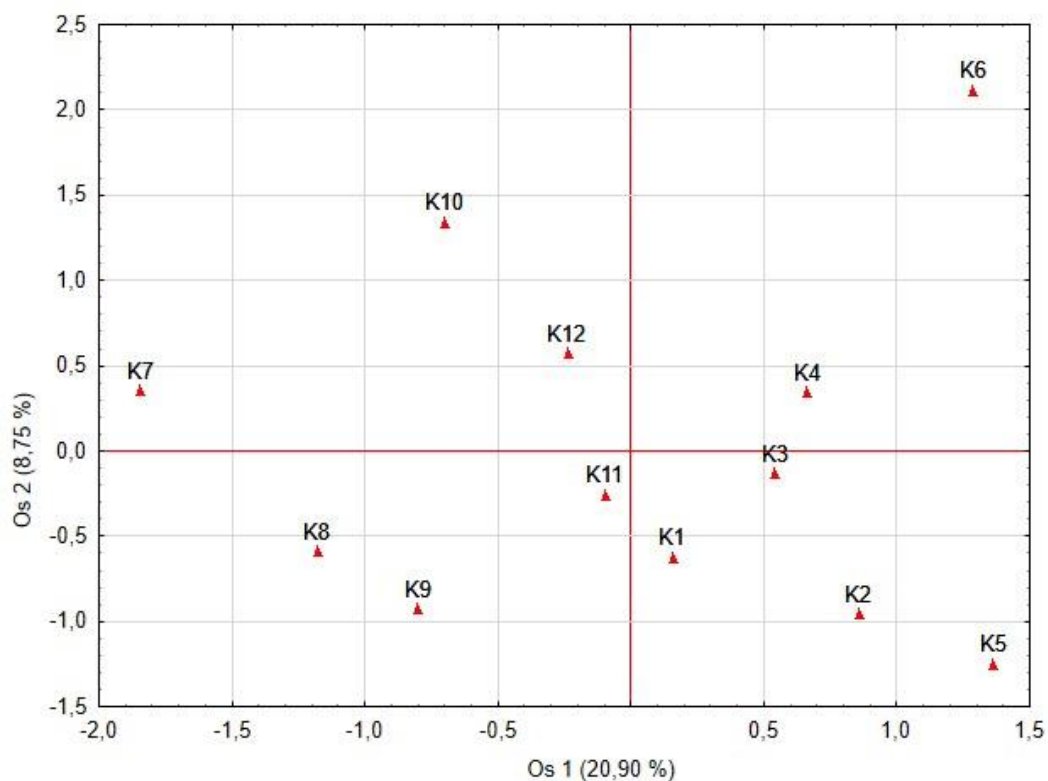
Figure 30: PCA for volatile organic compounds identified in Nanos cheese on the 99th day of ripening, separated by cheese wheels (summer wheels (K1–K6), winter wheels (K7–K12))

4.3.2.2 Rezultati PCA na 63. dan zorenja

Pri 63. dnevu zorenja velja za spremenljivke, ki imajo pri osi 1 (faktor 1) pozitiven predznak, da so bile njihove vsebnosti večje v poletni sezoni oziroma so bile prisotne le v poletni sezoni (Preglednica 13). Tudi na 63. dan zorenja so imele oktanojska kislina (V8), heksanojska kislina (V6), etil ester heksanojske kisline (V33), metil ester oktanojske kisline (V34) ter etil ester dekanoske kisline (V36) enak pomen kot na 99. dan. Poleg tega so terpeni (pinan – V50, α -pinen – V51, sabinen – V52) zaznamovali poletno sezono, sabinen sicer nekoliko manj kot pri 99. dnevu zorenja.

Na 63. dan zorenja v zimski sezoni so imele od MK večjo težo pri pojasnjevanju variabilnosti še ocetna kislina (V1), 3-metil butanojska kislina (V3) in heptanojska kislina (V7). Te HOS so imele večjo vsebnost v zimski sezoni v primerjavi s poletno. Med estri pa bi izpostavili še etil ester oktanojske kisline (V35). Poleg etil estra oktanojske kisline (V35) je večjo vsebnost v zimski sezoni dosegel še δ -oktalakton (V62), 2-butanon (V38) in

1-heksanol (V16). Poletno sezono pa sta z večjo vsebnostjo definirala še 2-oktanon (V45), 1-butanol (V11).



Slika 31: PCA identificiranih hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru na 63. dan zorenja, glede na hlebce sira iz poletne (K1–K6) in zimske (K7–K12) sezone

Figure 31: PCA for volatile organic compounds identified in Nanos cheese on the 63th day of ripening, separated by cheese wheels (summer wheels (K1–K6), winter wheels (K7–K12))

Preglednica 14: Izračunane komponente uteži spremenljivk-hlapnih organskih spojin (HOS) za prvi dve osi (Faktor 1, Faktor 2) pri 63. in 99. dnevu zorenja

Table 14: The calculated weight of the components of certain variables-volatile organic compounds for the first two components (Component 1, Component 2) on the 63th and 99th day of ripening

63. dan zorenja			99. dan zorenja		
n HOS	Faktor 1	Faktor 2	n HOS	Faktor 1	Faktor 2
V1	-0,91	0,17	V5	-0,96	0,06
V2	-0,50	0,79	V6	0,75	-0,18
V3	-0,97	0,02	V7	-0,71	-0,02
V5	0,81	-0,05	V8	0,91	-0,05
V6	-0,92	0,02	V9	0,91	-0,22
V7	-0,90	-0,07	V10	-0,01	0,96
V8	-0,92	0,05	V14	-0,50	0,78
V10	0,11	0,81	V18	0,82	-0,30
V11	0,75	0,27	V19	0,77	0,14
V13	-0,77	0,15	V23	0,85	-0,37
V14	0,23	0,89	V25	0,74	-0,30
V16	-0,92	0,16	V26	-0,95	0,05
V23	-0,88	-0,08	V28	-0,97	0,05
V29	0,00	0,95	V29	-0,29	0,77
V30	-0,08	0,86	V30	-0,22	0,83
V33	-0,91	0,07	V33	0,89	-0,16
V34	-0,82	-0,03	V34	0,93	-0,17
V35	-0,92	0,05	V36	0,77	-0,09
V36	-0,83	0,05	V37	-0,13	0,97
V37	-0,21	0,92	V39	-0,77	0,04
V38	-0,90	0,23	V41	-0,20	0,89
V41	-0,22	0,92	V42	-0,95	0,01
V42	0,14	0,94	V50	-0,95	0,17
V45	0,73	-0,19	V51	-0,89	0,28
V50	0,72	0,03	V52	-0,87	0,04
V52	0,82	0,25	V60	-0,88	-0,05
V59	0,74	0,32	V61	-0,99	0,02
V60	0,75	-0,20	V63	0,72	0,07
V62	-0,91	0,15			

V1–V63 – oznake hlapnih organskih spojin iz preglednice 11

4.3.2.3 Hlapne organske spojine, ki so v PCA ločile sezoni ter njihove povezave v krmi in mleku

Od HOS, ki so na podlagi PCA analize definirale poletno in zimsko sezono, smo v tem poglavju ponovno izpostavili tiste, za katere smo našli možno povezavo s krmo oziroma mlekom.

V zimski sezoni sta imela na 63. in 99. dan zorenja večjo vrednost heksanojska kislina in etil ester heksanojske kisline, etil ester dekanajske kisline pa je bil prisoten samo v zimski sezoni. Heksanojska kislina je bila prisotna samo v travni silaži, ki je bila osnovna krma v zimskem obroku krav. V mleku je bila sicer prisotna v obeh sezonah, vendar se vsebnost med sezonama ni razlikovala. Etil ester heksanojske kisline pa je bil prisoten le v travni silaži in mleku iz zimske sezone. Etil ester dekanajske kisline smo identificirali v travni silaži, medtem ko ga v sveži travi ni bilo. V vzorcih mleka ga nismo identificirali, saj nastane po hidrolizi maščobe.

Z večjo koncentracijo so poletno sezono na 63. in 99. dan zorenja zaznamovali terpeni in sicer pinan, α -pinen ter sabinen. Vsi trije terpeni so bili prisotni tudi v krmi in mleku v obeh sezonah, vendar je bila njihova vsebnost v poletni sezoni večja. Pri sabinenu v vzorcih mleka sicer razlika med sezonama ni bila statistično značilna.

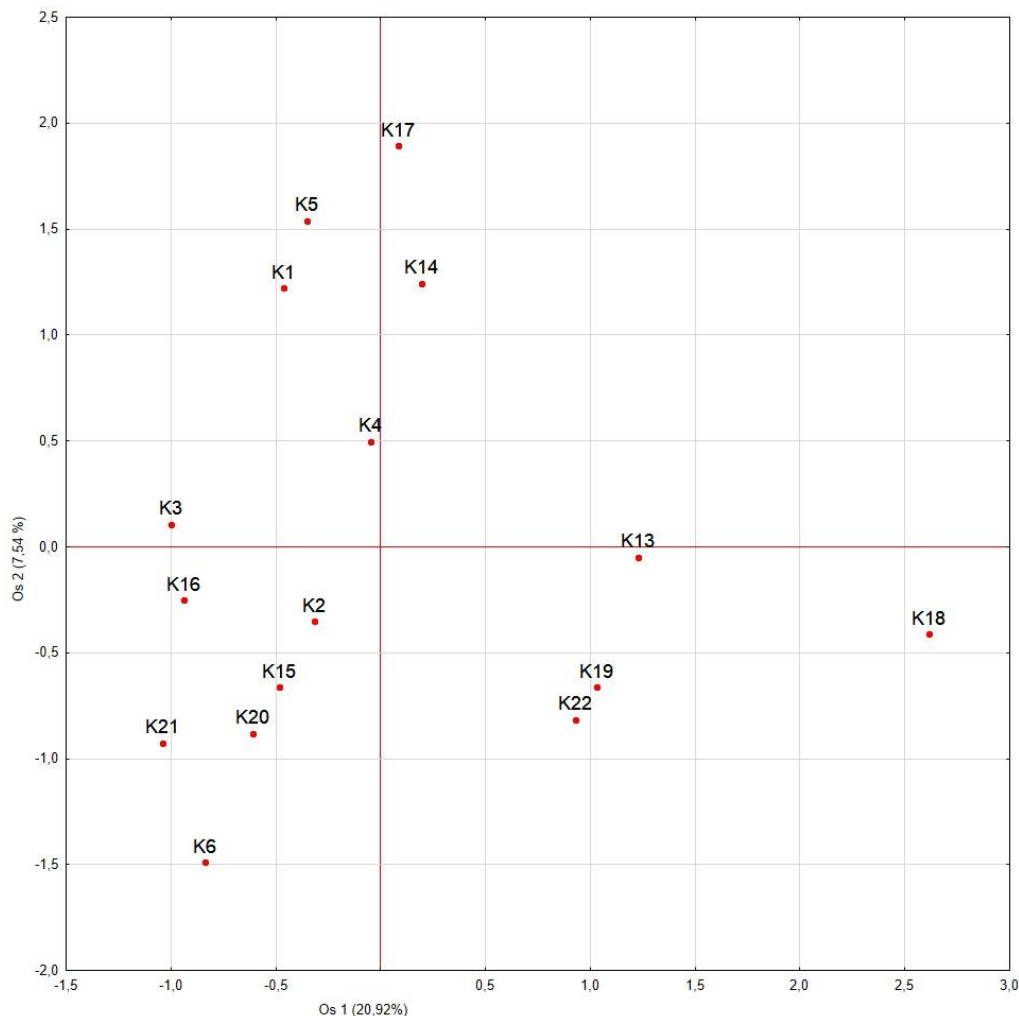
Poletno sezono je na 99. dan zorenja Nanoškega sira zaznamoval tudi undekan, ki ga je bilo več tudi v vzorcih mleka iz poletne sezone. V travni silaži in sveži travi ga nismo zaznali.

Na 63. dan zorenja je bilo v vzorcih Nanoškega sira zimske sezone tudi več očetne kisline, 3-metil butanojske kisline, etil estra oktanojske kisline ter 2-butanona. Očetna kislina je dosegla večje vsebnosti tudi v travni silaži, v mleku je nismo identificirali v nobeni od sezon. Enako velja za 3-metil butanojsko kislino. 2-butanona pa je bilo več v travni silaži in mleku iz zimske sezone. Pri 2-butanonu v vzorcih mleka sicer razlika med sezonama ni bila statistično značilna (Preglednica 12).

4.3.3 PCA analiza Nanoškega sira iz dveh poletnih sezon

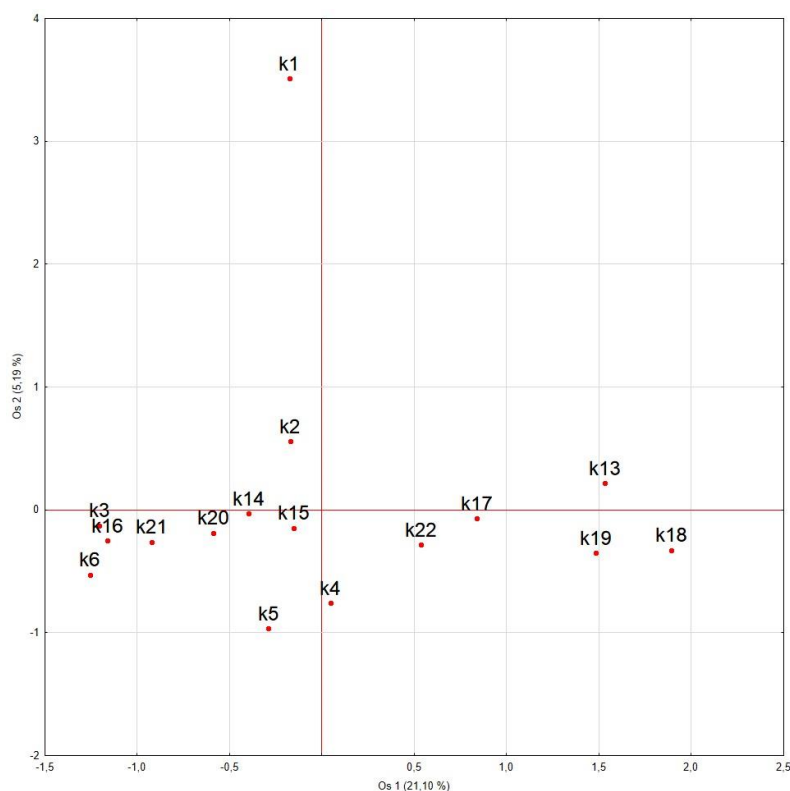
S PCA metodo smo tudi analizirali rezultate meritev na hlebcih sira iz dveh različnih poletnih sezon iz leta 2011 in 2012. Vsebnosti vseh identificiranih HOS v siru na 63. in 99. dan zorenja smo obravnavali s PCA analizo. Hlebci sira z oznakami K1–K6 so pripadali 1. poletni sezoni (leto 2011), medtem ko so hlebci z oznakami K13–K22 pripadali 2. poletni sezoni (leto 2012). Z metodo PCA smo želeli ugotoviti, ali lahko ločimo hlebce iz dveh različnih poletnih sezon. Poleg tega nas je zanimalo, ali obstajajo HOS, ki omogočajo razlikovanje med 1. in 2. poletno sezono. Oznake vseh HOS so podane v Preglednici 11.

Ugotovljeno je bilo, da na podlagi PCA analize hlebcev sira ne moremo ločiti med dvema različnima poletnima sezonama pri obeh dnevih zorenja (Slika 32, Slika 33). Pri 63. dnevu zorenja smo s prvima dvema osema/faktorjema uspeli pojasniti le 28,46 % variabilnosti. Pri 99. dnevu smo pojasnili še manj variabilnosti, in sicer 26,29 %. V hlebcih iz 2. poletne sezone smo na novo identificirali še 3 HOS, in sicer terpena cis-karan (V64) in kopaen (V66) ter oktil ester butanojske kisline (V65).



Slika 32: PCA identificiranih hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru na 63. dan zorenja, glede na hlebce sira iz 1. poletne (K1–K6) in 2. poletne (K13–K22) sezone

Figure 32: PCA for volatile organic compounds identified in Nanos cheese on the 63rd day of ripening, separated by cheese wheels from 1st summer (K1–K6) and 2nd summer (K13–K22) season



Slika 33: PCA identificiranih hlapnih organskih spojin na 99. dan zorenja Nanoškega sira, glede na hlebce sira iz 1. poletne (K1–K6) in 2. poletne (K13–K22) sezone

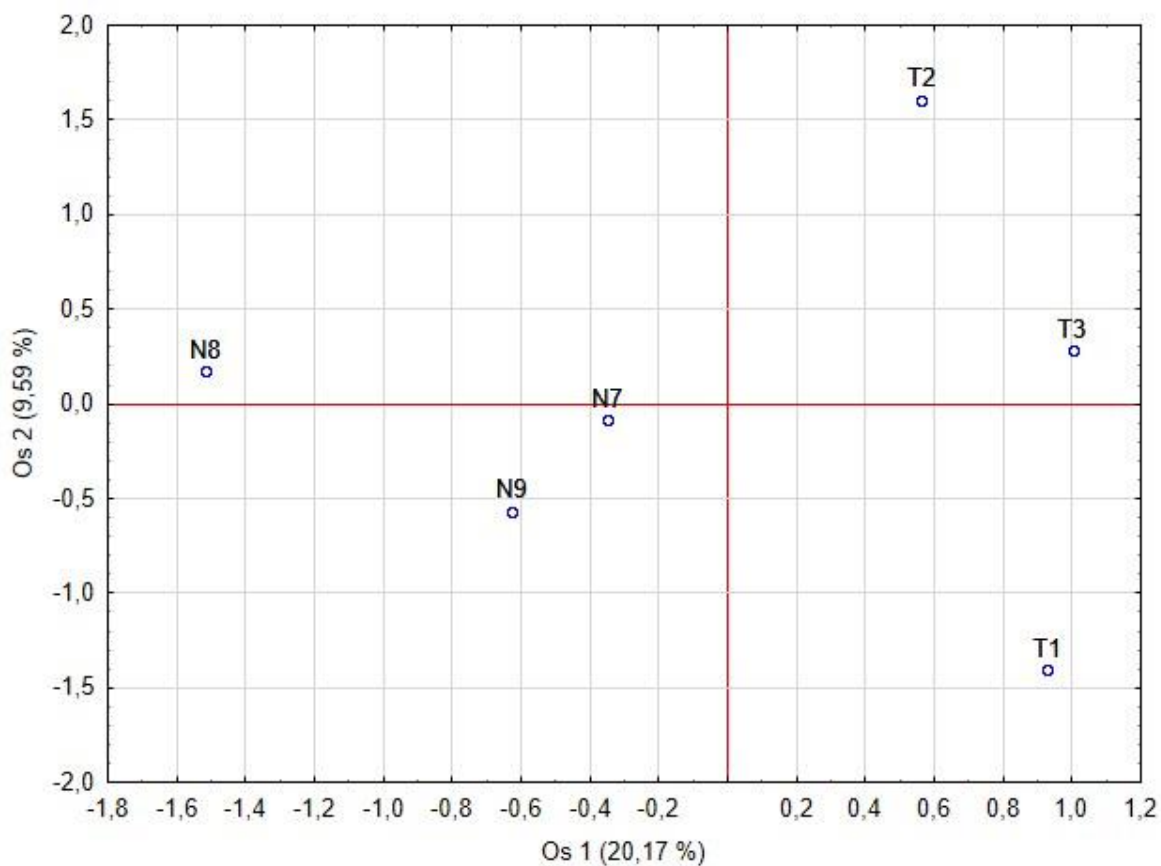
Figure 33: PCA for volatile organic compounds identified in Nanos cheese on the 99th day of ripening Nanos cheese, separated by cheese wheels from 1st summer (K1–K6) and 2nd summer (K13–K22) season

4.3.4 PCA analiza Nanoškega sira in sira Tolminc

V tem sklopu je bil naš namen primerjati aromatski profil Nanoškega sira z aromatskim profilom drugih sirov, ki so po tehnologiji najbolj podobni Nanoškemu siru. Za primerjavo smo izbrali sir Tolminc, izdelan v mlekarji Planika. Sir Tolminc ima, tako kot Nanoški sir, označbo porekla in prav tako spada med trde polnomastne sire ter je narejen iz termiziranega mleka. V analizo smo vključili po eno serijo vsakega sira, ki je bil izdelan v mesecu aprilu (Nanoški sir leta 2012, sir Tolminc leta 2014). Sir je zrel dva meseca. Podatke smo obdelali s PCA analizo.

Samo v Nanoškem siru so bile prisotne HOS 2-metil butanojska kislina (V4), 1-butanol (V11), heptanal (V22), benzaldehid (V24), etil ester dekanajska kislina (V36), 2,3-butandion (diacetil) (V37), 2-oktanon (V45), p-cimen (V54) in etilbenzen (V58). V Tolmincu pa smo identificirali 3-metil 1-butanol (V13), metil ester oktanojske kisline (V33), 2-metil heksanojsko kislino (V67), kopaen (V66) ter undekan (V60). Vse zgoraj naštetje HOS razen 2-metil heksanojske kisline (V67) so bile že identificirane v Nanoškem siru. Pri nekaterih od 30 HOS identificiranih v obeh sirih, se je vsebnost med siroma

razlikovala. Rezultati PCA nakazujejo, da funkcija 1 loči sira med sabo (Slika 34). HOS, ki pripadajo Funkciji 1 in 2, so podane v preglednici 15.



Slika 34: PCA identificiranih hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru (N7–N9) in siru Tolminc (T1–T3)

Figure 34: PCA for volatile organic compounds identified in Nanos cheese (N7–N9) and cheese Tolminc (T1–T3)

Preglednica 15: Uteži komponent spremenljivk – hlapnih organskih spojin za prvi dve funkciji (Funkcija 1 in Funkcija 2) pri PCA analizi Nanoškega sira in sira Tolminc

Table 15: The calculated weight of the components of variables – volatile organic compounds for the first two components (Component 1, Component 2) for PCA of Nanos cheese and Tolminc cheese

	V1	V2	V3	V4	V6	V8	V9	V11	V12	V13	V14
Funkcija 1	0,89	0,57	0,36	-0,86	-0,44	-0,88	0,03	-0,92	0,38	0,80	0,86
Funkcija 2	-0,06	0,81	0,51	-0,07	0,54	-0,02	0,04	-0,17	0,88	0,41	0,42
	V16	V17	V18	V19	V22	V23	V24	V25	V29	V30	V34
Funkcija 1	0,46	-0,60	0,55	0,29	-0,90	0,29	-0,97	-0,45	0,91	0,55	-0,34
Funkcija 2	0,66	0,35	0,81	0,90	-0,13	0,92	-0,14	-0,11	0,31	0,68	0,50
	V33	V35	V36	V67	V37	V38	V39	V41	V44	V45	V47
Funkcija 1	0,87	-0,82	-0,69	0,88	-0,64	0,94	-0,35	0,71	0,66	-0,66	-0,37
Funkcija 2	0,37	0,14	-0,26	0,27	-0,21	0,21	-0,02	0,39	0,49	-0,13	0,05
	V49	V51	V53	V54	V55	V66	V57	V58	V60	V62	V63
Funkcija 1	0,44	0,47	-0,09	-0,91	0,91	0,90	0,70	-0,31	0,86	0,71	0,49
Funkcija 2	-0,73	0,49	0,83	-0,05	0,06	0,28	0,60	-0,17	0,41	-0,22	-0,73

V1–V63 – oznake hlapnih komponent iz preglednice 11

Nanoški sir in sir Tolminc sta se ločila tako po vsebnosti kot po prisotnosti posameznih HOS, vendar so imele HOS, ki so bile prisotne le v enem od sirov (v Nanoškem ali Tolmincu) majhne vsebnosti. Zato predpostavljamo, da so končno aromo oblikovale HOS, ki so bile prisotne v obeh sirih. Te HOS so namreč imele večjo vsebnosti in bi lahko pomembneje vplivale na končno aromo v siru. Od teh HOS bomo izpostavili predvsem HOS, ki so imele večjo težo pri pojasnjevanju variabilnosti v PCA.

Razen etil estra oktanojske kisline (V35) so imele v siru Tolminc večje vsebnosti naslednje HOS in sicer očetna kislina (V1), butanojska kislina (V2), 2-pentanol (V12), 2,3-butanediol (V14), 2-etil 1-heksanol (V18), 2-nonanol (V19), oktanal (V23), etil ester očetne kisline (V29), 2-butanon (V38), 3-hidroksi 2-butanon (V41), δ -oktalakton (V62), δ -dekalakton (V63). To je bilo tudi pričakovano, saj so hlebci sira Tolminc (3 kg) precej manjši od Nanoškega sira (8–11 kg). Velikost hlebca namreč vpliva na številne fizikalnokemijske parametre v siru (Jaster in sod., 2014). Sklepamo, da je sir Tolminc zaradi manjše velikosti hlebca hitreje zorel. Poleg navedenih HOS sta imela večje vrednosti tudi terpena limonen (V53) in β -kariofilen (V55) ter toluen (V57). Za slednje HOS je bilo že dokazano, da izvirajo iz krme. Glede na rezultate lahko zaključimo, da ima Nanoški sir nekoliko bolj nežno aromo v primerjavi s sirom Tolminc. Poleg tega lahko

sklepamo, da ima Nanoški sir nekoliko bolj oreškasto aromo zaradi prisotnosti benzaldehida, ki je lahko rezultat delovanja *Lb. helveticus*, ki je dodan v Nanoški sir kot SK.

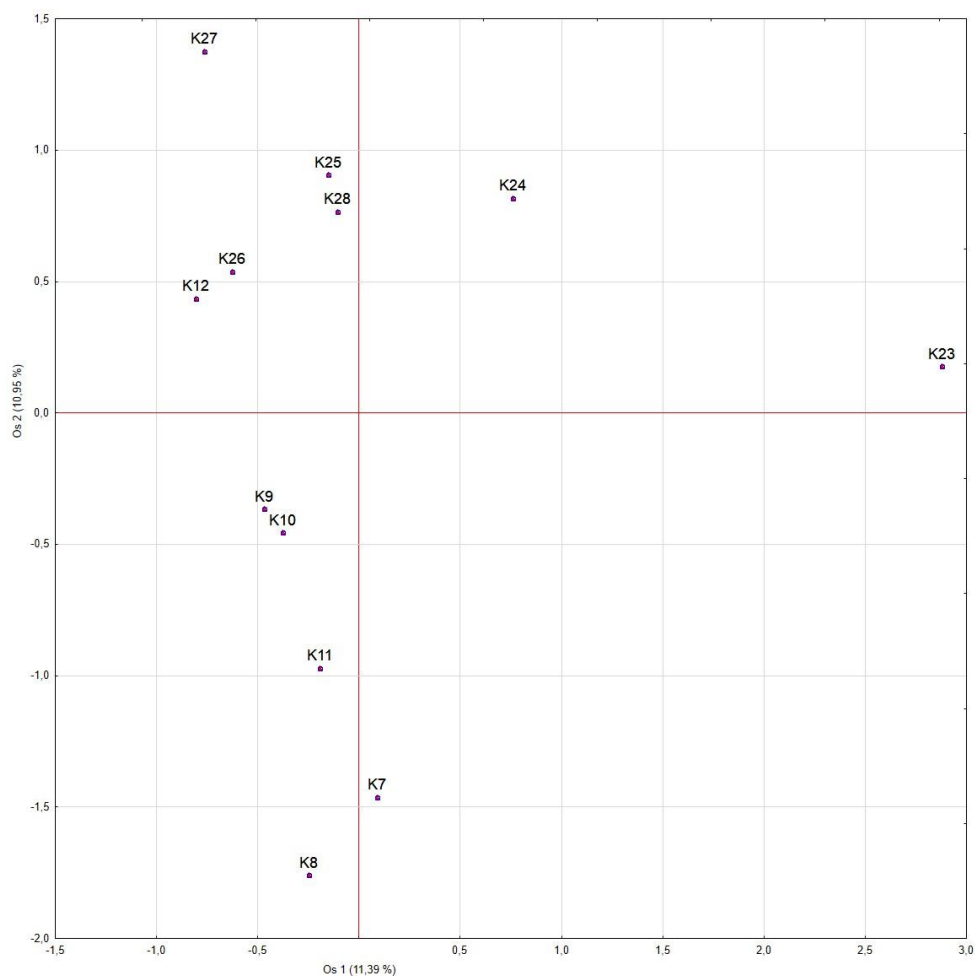
4.4 SKLOP 3: MOŽNI VPLIVI SPREMENJENIH PARAMETROV NA PROFIL HLAJNIH ORGANSKIH SPOJIN V NANOŠKEM SIRU

V 3. sklopu naloge smo opravili manjše predposkuse, v katerih smo spreminjali določene parametre, ki bi utegnili vplivati na spremembe aromatskega profila Nanoškega sira. Najprej smo se osredotočili na samo surovino, in sicer smo primerjali Nanoški sir, ki so ga sirili iz mleka iz tipičnega območja Nanoškega sira in smo ga poimenovali »odbrano« mleko« ter iz mleka izven tega območja za Nanoški sir in ga poimenovali »neodbrano« mleko. Nato smo proučili vpliv različne lokacije zorenja, in sicer smo obravnavali sir, ki je zorel na običajni lokaciji v vinorodnem okolišu ter na lokaciji izven vinorodnega okoliša. Poleg tega smo manjše količine mleka sirili z različnimi količinami dodane SK in sir zoreli pri različnih temperaturah zorenja, in sicer pri običajni temperaturi zorenja 12 °C in povišani temperaturi zorenja 18 °C. Kot posebnost v proizvodnji Nanoškega sira smo proučili še vpliv zorenja sira na tropinah.

4.4.1 Različna surovina

Pri proučevanju vpliva surovine (mleka) na aromatski profil sira smo analizirali sir, narejen iz mleka z območja, kjer običajno odbirajo mleko za predelavo v Nanoški sir (»odbrano« mleko) ter z drugega izbranega območja (»neodbrano« mleko). Rezultate smo obdelali s PCA, s katero smo poiskali HOS, ki največ prispevajo k razlikovanju hlebcev sira izdelanih iz mleka z različnih območij.

Rezultati PCA so prikazani na Sliki 35, s katere je razvidno, da se hlebci glede na to, iz katerega mleka so bili narejeni, ločijo po osi 2, s katero pojasnimo 10,95 % variabilnosti. Z obema funkcijama (os 1 in os 2) pa smo pojasnili 22,34 % variabilnosti.



Slika 35: PCA identificiranih hlapnih organskih spojin v Nanoškem siru iz »odbranega« (K7–K12) in iz »neodbranega« (K23–K28) mleka

Figure 35: PCA for volatile organic compounds identified in Nanos cheese made from “selected” (K7–K12) and “unselected” (K23–K28) milk

HOS, ki smo ju v tem delu identificirali le v Nanoškem siru, sirjenem iz »odbranega« mleka, sta bili 2-metil butanojska kislina (V4) ter terpen β -kariofilen (V55), medtem ko so bile HOS, ki smo jih identificirali samo v siru iz »neodbranega« mleka dekanal (V28), undekan (V60) ter nonanojska kislina (V67). Po vsebnosti je bilo v Nanoškem siru iz odbranega mleka več 3-metil butanojske kisline (V3), oktanala (V23), etil estra heksanojske kisline (V33) ter etil estra oktanojske kisline (V35). Alkohol 2-nonanol (V19) je bil identificiran le v eni seriji sira iz »neodbranega« mleka, medtem ko smo ga v Nanoškem siru identificirali v obeh serijah. Poleg tega smo v siru iz »neodbranega« mleka identificirali več očetne kisline (V1) in 2,3-butandiola (V14).

Nanoški sir (sir iz »odbranega« mleka) sta tako z večjo vsebnostjo zaznamovali MK 2-metil butanojska kislina (V4) in 3-metil butanojska kislina (V3), ki imata izvor v AK (Alewijn, 2006). V primerjavi s sirom iz »neodbranega« mleka je bilo v siru iz

»odbranega« mleka tudi več etil estra heksanojske kisline (V33), etil estra oktanojske kisline (V35) ter oktanala (V23). Kot smo že navedli v predhodnih poglavjih, veljata navedena estra v sirih za pomembnejši aromatični HOS. Terpen β -kariofilen (V55) je bil identificiran samo v Nanoškem siru iz »odbranega« mleka. Glede na to, da imajo terpeni izvor v rastlinah (Bugaud in sod., 2001; Curioni in Bosset, 2002), bi lahko zatrili, da je na njegovo vsebnost vplivala predvsem krma. S tem se potrjuje pomembnost vloge nekaterih terpenov kot geografske markerje.

Dekanal (V28) in undekan (V60), ki sta bila prisotna samo v siru iz »neodbranega« mleka, sta po vsebnosti manj pomembni HOS. V siru iz »neodbranega« mleka smo kot novo HOS identificirali nonanojsko kislino, ki izvira iz maščob (Delgado in sod., 2011). V siru iz »neodbranega« mleka smo zaznali večje vsebnosti očetne kisline, kar bi bila lahko posledica prenosa očetne kisline iz krme v mleko (Carpino in sod., 2004) ter da se spojina nahaja tudi v travni silaži (Danner in sod., 2003).

Kljub temu, da smo pojasnili 22,34 % variabilnosti na podlagi PCA analize HOS, hlebcev sirov iz »odbranega« in »neodbranega« mleka nismo uspeli ločiti glede na osi. Razlog bi lahko pripisali toplotni obdelavi mleka, termizaciji, ki je vključena v tehnološki postopek. Kot smo že omenili, termizacija standardizira in poenoti lastnosti mleka.

4.4.2 Različna lokacija zorenja

Za ovrednotenje vpliva različne lokacije zorenja na profil HOS v zrelem Nanoškem siru smo primerjali aromatski profil sirov, ki sta zorela na različnih lokacijah. Prva lokacija zorenja je bila v vinorodnem okolišu (kot je zahtevano v specifikaciji za Nanoški sir), druga pa v zorilnici izbrane sirarne, ki leži izven vinorodnega okoliša. Primerjali smo tudi rezultate mikrobiološke analize brisov hlebcev, odvzetih 63. dan zorenja na različnih lokacijah.

Aromatski profil sirov, ki sta zorela na različnih lokacijah, se ni bistveno razlikoval. Sira sta se razlikovala po vsebnosti določenih HOS kot tudi po prisotnosti le-teh. Vendar smo HOS, ki so bile prisotne le v hlebcih, zorenih na eni ali drugi lokaciji, zaznali v zelo majhnih koncentracijah. Skupna vsebnost HOS je bila sicer večja v siru, ki je zorel v zorilnici sirarne v Poljanah, vendar pa se bistveno ni razlikovala od vsebnosti HOS v siru, zorenem v vinorodnem okolišu (Priloga J). Na večjo skupno vsebnost HOS v siru, zorenem v nevinorodnem okolišu, je prispevala predvsem večja vsebnost 3-metil butanojske kisline (V3), 2-heptanola (V17), etil estra heksanojske kisline (V33) ter etilbenzena (V58). Vendar smo le v Nanoškem siru, zorenem v običajni zorilnici, identificirali dekanal (V28), poleg tega je bila v tem siru tudi večja vsebnost aldehydov, predvsem zaradi heptanala in nonanala. Poleg tega je bila v Nanoškem siru zaznana večja vsebnost etil estra očetne kisline (V29) ter ketonov 2-pentanona (V39) in 2-undekanona (V49).

Rezultati mikrobiološke analize brisov hlebcev, odvzetih 63. dan zorenja na različnih lokacijah (Preglednica 16) ne kažejo večjih razlik. Na hlebcih sirov, ki sta zorela v Poljanah, smo zaznali nekoliko večje število kvasovk in plesni. Med plesnimi je bila potrjena prisotnost rodu *Penicillium*.

Preglednica 16: Mikrobiološke analize površin hlebcev, zorenih na različnih lokacijah

Table 16: Microbiological analysis of Nanos cheese wheels surface ripened at different locations

	Vipava		Poljane	
	Povprečje	s ¹	Povprečje	s
Aerobne mezofilne bakterije (cfu/cm ²)	> 30000000		> 30000000	
Kvasovke (cfu/g/ml)	163750	133876	462500	386038
Plesni (cfu/g/ml)	301000	466045	600000	394039
Mikrokoki	< 100		< 100	

¹standardni odklon; cfu – kolonijsko število (angl. colony forming units)

Med zorenjem se na površini sirov razvijejo plesni in kvasovke, prisotne so tudi številne bakterije, sestava površinske mikrobiote pa je odvisna od številnih dejavnikov, kot so tehnologije izdelave sira, pogoji v okolju (temperatura, vlaga, koncentracija soli) ter mikrobiote slanice in zorilnice. Kvasovke, ki se lahko razvijejo na površini skorje sira ob začetku zorenja, med drugim izločajo alkalne metabolite, kot je amoniak. Zaradi tega lahko pride do dviga vrednosti pH na površini sira, vendar pa o sami sestavi in vlogi površinske mikrobiote na sirih še vedno ni veliko znanega (Fontana in sod., 2010). Rondič (1996), ki je proučevala površinsko mikrobioto Nanoškega sira, je ugotovila, da je ta zelo pestra, saj jo sestavljajo različne skupine mikroorganizmov. Med bakterijami so na Nanoškem siru prevladovali mikrokoki, koliformnih bakterij je bilo zelo malo, MKB pa so bile prisotne le na začetku zorenja. V našem primeru smo vzorce brisov s površin hlebcev sira vzeli 63. dan zorenja, zato MKB nismo določali. Površina hlebcev sira je ves čas izpostavljena aerobnemu okolju in s tem različnim dejavnikom ter tudi ročni negi. Navedeno najverjetneje pripomore, da je število aerobnih mezofilnih bakterij običajno visoko, ki pa nimajo pomembne vloge pri površinskem zorenju (Rondič, 1996). V našem primeru smo dobili majhno število mikrokokov in večje število kvasovk ter plesni, zato bi lahko zaključili, da so pri površinskem zorenju trdih tipov sirov pomembne predvsem kvasovke in plesni. Omeniti pa moramo, da je njihova vloga pri površinskem zorenju trdih tipov sira minimalna v primerjavi z zorenjem npr. pri nekaterih mehkih tipih sira in pri zorenju sirov z rdečo mažo. Rondič je iz pregledanih virov ugotovila, da 60–80 % plesni na površini sirov pripada rodu *Penicillium*. Z mikrobiološko analizo je bila tudi v našem primeru potrjena prisotnost plesni iz rodu *Penicillium*. Predvsem je za ta rod plesni značilno, da izločajo proteolitične encime in s tem med zorenjem pripomorejo k nastanku peptidov ter aminokislin. Plesni veljajo za najbolj lipolitične mikroorganizme v siru. Znano je, da so nekatere plesni iz rodu *Penicillium* odgovorne za nastanek metil ketonov (C3–C9), ki izvirajo iz MK (C4–C12) (Choisy in sod., 2000b). V Nanoškem siru, ki je zorel v običajnem okolju, v Vipavski dolini, je bila večja vsebnost dočenih metil ketonov (2-pentanon, 2-undekanon). Slednjega pa ne moremo povezati z večjo prisotnostjo plesni, saj

je bilo večje število plesni na površini sira, ki je zorel v Poljanski dolini (nevinorodni okoliš).

Natančnejše determinacije kvasovk nismo opravili, vendar je že Rondičeva (1996) potrdila prisotnost kvasovk *Candida intermedia*, *Candida sake*, *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus humicolus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* in *Zygosacharomyces rouxii*. Poleg tega v svoji študiji zaključuje, da se večina kvasovk, izoliranih s površine Nanoškega sira, nahaja tudi v grozdnih jagodah in vinu, kar pripisuje vinorodnemu okolišu zorilnice. Tudi kvasovke imajo svoj prispevek pri nastanku končne arome sira. Proizvajajo encime proteinaze in lipaze, ki razgrajujejo proteine in lipide ter tako sodelujejo pri nastanku aromatičnih snovi in oblikovanju texture sira (Rondič, 1996).

Z mikrobiološko analizo smo želeli ugotoviti, ali se površinska mikrobiota Nanoškega sira, ki je zorel na različnih lokacijah (Vipava – vinorodni okoliš, Poljane – nevinorodni okoliš), razlikuje, oziroma če se zaradi slednjega razlikuje tudi aromagram Nanoškega sira. Zaradi nespecifične analize in majhnega števila vzorcev bistvenih razlik v mikrobni populaciji s površine hlebcev sira nismo ugotovili. Sir, ki je zorel v Poljanah, je imel nekoliko večje število plesni in kvasovk, vendar bi bilo potrebno opraviti več ponovitev odvzema brisa. Na majhne razlike v mikrobni populaciji so prispevali tudi zahtevano enaki pogoji zorenja na obeh lokacijah (temperatura, vlaga, ročna nega sirov). Tudi aromagrami vzorcev sira iz različnih območij zorenja se niso bistveno razlikovali in jih nismo uspeli povezati z rezultati mikrobiološke analize površine hlebcev Nanoškega sira, saj je, kot smo že omenili, prispevek površinskega zorenja pri trdih sirih zelo majhen. V poskus, kjer bi proučevali vpliv okolja na sestavo površinske mikrobiote Nanoškega sira in na HOS v siru, bi bilo potrebno vključiti večje število vzorcev (več hlebcev iz različnih serij Nanoškega sira). Poskus bi bilo potrebno tudi ponoviti zaradi nepričakovanih razlik v vsebnosti terpenov.

4.4.3 Vpliv različne količine dodanih starterskih kultur ter temperature zorenja

Za ugotavljanje vpliva različne količine dodane SK ter temperature zorenja na HOS v siru smo primerjali aromatski profil sira izdelan skladno s specifikacijo za Nanoški sir, le da smo v eni seriji sirili z dodatkom običajne količine SK, v drugi pa smo sirili z dodatkom večje količine SK. Sire, izdelane z običajno in povišano količino dodane SK, smo zoreli pri običajni temperaturi zorenja (12 °C) ter povišani temperaturi zorenja (18 °C).

V Nanoški sir se kljub priporočilom proizvajalca SK doda petkrat manj SK. Pri tem moramo upoštevati, da je mleko za Nanoški sir le termizirano in del native populacije mikroorganizmov v mleku ostane. V primeru prevelike količine dodane SK se lahko testo preveč zakisa, zaradi česar postane kredasto in lomljivo. Glede na rezultate spremljanja

vrednosti pH med sirjenjem z običajno količino dodane SK smo se odločili, da zato pri sirjenju s povišano količino dodane SK njeno količino le podvojimo.

Določili smo aromatski profil 4 hlebcev Nanoškega sira, kjer sta bila dva izdelana z običajno in dva s povišano količino dodane SK, nato sta po en hlebec z običajno in en hlebec s povišano SK zorela pri 12 °C oz. 18 °C. Nanoški sir z običajno količino dodane SK, ki je zorel pri višji temperaturi (18 °C), se je že vizualno razlikoval od hlebca z običajno količino SK, ki je zorel pri nižji temperaturi (12 °C) (Slika 36). Sir, ki je zorel pri višji temperaturi, je imel večja očesca v sirnem testu, poleg tega so se hlebci razlikovali tudi po prisotnosti oziroma vsebnosti HOS (Preglednica 17). V vzorcih sira iz tega poskusa smo identificirali 55 HOS. HOS, ki smo jih že identificirali v Nanoškem siru, smo označili s črko V, medtem ko smo devet na novo identificiranih HOS v tem poskusu označili s črko N. Prisotnost slednjih HOS pa ni bila vedno posledica višje temperature zorenja ali večje količine dodanih SK, ampak morda tudi dimenzij poskusa (manjša količina mleka, čas zorenja mleka ...) ali drugih dejavnikov, ki jih nismo spremljali. Aromatski profili sirov, izdelanih z različno količino dodane SK in zorenih pri različnih temperaturah, so se med seboj razlikovali tako po vsebnosti kot tudi po prisotnosti HOS (Preglednica 17). Višja temperatura zorenja je npr. pripomogla k večji vsebnosti estrov in alkoholov. Večja količina dodanih SK pa je prispevala k večji vsebnosti HOS (npr. benzaldehid) in prisotnosti novih HOS (npr. 2-furanmetanol).



Slika 36: Hlebca sira, izdelana z običajno količino dodane starterske kulture, zorena pri različnih temperaturah. Levo: pri 18 °C, desno: pri 12 °C.

Figure 36: Cheese wheels with different amount of starter culture added, ripened at different temperature. Left: at 18 °C, right: at 12 °C.

Preglednica 17: Vsebnost hlapnih organskih spojin (HOS) v sirih, izdelanih z različno količino dodane starterske kulture (SK) in zorenih pri različnih temperaturah (12 °C, 18 °C)

Table 17: The content of volatile organic compounds in cheeses, made with different starter culture and ripened at different temperature (12 °C, 18 °C)

HOS po funkcionalnih skupinah		SK, 12 °C		SK, 18 °C		2xSK, 12 °C		2xSK, 18 °C	
		Povprečje	RSD ¹	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD
MAŠČOBNE KISLINE									
V1	Ocetna kislina	$1,45 \cdot 10^8$	0,03	$2,67 \cdot 10^8$	0,02	$1,14 \cdot 10^8$	0,07	$1,49 \cdot 10^8$	0,04
V2	Butanojska kislina	$5,11 \cdot 10^8$	0,03	$4,35 \cdot 10^8$	0,24	$4,30 \cdot 10^8$	0,08	$6,26 \cdot 10^8$	0,05
V3	3-metil butanojska kislina	$7,13 \cdot 10^7$	0,02	$6,46 \cdot 10^7$	0,06	$1,11 \cdot 10^8$	0,11	$7,22 \cdot 10^7$	0,08
V4	2-metil butanojska kislina	$1,70 \cdot 10^7$	0,06	$2,22 \cdot 10^7$	0,06	$2,24 \cdot 10^7$	0,11	$1,81 \cdot 10^7$	0,08
V6	Heksanojska kislina	$3,51 \cdot 10^8$	0,00	$4,26 \cdot 10^8$	0,06	$4,38 \cdot 10^8$	0,09	$1,65 \cdot 10^6$	0,11
V7	Heptanojska kislina	$3,69 \cdot 10^6$	0,04	$4,27 \cdot 10^6$	0,06	$4,12 \cdot 10^6$	0,12	$4,72 \cdot 10^6$	0,07
V8	Oktanojska kislina	$1,64 \cdot 10^8$	0,04	$1,61 \cdot 10^8$	0,04	$2,54 \cdot 10^8$	0,07	$2,56 \cdot 10^8$	0,05
V9	Dekanojska kislina	$5,55 \cdot 10^7$	0,06	$6,23 \cdot 10^7$	0,08	$1,13 \cdot 10^8$	0,01	$9,45 \cdot 10^7$	0,21
N	2-metil propanojska kislina	$9,24 \cdot 10^6$	0,21	$5,71 \cdot 10^6$	0,38	/	/	/	/
SKUPAJ: MAŠČOBNE KISLINE		$1,33 \cdot 10^9$		$1,45 \cdot 10^9$		$1,49 \cdot 10^9$		$1,22 \cdot 10^9$	
ALKOHOLI									
V11	1-butanol	$1,05 \cdot 10^6$	0,11	$1,49 \cdot 10^7$	0,01	$6,45 \cdot 10^5$	0,10	$1,20 \cdot 10^6$	0,10
V12	2-pentanol	$2,39 \cdot 10^6$	0,50	$7,19 \cdot 10^7$	0,03	$8,84 \cdot 10^5$	0,25	$5,81 \cdot 10^6$	0,06
V13	3-metil butanol	$8,50 \cdot 10^6$	0,07	$1,49 \cdot 10^7$	0,13	$1,24 \cdot 10^7$	0,18	$1,81 \cdot 10^7$	0,01
V14	2,3-butandiol	$2,46 \cdot 10^7$	0,03	$4,39 \cdot 10^7$	0,05	$7,34 \cdot 10^6$	0,15	$1,39 \cdot 10^7$	0,07
V16	1-heksanol	/		/		$2,11 \cdot 10^7$	0,33	$1,45 \cdot 10^7$	0,20
V17	2-heptanol	$4,38 \cdot 10^6$	0,04	$5,93 \cdot 10^7$	0,03	$1,10 \cdot 10^6$	0,12	$5,97 \cdot 10^6$	0,09
V18	2-etil 1-heksanol	$1,33 \cdot 10^7$	0,06	$1,47 \cdot 10^7$	0,07	$9,91 \cdot 10^6$	0,22	$1,03 \cdot 10^7$	0,40
V19	2-nonanol	$1,71 \cdot 10^6$	0,39	$1,09 \cdot 10^7$	0,09	$2,78 \cdot 10^6$	0,22	$3,53 \cdot 10^6$	0,30
N	2-furanmetanol	/		/		/		$5,55 \cdot 10^8$	0,09
SKUPAJ: ALKOHOLI		$5,59 \cdot 10^7$		$2,30 \cdot 10^8$		$5,62 \cdot 10^7$		$6,29 \cdot 10^8$	
ALDEHIDI									
V20	3-metil butanal	$1,83 \cdot 10^6$	0,05	/		$3,76 \cdot 10^6$	0,16	$3,73 \cdot 10^6$	0,28
V22	Heptanal	$3,61 \cdot 10^6$	0,12	/		$4,19 \cdot 10^6$	0,18	/	
V23	Oktanal	$1,31 \cdot 10^7$	0,81	$1,93 \cdot 10^7$	0,13	$1,11 \cdot 10^7$	0,13	$1,66 \cdot 10^7$	0,29
V24	Benzaldehid	$2,93 \cdot 10^7$	0,07	$3,28 \cdot 10^7$	0,05	$1,64 \cdot 10^8$	0,13	$5,36 \cdot 10^7$	0,37
V25	Nonanal	$4,67 \cdot 10^6$	0,14	$4,13 \cdot 10^6$	0,25	$7,74 \cdot 10^6$	0,21	$4,84 \cdot 10^6$	0,13
V26	Benzenacetaldehid	$1,92 \cdot 10^6$	0,08	$1,51 \cdot 10^6$	0,18	$4,30 \cdot 10^6$	0,12	$5,59 \cdot 10^6$	0,25
V28	Dekanal	$4,35 \cdot 10^6$	0,14	$4,81 \cdot 10^6$	0,19	$7,16 \cdot 10^6$	0,19	$5,85 \cdot 10^6$	0,14
SKUPAJ: ALDEHIDI		$5,88 \cdot 10^7$		$6,26 \cdot 10^7$		$2,02 \cdot 10^8$		$9,01 \cdot 10^7$	
ESTRI									
V29	Etil estre ocetne kisline	$4,71 \cdot 10^6$	0,14	$2,00 \cdot 10^7$	0,15	$7,47 \cdot 10^6$	0,34	$8,83 \cdot 10^6$	0,06
V30	Etil ester butanojske kisline	$3,88 \cdot 10^7$	0,05	$1,21 \cdot 10^8$	0,04	$2,17 \cdot 10^7$	0,09	$2,97 \cdot 10^7$	0,30
V32	1-butanol, 3-metil acetat	/		$5,58 \cdot 10^6$	0,06	/		/	
V33	Etil estre heksanojske kisline	$2,11 \cdot 10^7$	0,02	$3,54 \cdot 10^7$	0,07	$1,48 \cdot 10^7$	0,10	$1,95 \cdot 10^7$	0,13
V35	Etil ester oktanojske kisline	$1,16 \cdot 10^7$	0,12	$2,25 \cdot 10^7$	0,11	$1,62 \cdot 10^7$	0,11	$2,95 \cdot 10^7$	0,12
N	Etil ester 3-metil butanojske kisline	/		/		/		$1,22 \cdot 10^6$	0,23
N	Etil ester 2-butanojske kisline	/		/		/		$1,99 \cdot 10^6$	0,15
N	Pentil ester ocetne kisline	/		/		/		$3,93 \cdot 10^8$	0,15
N	Etil ester 2-metil propanojske kisline	/		$9,77 \cdot 10^6$	0,03	/		$3,85 \cdot 10^6$	0,03
SKUPAJ: ESTRI		$7,62 \cdot 10^7$		$2,14 \cdot 10^8$		$6,01 \cdot 10^7$		$4,88 \cdot 10^8$	

(se nadaljuje)

Nadaljevanje preglednice 17: Vsebnost hlapnih organskih spojin (HOS) v sirih, izdelanih z različno količino dodane starterske kulture (SK) in zorenih pri različnih temperaturah (12 °C, 18 °C)

HOS po funkcionalnih skupinah		1xSK, 12 °C		1xSK, 18 °C		2xSK, 12 °C		2xSK, 18 °C	
		Povprečje	RSD ¹	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD	Povprečje	RSD
KETONI									
V37	2,3-butandion (Diacetil)	$2.23 \cdot 10^7$	0.06	/		$2.05 \cdot 10^7$	0.08	$1.16 \cdot 10^7$	0.03
V38	2-butanon	$4.56 \cdot 10^6$	0.11	$1.09 \cdot 10^7$	0.07	$3.01 \cdot 10^6$	0.41	$5.95 \cdot 10^6$	0.06
V39	2-pentanon	$2.31 \cdot 10^7$	0.14	$3.76 \cdot 10^7$	0.02	$1.72 \cdot 10^7$	0.09	$1.36 \cdot 10^8$	0.37
V41	3-hidroksi 2-butanon (Acetoin)	$7.34 \cdot 10^7$	0.04	$9.35 \cdot 10^6$	0.16	$1.16 \cdot 10^8$	0.09	$7.19 \cdot 10^7$	0.06
V42	2-Hidroksi-3-pentanon	$8.27 \cdot 10^6$	0.14	/		$6.21 \cdot 10^6$	0.07	$4.61 \cdot 10^6$	0.14
V44	2-heptanon	$2.90 \cdot 10^8$	0.04	$2.47 \cdot 10^8$	0.05	$2.03 \cdot 10^8$	0.06	$8.13 \cdot 10^6$	0.26
V45	2-oktanon	/		/		/		$2.71 \cdot 10^6$	0.26
V47	2-nonanon	$2.71 \cdot 10^7$	0.05	$2.37 \cdot 10^7$	0.07	$2.76 \cdot 10^7$	0.10	$5.81 \cdot 10^7$	0.18
V49	2-undekanon	$1.39 \cdot 10^7$	0.07	$1.75 \cdot 10^7$	0.09	$6.11 \cdot 10^6$	0.44	$1.07 \cdot 10^7$	0.30
SKUPAJ: KETONI		$4.63 \cdot 10^8$		$3.46 \cdot 10^8$		$3.99 \cdot 10^8$		$3.10 \cdot 10^8$	
TERPENI									
V50	Pinan	$2.87 \cdot 10^7$	0.04	$2.23 \cdot 10^7$	0.10	$9.34 \cdot 10^6$	0.15	$2.93 \cdot 10^6$	0.17
V51	α -pinen	$9.03 \cdot 10^7$	0.01	$7.32 \cdot 10^7$	0.06	$3.17 \cdot 10^7$	0.12	$8.49 \cdot 10^6$	0.17
V53	Limonen	$1.51 \cdot 10^7$	0.16	$1.19 \cdot 10^7$	0.27	$7.16 \cdot 10^6$	0.21	$6.76 \cdot 10^6$	0.03
V54	p-cimen	$2.80 \cdot 10^7$	0.02	$2.71 \cdot 10^7$	0.07	$1.90 \cdot 10^7$	0.05	$1.61 \cdot 10^7$	0.18
V55	β -kariofilen	$8.41 \cdot 10^6$	0.05	$7.89 \cdot 10^6$	0.06	$8.15 \cdot 10^6$	0.06	$7.72 \cdot 10^6$	0.13
N	Kamfen	$4.51 \cdot 10^6$	0.11	$3.81 \cdot 10^6$	0.15	$2.45 \cdot 10^6$	0.15	/	
N	Karen	$3.42 \cdot 10^6$	0.07	$2.30 \cdot 10^6$	0.11	/		/	
N	2-Pinen-10-ol	$3.74 \cdot 10^6$	0.03	$3.55 \cdot 10^6$	0.05	$2.23 \cdot 10^6$	0.02	$2.45 \cdot 10^6$	0.19
SKUPAJ: TERPENI		$1.82 \cdot 10^8$		$1.52 \cdot 10^8$		$7.99 \cdot 10^7$		$4.44 \cdot 10^7$	
OSTALE KOMPONENTE									
V57	Toluen	/		/		/		/	
V58	Etilbenzen	$1.01 \cdot 10^6$	0.06	$3.92 \cdot 10^6$	0.07	/		/	
V62	δ -oktalakton	$6.95 \cdot 10^6$	0.10	$7.45 \cdot 10^6$	0.06	$7.24 \cdot 10^6$	0.09	$2.20 \cdot 10^7$	0.47
V63	δ -dekalakton	$8.70 \cdot 10^6$	0.06	$8.24 \cdot 10^6$	0.13	$1.81 \cdot 10^7$	0.05	$1.74 \cdot 10^7$	0.25
Skupaj: OSTALE HOS		$1.67 \cdot 10^7$		$1.96 \cdot 10^7$		$2.54 \cdot 10^7$		$3.94 \cdot 10^7$	
Skupaj: vse HOS		$2.18 \cdot 10^9$		$2.47 \cdot 10^9$		$2.31 \cdot 10^9$		$2.82 \cdot 10^9$	

¹RSD – relativna standardna napaka; V1–V63 – oznake hlapnih komponent iz preglednice 11;

N-na »novo« identificirane hlapne organske spojine; / – hlapna organska spojina ni bila identificirana

4.4.3.1 Učinek višje temperature

Z višanjem temperature v zorilnici lahko pospešimo hitrost zorenja sira (Van den Berg in Exterkate, 1993), vplivamo pa tudi na zunanji izgled prereza sira (nastanek očes). Tvorba očes je v trdih ter tudi poltrdih sirih pomemben parameter kakovosti (Schuetz in sod., 2013). Pri nastanku očes v siru sodeluje CO₂, ki lahko nastane pri fermentaciji laktoze (Kraggerud in sod., 2009), pri metabolizmu laktata (propionske bakterije) in citrata (pri nizozemskih tipih sirov) (McSweeney in Sousa, 2000), pri dekarboksilaciji glutaminske kisline ter v metabolizmu uree (Zoon in Allersma, 1996). Za to so odgovorne različne MKB (McSweeney and Sousa, 2000). CO₂ nastane predvsem v heterofermentativni fermentaciji laktoze (Kraggerud in sod., 2009). Omenili smo že, da med heterofermentativne bakterije spadajo predstavniki rodu *Leuconostoc* in nekatere bakterije iz rodu *Lactobacillus* (Choisy in sod., 2000a), vendar je pri tem količina nastalega CO₂ majhna. Za nastanek večje količine so pomembne propionske bakterije, ki imajo specifičen

metabolizem pretvorbe laktata v CO₂ ter propionat in acetat (Kraggerud in sod., 2009) in so značilne za švicarske tipe sirov (ementalski sir).

Na Sliki 36 je razvidno, da z višjo temperaturo lahko pomembno vplivamo na velikost in število očes v sirnem testu (Nuath in sod., 1992). Znano je, da v primeru prisotnih propionskih bakterij višja temperatura zorenja vpliva na nastanek večjih očes (Choisy in sod., 2000a). Podobno se je izkazalo tudi v našem poskusu, ko je imel sir, zoren pri višji temperaturi, večje število in večja očesa kot običajno. Očesa bi lahko nastala tudi zaradi delovanja propionskih bakterij, ki so naravno prisotne v surovem mleku, vendar pa se lahko njihovo število zaradi nekaterih tehnoloških faz, npr. toplotne obdelave, močno zmanjša (Broome in sod., 2003). Ugotovili so, kljub pasterizaciji mleka, prisotnost fakultativni heterofermentativnih laktobacilov v zrelem siru (Buchin in sod., 1998), ki so lahko odgovorni za nastanek CO₂ in s tem vplivajo na pojav očes v sirnem testu (Srikandakumar in sod., 2004). Poleg bakterij iz rodu *Lactobacillus* so identificirali v pasteriziranem mleku tudi bakterije iz rodu *Bacillus* in *Streptococcus* (Srikandakumar in sod., 2004; Mahari in Gashe, 1990).

Nižja temperatura zorenja lahko upočasni aktivnost bakterij in biokemijskih reakcij. Velja pa tudi obratno, npr. višja temperatura lahko prispeva k hitrejši lipolizi maščob, katere rezultat je večja vsebnost prostih MK (Osman in sod., 2009). V našem primeru se je to odražalo le pri Nanoškem siru z dodatkom običajne količine SK, ki je zorel pri 18 °C. Smo pa v obeh primerih sirov, ki so zoreli pri višji temperaturi, izmerili večjo vsebnost estrov, ki prispevajo k sadni noti sira. Ugotovili smo tudi večjo vsebnost alkoholov. Za heterofermentativne MKB, ki so bile v našem primeru nestarterska kultura, je značilno da prispevajo k nastanku alkoholov (Choisy in sod., 2000b).

V siru z večjo količino dodane SK, ki je zorel pri višji temperaturi, je bila vsebnost 2,3-butandiona (diacetila) (V37) in 3-hidroksi 2-butanona (acetoina) (V41) manjša v primerjavi s sirom, ki je zorel pri običajni temperaturi (Preglednica 17). Poleg tega smo tudi ugotovili, da v siru z običajno količino SK, ki je zorel pri višji temperaturi, 2,3-butandion (diacetil) (V37) in 3-hidroksi 2-butanon (acetoin) (V41) sploh nista bila prisotna. Te ugotovitve kažejo na to, da je višja temperatura zorenja lahko vplivala na odsotnost (v siru z običajno količino SK) oziroma manjšo vsebnost (v siru z večjo količino SK) diacetila in acetoina. Za ti dve HOS smo že napisali, da sta imeli z zorenjem padajoči trend, saj sta prekurzorja za druge HOS, in sicer je diacetil prekurzor acetoina, 2,3-butandiola in 2-butanona, acetoin pa prekurzor 2-butanola. Poleg tega je imel sir, zoren pri višji temperaturi, večje vsebnosti 2-butanona (V38) in 2,3-butandiola (V14). To bi lahko obrazložili z dejstvom, da je zaradi višje temperature potekala pretvorba diacetila v druge HOS bolj intenzivno.

4.4.3.2 Učinek večje količine dodane starterske kulture

Proces zorenja poteka le ob ustrezni vrednosti pH (Choisy in sod., 2000b). V primeru, da dodamo preveliko količino SK, je fermentacija lahko preintenzivna in vrednost pH med fermentacijo preveč pade, zato bo sir neustrezno zorel (Bunch Kristensen, 1999). Pri tem moramo omeniti, da je bila v našem primeru krivulja vrednosti pH (pH mleka po dodatku SK, pH sirotke po razrezu, pH sirotke po sušenju sirnine sira, pH sira pred polaganjem v slanico) med izdelavo sira z večjo količino SK v ustreznih mejah. Na podlagi spremljanja vrednost pH, ki ni padel pod 5, je potekal ustrezen proces zorenja.

SK vplivajo na nastanek aromatičnih snovi, saj pospešijo razvoj arome, vplivajo na krajši čas zorenja in izboljšajo senzorične lastnosti sira (Irlinger in Mounier, 2009). Največja vsebnost vseh HOS je bila v siru z večjo količino dodane SK in zorenim pri 18 °C (Preglednica 17). Poleg tega smo v tem siru identificirali 2-furanmetanol (N), ki je odgovoren za oreškasto aromo (Qian in Reineccius, 2002).

Povečana količina SK je verjetno pripomogla k večji vsebnosti benzaldehida (V24), kar bi lahko vplivalo na intenzivnejšo aromo po mandljih (Singh in sod., 2003). Znano je, da na nastanek benzaldehida lahko prispeva tudi *Lb. helveticus* (Klein in sod., 2001; Petersen in sod., 2010).

V siru z običajno količino dodane SK smo pri obeh temperaturah zorenja opazili večjo vsebnost 2-etil 1-heksanola (V18), medtem ko smo 1-heksanol (V16) identificirali le v sirih z večjo količino dodanih SK pri obeh temperaturah zorenja.

4.4.4 Vpliv različne tehnologije zorenja: običajna in na tropinah

V manjšem poskusu smo spremljali vsebnost HOS v Nanoškem siru, ki je zorel na običajen način in siru, ki je zorel na tropinah. Zorenje sirov na tropinah smo izvedli na dva načina, kar je opisano v poglavju 3.1 Zasnova poskusa po sklopih. Primerjali smo tudi senzorično oceno sirov in sicer smo se osredotočili predvsem na okus.

Sir, ki je zorel na tropinah, so tako po prisotnosti kot vsebnosti zaznamovali predvsem estri. V siru, ki je zorel na tropinah, smo namreč identificirali kar 7 estrov (Preglednica 18).

Preglednica 18: Hlapne organske spojine (HOS) v Nanoškem siru, zorenem na običajen način in na tropinah

Table 18: Volatile organic compounds in Nanos cheese and »Drunken cheese«

HOS po skupinah		Nanoški sir ¹		Nanoški sir na tropinah 1. ²		Nanoški sir na tropinah 2. ³	
		$\bar{x}$ ⁴	RSD ⁵	$\bar{x}$	RSD	$\bar{x}$	RSD
MAŠČOBNE KISLINE							
V1	Ocetna kislina	$1,12 \cdot 10^7$	0,14	$8,26 \cdot 10^6$	0,25	$3,40 \cdot 10^6$	0,29
V2	Butanojska kislina	$1,47 \cdot 10^8$	0,05	$5,33 \cdot 10^7$	0,08	$6,44 \cdot 10^7$	0,05
V3	3-metil butanojska kislina	$1,51 \cdot 10^6$	0,17	$6,61 \cdot 10^5$	0,14	$1,64 \cdot 10^6$	0,21
V4	2-metil butanojska kislina	$2,66 \cdot 10^5$	0,37	/	/	/	/
V6	Heksanojska kislina	$1,23 \cdot 10^8$	0,07	$9,21 \cdot 10^7$	0,14	$1,36 \cdot 10^8$	0,11
V8	Oktanojska kislina	$2,93 \cdot 10^7$	0,19	$3,95 \cdot 10^7$	0,18	$1,01 \cdot 10^8$	0,22
V9	Dekanojska kislina	$8,69 \cdot 10^6$	0,06	$1,05 \cdot 10^7$	0,12	$3,92 \cdot 10^7$	0,25
	SKUPAJ: MK	$3,21 \cdot 10^8$		$2,04 \cdot 10^8$		$3,45 \cdot 10^8$	
ALKOHOLI							
V10	2-butanol	$7,51 \cdot 10^5$	0,17	/	/	/	/
V11	1-butanol	$1,49 \cdot 10^6$	0,13	/	/	$2,41 \cdot 10^6$	0,15
V12	2-pentanol	$1,37 \cdot 10^6$	0,16	/	/	/	/
V13	3-metil butanol	$2,21 \cdot 10^5$		$7,53 \cdot 10^6$	0,15	$7,80 \cdot 10^5$	0,69
V14	2,3-butandiol	$1,77 \cdot 10^6$	0,28	/	/	/	/
V16	1-heksanol	$3,26 \cdot 10^6$	0,14	$1,34 \cdot 10^6$	0,14	$3,44 \cdot 10^6$	0,10
V17	2-heptanol	$9,94 \cdot 10^6$	0,21	$2,47 \cdot 10^6$	0,18	$1,19 \cdot 10^6$	0,24
V18	2-etil 1-heksanol	$8,47 \cdot 10^5$	0,11	$5,40 \cdot 10^5$	0,24	/	/
V19	2-nonanol	$1,97 \cdot 10^6$	0,15	$6,15 \cdot 10^6$	0,12	$2,03 \cdot 10^6$	0,18
Nt	2-metil butanol	/	/	$4,97 \cdot 10^6$	0,18	/	/
	SKUPAJ: ALKOHOLI	$2,16 \cdot 10^7$		$2,30 \cdot 10^7$		$9,84 \cdot 10^6$	
ALDEHIDI							
V22	Heptanal	$3,69 \cdot 10^5$	0,03	/	/	/	/
V23	Oktanal	$1,06 \cdot 10^7$	0,14	$8,00 \cdot 10^6$	0,09	$1,40 \cdot 10^6$	0,28
V24	Benzaldehid	$5,96 \cdot 10^6$	0,08	$1,50 \cdot 10^7$	0,15	$9,57 \cdot 10^7$	0,13
V25	Nonanal	$9,17 \cdot 10^5$	0,13	$7,93 \cdot 10^5$	0,19	$4,80 \cdot 10^5$	0,22
V26	Benzenacetaldehid	$4,15 \cdot 10^5$	0,14	$1,09 \cdot 10^6$	0,25	$1,44 \cdot 10^6$	0,18
V28	Dekanal	$1,06 \cdot 10^6$	0,18	$1,30 \cdot 10^6$	0,15	$1,81 \cdot 10^6$	0,10
	SKUPAJ: ALDEHIDI	$1,94 \cdot 10^7$		$2,62 \cdot 10^7$		$1,01 \cdot 10^8$	
ESTRI							
V29	Etil estre ocetne kisline	$5,15 \cdot 10^6$	0,17	$2,94 \cdot 10^7$	0,06	$8,19 \cdot 10^6$	0,07
V30	Etil ester butanojske kisline	$1,55 \cdot 10^7$	0,11	$6,57 \cdot 10^7$	0,09	$2,80 \cdot 10^7$	0,09
V32	1-butanol 3-metil, acetat	/	/	$1,00 \cdot 10^6$	0,18	$5,67 \cdot 10^5$	0,11
V33	Etil estre heksanojske kisline	$1,17 \cdot 10^7$	0,10	$1,63 \cdot 10^8$	0,12	$7,62 \cdot 10^7$	0,21
V34	Metil ester oktanojske kisline	$2,39 \cdot 10^6$	0,09	$5,32 \cdot 10^6$	0,10	$4,06 \cdot 10^6$	0,12
V35	Etil ester oktanojske kisline	$3,30 \cdot 10^6$	0,19	$1,47 \cdot 10^8$	0,13	$1,12 \cdot 10^8$	0,12
V36	Etil ester dekanoske kisline	/	/	$3,48 \cdot 10^7$	0,21	$5,45 \cdot 10^7$	0,25
Nt	2-nitroetil propionat	/	/	$3,48 \cdot 10^6$	0,16	$4,38 \cdot 10^7$	0,09
Nt	Etil ester propanoske kisline	/	/	$1,51 \cdot 10^6$	0,18	$8,28 \cdot 10^6$	0,07
Nt	Metil ester butanojske kisline	/	/	$4,47 \cdot 10^5$	0,06	/	/
Nt	Butil ester ocetne kisline	/	/	/	/	$8,99 \cdot 10^5$	0,17
Nt	2-hidroksi etil ester propanoske kisline	/	/	$2,49 \cdot 10^6$	0,12	$1,41 \cdot 10^6$	0,14
Nt	Etil ester nonanojske kisline	/	/	$1,83 \cdot 10^6$	0,19	$1,02 \cdot 10^6$	0,16
Nt	Etil ester dodekanojske kisline	/	/	/	/	$9,91 \cdot 10^6$	0,22
	SKUPAJ: ESTRI	$3,81 \cdot 10^7$		$4,56 \cdot 10^8$		$3,49 \cdot 10^8$	

(se nadaljuje)

Nadaljevanje preglednice 18: Hlapne organske spojine (HOS) v Nanoškem siru, zorenem na običajen način in na tropinah tropinah

HOS po skupinah		Nanoški sir ¹		Nanoški sir na tropinah 1. ²		Nanoški sir na tropinah 2. ³	
		$\bar{x}$ ⁴	RSD ⁵	$\bar{x}$	RSD	$\bar{x}$	RSD
KETONI							
V37 ⁶	2,3 butandion (Diacetil)	$1,00 \cdot 10^6$	0,10	/	/	$1,33 \cdot 10^6$	0,18
V38	2-butanon	$1,20 \cdot 10^6$	0,35	/	/	/	/
V39	2-pentanon	$2,76 \cdot 10^6$	0,13	$8,49 \cdot 10^5$	0,25	/	/
V41	3-hidroksi 2-butanon (Acetoin)	$1,25 \cdot 10^6$	0,23	/	/	/	/
V44	2-heptanon	$4,73 \cdot 10^7$	0,10	$3,83 \cdot 10^7$	0,10	$3,19 \cdot 10^7$	0,02
V47	2-nonanon	$9,38 \cdot 10^6$	0,04	$8,53 \cdot 10^6$	0,16	$4,18 \cdot 10^6$	0,19
V49	2-undekanon	$1,03 \cdot 10^6$	0,18	$2,06 \cdot 10^6$	0,17	$3,49 \cdot 10^6$	0,20
SKUPAJ: KETONI		$6,39 \cdot 10^7$		$4,97 \cdot 10^7$		$4,09 \cdot 10^7$	
TERPENI							
V50	Pinane	$1,76 \cdot 10^6$	0,30	$2,84 \cdot 10^5$	0,53	$2,03 \cdot 10^6$	0,21
V51	α -pinen	$2,81 \cdot 10^6$	0,13	$7,24 \cdot 10^5$	0,16	/	/
V53	Limonen	$2,96 \cdot 10^6$	0,07	$2,38 \cdot 10^6$	0,17	/	/
V54	p-cimen	$2,33 \cdot 10^6$	0,12	$9,54 \cdot 10^5$	0,21	/	/
V55	β -kariofilen	$1,35 \cdot 10^6$	0,37	$1,25 \cdot 10^6$	0,24	$1,44 \cdot 10^6$	0,40
SKUPAJ: TERPENI		$1,12 \cdot 10^7$		$5,59 \cdot 10^6$		$3,47 \cdot 10^6$	
OSTALE HOS							
V57	Toluen	$3,51 \cdot 10^7$	0,10	$8,90 \cdot 10^6$	0,12	/	/
V58	Etilbenzen	$3,37 \cdot 10^5$	0,35	/	/	/	/
V60	Undekane	$6,01 \cdot 10^5$	0,14	$6,48 \cdot 10^5$	0,28	/	/
V62	δ -oktalakton	$1,50 \cdot 10^6$	0,11	$1,61 \cdot 10^6$	0,20	$1,84 \cdot 10^6$	0,27
V63	δ -dekalakton	$2,06 \cdot 10^6$	0,19	$2,72 \cdot 10^6$	0,23	$5,03 \cdot 10^6$	0,22
Nt	Tetrametil pirazin	/	/	/	/	$2,47 \cdot 10^6$	0,22
SKUPAJ: OSTALE HOS		$3,96 \cdot 10^7$		$1,39 \cdot 10^7$		$9,33 \cdot 10^6$	

¹Nanoški sir zoren 77 dni; ²Nanoški sir, zoren na tropinah po 1. načinu; ³Nanoški sir, zoren na tropinah na 2. načinu; ⁴povprečna površina kromatografskih vrhov posamezne HOS; ⁵RSD – relativna standardna napaka; V1–V63 – oznake hlapnih organskih spojin iz preglednice 11; Nt – hlapna organska spojina, ki je bila identificirana v siru, zorenem na tropinah; / – hlapna organska spojina ni bila identificirana

Opravljen je bil tudi senzorična analiza sira, ki je zorel na tropinah. Sir, zoren na tropinah po 1. načinu, je imel prijeten saden okus. Sir, zoren na tropinah po 2. načinu, pa je imel nekoliko bolj zatohlo sadno aromo ter aromo po fermentiranem sadju. Konsistenca tega sira je bila trša in bolj zbita v primerjavi s sirom, zorenem na tropinah po 1. načinu.

Kot je že omenjeno, prispevajo estri k sadni noti, ki smo jo tudi določili pri senzorični analizi sira zorenega na tropinah. Zaradi tega smo se pri rezultatih osredotočili predvsem na estre. Poleg tega smo identificirali kar osem novih estrov le v sirih, zorenih na tropinah, niso pa bili vsi prisotni v vseh sirih, zorenih na tropinah po obeh načinih. Tako smo npr. butil ester očetne kisline (Nt) identificirali samo v siru, ki je zorel na tropinah po 2. načinu. Podobno so tudi Di Cagno in sod. (2007) izmerili največ butil estra očetne kisline (V 29) v siru, ki je zorel na tropinah v primerjavi s siri, ki niso zoreli na tropinah. Estri so v siru, zorenem na tropinah najverjetneje nastali v estrifikaciji alkoholov, prisotnih v tropinah oziroma vinu, s prostimi MK. Na nastanek estrov namreč vpliva tudi prisotnost alkoholov (Alewijs, 2006). Senzorično določitev sadne arome sira, zorenega na tropinah, bi tako lahko povezali s prisotnostjo estrov.

Nekatere od estrov smo identificirali tudi v vinu (npr. etil ester očetne kisline, etil ester heksanojske kisline). Predvsem v siru, zorenem na tropinah po 1. načinu, smo izmerili večjo vsebnost etil estra očetne kisline (V29) in etil estra heksanojske kisline (V33), za katerega je značilna sadna nota po pomaranči (Curioni in Bosset, 2002). Poleg tega smo v siru, zorenem na tropinah, opazili večjo vsebnost etil estra butanojske kisline (V30), a manjšo vsebnost butanojske kisline (V2). To lahko obrazložimo z dejstvom, da je prišlo do esterifikacije te MK z etanolom. Predvsem alkohol etanol naj bi bil limitirajoči reaktant pri esterifikaciji (McSweeney, 2004). Zanimivo, da smo izmerili nekoliko manjšo vsebnost terpenov v siru, ki je zorel na tropinah.

5 SKLEPI

V okviru doktorske disertacije smo na osnovi naših rezultatov prišli do nekaterih zaključkov v zvezi z oblikovanjem in vrednotenjem arome Nanoškega sira. Na oblikovanje značilne arome Nanoškega sira vplivajo številni dejavniki, med njimi sezona, čas zorenja ter nekateri različni pogoji zorenja.

– V okviru hipoteze, da bo Nanoški sir vseboval določene HOS, ki se bodo po vsebnosti in/ali prisotnosti razlikovale od HOS drugih sirov in bodo značilno prispevale k oblikovanju značilne arome Nanoškega sira, smo ugotovili naslednje:

Med tipične HOS z največjo vsebnostjo v Nanoškem siru spadajo 2-heptanon, 2-nonanon, butanojska kislina in etil ester butanojske kisline. Slednje HOS so že identificirali v drugih trdih tipih sirov (npr. »Bitto«, »Regusano«, gauda, čedar, parmezan).

Glede na to, da Nanoškemu siru pripisujejo blago oreškasto aromo, smo v tem siru tudi identificirali nekatere HOS, ki jih povezujejo z aromo po oreških, predvsem mandljih. Med temi HOS bi navedli benzaldehid, etil ester očetne kisline in toluen.

Poleg tega smo ob koncu zorenja identificirali HOS z večjo vsebnostjo npr. 2-heptanon, 2-nonanon, etil ester butanojske kisline, za katere je značilna sadna nota. Na podlagi teh ugotovitev bi lahko Nanoškemu siru pripisali nov vidik k senzorični oceni.

Profil HOS Nanoškega sira se je razlikoval od profila HOS Tolminca po vsebnosti in ne toliko po prisotnosti posameznih HOS, in sicer so prevladujoče HOS, ki smo jih identificirali v obeh sirih, imele manjšo vsebnost v Nanoškem siru, npr. butanojska kislina, očetna kislina, 2-pentanol. To verjetno doprinese k bolj nežni aromi Nanoškega sira v primerjavi s sirom Tolminc. Benzaldehid pa je bil prisoten samo v Nanoškem siru, zato sklepamo, da ima Nanoški sir nekoliko bolj »oreškasto« aromo tudi zaradi prisotnosti benzaldehida. Benzaldehid je namreč rezultat delovanja *Lb. helveticus*, ki je dodan v Nanoški sir kot SK.

Analizirani aromatski profili Nanoškega sira, ki je bil narejen iz različnih surovin, iz mleka s tipičnega območja za Nanoški sir ter iz mleka z drugega območja se nista razlikovala.

– Glede na hipotezo, da bodo znotraj aromatskega profila Nanoškega sira sezonsko pogojena nihanja zaradi prisotnosti paše, smo prišli do naslednjih zaključkov:

Znotraj aromatskega profila Nanoškega sira so bila opazna sezonsko pogojena nihanja zaradi različne osnovne krme (paše oziroma silaže). Aromatski profil

Nanoškega sira se je spreminjal bolj zaradi vsebnosti kot pa zaradi prisotnosti posameznih HOS in sicer je bila v zimski sezoni večja vsebnost prostih MK, v poletni sezoni pa višja vsebnost nekaterih terpenov.

Predpostavljamo, da so določene HOS, identificirane v siru, morda prešle iz krme oziroma mleka. Za nekatere v siru identificirane HOS, ki so imele večje koncentracije v določeni sezoni, smo ugotovili tudi večje koncentracije v krmi in mleku iz iste sezone. Med HOS iz krme oziroma mleka, ki bi utegnile prispevati k večji vsebnosti HOS v siru iz zimske sezone, so bile očetna kislina, heksanojska kislina, etil ester heksanojske kisline, etil ester heksanojske kisline ter 2-butanon, medtem ko so bili v poletni sezoni predvsem nekateri terpeni in toluen. Za vse našete HOS bi bilo potrebno glede prenosov iz krme oziroma mleka v sir še opraviti dodatne raziskave ter tudi ob vsem upoštevati fiziologijo prebavnega trakta in mlečne žleze. Poleg tega je lahko sezona zaradi različne osnovne krme tudi posredno vplivala na oblikovanje končne arome Nanoškega sira.

Ugotovljeno je bilo tudi, da na podlagi analize PCA hlebcev sira ne moremo ločiti med dvema različnima poletnima sezonama in jih ločimo lahko samo glede na poletno in zimsko sezono.

– Potrdili smo hipotezo, da se bodo vsebnosti določenih HOS v Nanoškem siru med zorenjem spreminjali.

Določenim HOS se je vsebnost spreminjala in sicer je večini HOS vsebnost z zorenjem naraščala, še posebej prostim MK in estrom. Po drugi strani pa smo pri nekaterih HOS opazili padajoči trend, ki je bil predvsem izrazit pri 2,3-butandionu (diacetil) in 3-hidroksi 2-butanonu (acetoin), ki imata aromo po maslu. Nakazali smo, da se je vsebnost nekaterih HOS spreminjala, ker so imeli vlogo prekurzorjev.

– V okviru hipoteze, da bodo različni pogoji zorenja vplivali na oblikovanje aromatskega profila Nanoškega sira, smo na podlagi manjših dodatnih poskusov prišli do nekaterih zaključkov, ki pa jih bi bilo potrebno ovrednotiti še z večjim številom meritev.

Sira, ki sta zorela na različnih lokacijah, se v aromatskem profilu nista bistveno razlikovala. Večja količina dodanih SK je prispevala k večji vsebnosti nekaterih HOS (npr. benzaldehid) ter prisotnosti novih HOS (npr. 2-furanmetanol). Višja temperatura zorenja pa prispeva na velikost in število očes v sirnem testu ter na vsebnost HOS, kot so nekateri estri in alkoholi. Tudi zorenje na tropinah je doprineslo k vsebnosti in tudi prisotnosti nekaterih estrov, kar bi lahko povezali z bolj intenzivno sadno noto.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Aroma sira je skupek zaznav, ki jih ljudje občutimo ob uživanju sira in so lahko prijetne, manj prijetne, tipične ali nespecifične. Aroma je kompleks hlapnih in nehlapnih organskih spojin. HOS, ki dajejo hrani specifičen vonj in okus oz. aromo, so lahko izrazito specifične in omogočajo nedvoumno razlikovanje mlečnih izdelkov.

Danes tako poznamo najrazličnejše vrste sirov, ki se med seboj razlikujejo v aromi. Končna aroma sira je tudi posledica tehnološkega postopka izdelave sira. Tako so razlike med vrstami sirov dobrodošle, ker nudijo pestrost izbire. Ista vrsta sira mora dosegati neko standardno kakovost, ki vrsto definira in jo naredi specifično. Kontrola posameznih tehnoloških korakov in vplivov nudi jasnejši vpogled v tiste faze proizvodnje sira, ki so ključne za njegovo končno kakovost in aromo. Nanoški sir je trdi tip sira, katerega prireja mleka in izdelava sta omejeni na določeno geografsko območje. Lokalne značilnosti, ki prispevajo k oblikovanju specifičnih lastnosti Nanoškega sira, so splet vseh tistih dejavnikov, ki vplivajo na proizvodnjo krme, na surovo mleko, proizvedeno na območju Nanoškega sira in na samo tehnologijo izdelave sira.

Na količino in raznovrstnost HOS v siru vplivajo številni dejavniki, tudi tisti ki smo jih vključili v našo nalogo, in sicer krma in mleko krav, sezona, čas zorenja, pogoji zorenja (temperatura, način zorenja) ter količina dodane SK.

Analitična metoda za določanje profila HOS v siru vključuje plinsko kromatografijo z masnim spektrometrom, za ekstrakcijo HOS pa smo uporabili SPME. Pri tej tehniki se na večslojno vlakno adsorbirajo HOS. Kljub temu da obstaja veliko tehnik za analizo spojin v plinski fazi, je vendar nekako najbolj uveljavljena SPME, ki so jo že uspešno vključili v analizo arome sira. Njena glavna prednost je odsotnost uporabe organskih topil, poleg tega je tehnika hitra, enostavna, specifična in občutljiva.

Osnovni namen naloge je bil identificirati HOS, ki določajo aromatski profil Nanoškega sira in prispevajo k oblikovanju njegove arome. Primerjali smo tudi njihove vrednosti v odvisnosti od sezone izdelave sira. Za vrednotenje arome Nanoškega sira smo spremljali tudi določene druge vplive, ki pripomorejo h končni aromi. Poleg sezone smo se tako še osredotočili še na čas zorenja ter na nekatere druge pogoje zorenja (temperatura, lokacija). Naloga vključuje tudi analizo aromatskih profilov vzorcev krme in mleka iz poletne in zimske sezone z namenom vrednotenja možnega vpliva krme in mleka na končno aromo sira.

V sklopu 1 smo zajeli analizo krme in mleko krav s tipičnega območja, kjer pridelujejo mleko namenjeno za predelavo v Nanoški sir. Krmo in mleko smo vzorčili pri istih rejcih tako v zimski kot v poletni sezoni. Glede na to, da je bila osnova obroka v zimski sezoni

travna silaža in poleti paša (sveža trava), smo v analizo vključili le ti dve krmi. V vzorcih krme smo identificirali kar 146 HOS, v mleku pa 54 različnih HOS, vendar vse HOS niso bile prisotne v vseh vzorcih krme oziroma mleka. Vzorci krme in mleka so se glede na sezono razlikovali tako po prisotnosti kot tudi po vsebnosti HOS. Navedli smo možne prehode za HOS, ki so bile v določeni sezoni prisotne tako v krmi kot tudi v mleku. Izpostavili smo nekatere HOS v krmi oziroma mleku, kjer so bile razlike med vzorci krme oziroma mleka glede na različno sezono (zimsko, poletno). Razlike med sezonama v vzorcih osnovne krme in mleka smo dobili s Wilcoxon-onovim testom za parne vzorce.

Poleg tega smo analizirali HOS iz osnovne krme in mleka, ki smo jih identificirali tudi v siru. Za nekatere v siru identificirane HOS, ki so imele večje vsebnosti v določeni sezoni smo ugotovili tudi večje vsebnosti v krmi in mleku iz iste sezone. Med HOS iz osnovne krme oziroma mleka, ki bi utegnile prispevati k večji vsebnosti HOS v siru iz zimske sezone, bi lahko uvrstili očetno kislino, heksanojsko kislino, etil ester heksanojske kisline, 2-butanon, v poletni sezoni pa terpene pinan, α -pinen, sabinen, limonen, p-cimen in β -kariofilen ter toluen. Pri vplivu sezone ne izključujemo dejstva, da je lahko sezona zaradi različne osnovne krme tudi posredno vplivala na oblikovanje končne arome Nanoškega sira. Silaža je namreč fermentirana krma in vsebuje MKB in že delno razgrajene hranilne snovi. Slednje je lahko vplivalo na mikrobioto vampa in tudi na nastanek spojin mleka. V poletni krmi (sveži travi) pa smo identificirali večjo vsebnost terpenov, za katere je ugotovljeno, da lahko spremenijo dinamiko mikroorganizmov, in sicer v vampu, v samem mleku ter tudi med izdelavo sira.

V okviru sklopa 2 smo v vzorcih Nanoškega sira, v katerih smo spremljali vpliv časa zorenja, identificirali 63 različnih HOS, ki niso bile vedno prisotne med zorenjem ter tudi niso bile prisotne v obeh sezonah. Med komponente z največjo vsebnostjo v Nanoškem siru spadajo 2-heptanon, 2-nonanon, butanojska in heksanojska kislina ter etil ester butanojske kisline. Slednje HOS so že identificirali v drugih trdih tipih sirov (npr. »Bitto«, »Regusano«, gauda, čedar, parmezan). Glede na to, da Nanoškemu siru pripisujejo blago oreškasto aromo, smo v njem identificirali tudi nekatere HOS, ki jih povezujejo z aromo po oreških in mandljih. Med temi HOS bi navedli benzaldehid, etil ester očetne kisline in toluen. Poleg tega smo ob koncu zorenja identificirali večjo vsebnost HOS, za katere je značilna sadna nota. Te HOS so bile 2-heptanon, 2-nonanon in etil ester butanojske kisline. Na podlagi teh ugotovitev bi lahko Nanoškemu siru pripisali nov vidik k senzorični oceni, to je sadna nota arome.

Znotraj aromatskega profila sira Nanoškega sira so bila opazna sezonsko pogojena nihanja. V zimski sezoni je bila večja vsebnost določenih prostih MK, in sicer heksanojske kisline, oktanojske kisline in dekanoske kisline, ki imajo izvor v maščobah ter MK 3-metil butanojske in 2-metil butanojske kisline, ki imata izvor v AK. Poleg tega so v zimski sezoni dosegli večje vsebnosti tudi nekateri estri, in sicer etil ester heksanojske kisline in

etil ester oktanojske kisline, v poletni sezoni bi izpostavili predvsem večjo vsebnost terpenov. Večjo vsebnost alkoholov smo opazili prav tako v poletni sezoni, vendar nismo našli povezav s krmo oziroma mlekom. V zimski sezoni pa smo opazili večjo vsebnost aldehydov. Večina aldehydov, identificiranih v Nanoškem siru, ima izvor v MK, ki so imele prav tako višje vsebnosti v zimski sezoni. Poleg tega smo tudi na podlagi analize PCA ugotovili, da se je Nanoški sir nekoliko razlikoval glede na zimsko in poletno sezono. Ugotovljeno je tudi bilo, da na podlagi analize PCA hlebcev sira ne moremo ločiti med dvema različnima poletnima sezonama.

Vsebnosti določenih HOS so se med zorenjem spreminjale. Od prostih MK je z zorenjem vsebnost naraščala še posebej 3-metil butanojski kislini, 2-metil butanojski kislini in heksanojski kislini. Glede na spreminjajoči trend ketonov med zorenjem bi lahko povzeli, da so večinoma prekursorji za druge HOS. Na primer metil ketoni, ki nastanejo v oksidaciji prostih MK, se lahko pretvorijo v sekundarne alkohole. V obeh sezonah sta imela 2-heptanon in 2-nonanon največje vsebnosti proti koncu zorenja. Diacetil, ki se lahko pretvori v acetoin, 2,3-butandiol in 2-butanon, pa je imel padajoči trend. Poleg 2,3-butandiona (diacetila) je imel trend padanja tudi 3-hidroksi 2-butanon (acetoin), ki velja za prekursorja 2-butanola. Vsebnost primarnega alkohola 1-heksanola je naraščala z zorenjem, kar bi lahko obrazložili s tem, da izvira iz prostih MK. Tudi vsebnost estrov je naraščala z zorenjem. Opazili smo, da je trend etil estra butanojske kisline sledil trendu butanojske kisline. To bi lahko obrazložili z dejstvom, da je vsebnost estrov odvisna od vsebnosti prekursorjev – prostih MK. Poleg tega so imeli etil ester heksanojske kisline in etil ester oktanojske kisline tako kot njihovi prekursorji večje vrednosti v zimski sezoni. Aldehydi so imeli med zorenjem podoben trend v obeh sezonah, in sicer je skupna vsebnost najprej narasla in nato padla. Aldehydi se namreč hitro reducirajo do primarnih alkoholov ali oksidirajo do določenih kislin.

Nanoški sir in sir Tolminc sta se razlikovala bolj po prisotnosti in vsebnosti določenih HOS, samo v Nanoškem siru pa je bil prisoten benzaldehid. Glede na rezultate lahko zaključimo, da ima Nanoški sir nekoliko bolj nežno aromo v primerjavi s sirom Tolminc. Poleg tega lahko sklepamo, da ima Nanoški sir nekoliko bolj »oreškasto« aromo tudi zaradi prisotnosti benzaldehida, ki je lahko rezultat delovanja *Lb. helveticus*, ki je dodan v Nanoški sir kot SK.

V zadnjem delu naloge smo predstavili rezultate manjših dodatnih poskusov, ki so oblikovali nekaj zanimivih zaključkov. Aromatski profili Nanoškega sira, ki je bil narejen iz različnih surovin, iz mleka s tipičnega območja za Nanoški sir (»odbrano« mleko) ter iz mleka z drugega območja (»neodbrano« mleko), se niso bistveno razlikovali. Prav tako se aromatski profil ni razlikoval zaradi različne lokacije zorenja. Poleg tega smo potrdili znana dejstva iz literature, da z višjo temperaturo zorenja lahko pomembno vplivamo na velikost in število oces v sirnem testu ter lahko pospešimo nastanek HOS. V siru, ki je zorel pri višji temperaturi, smo izmerili večje vsebnosti estrov in večje vsebnosti

alkoholov. Rezultati so tudi nakazali, da bi lahko višja temperatura zorenja vplivala na odsotnost oziroma nižjo vsebnost 2,3-butandiona (diacetila) in 3-hidroksi 2-butanon (acetoina), ki sta prekursorja za druge HOS. Največja vsebnost vseh komponent pa je bila določena v siru, izdelanem s povečano količino dodanih SK in zorenim pri višji temperaturi. Povečana količina SK je verjetno tudi pripomogla k večji vsebnosti benzaldehida, ki ima značilno noto po mandljih. Sir, ki je zorel na tropinah, so zaznamovali predvsem estri, tako po vsebnosti kot tudi po prisotnosti.

Končna aroma sira se oblikuje med zorenjem zaradi številnih faktorjev in reakcij, med drugim tudi zaradi mikroorganizmov, ki se lahko razlikujejo glede na različno krmo krav. Zaradi tega je težko proučiti vse HOS ter predpostaviti njihov izvor in vpliv na posamezno HOS. Če povzamemo rezultate naše študije, se končna aroma Nanoškega sira oblikuje med zorenjem. Poleg tega se aroma Nanoškega sira nekoliko razlikuje med sezonama, kljub dejstvu, da je mleko namenjeno predelavi v Nanoški sir termizirano, mlečna maščoba tipizirana ter da je tehnološki postopek vedno enak. Nekatere identificirane HOS v Nanoškem siru izvirajo tudi iz krme in mleka. Specifičen aromatski profil Nanoškega sira bi lahko še spremenili z višjo temperaturo zorenja in večjo količino SK, tako da bi imel nov spremenjen Nanoški sir večjo vsebnost HOS in s tem bolj intenzivno aromo. Rezultati naše raziskave podpirajo uporabo inštrumentalne analize za določanje arome sira, samostojno ali v kombinaciji s senzorično analizo. Bistvena prednost inštrumentalne analize je namreč izogibanje morebitnih odstopanj, ki nastanejo zaradi subjektivnega senzoričnega ocenjevanja. Zato je naša študija pomemben prispevek na področju razvoja kombiniranega pristopa določanja arome sira, in sicer s pomočjo instrumentalne in senzorične analize. Na tak način se lahko zagotovi bolj natančne, točne in zanesljive informacije o aromi posameznega sira. To je prva študija, ki je zajela spremembe HOS v zaščitenem slovenskem siru glede na zorenje in sezono ter je vključila morebiten prenos HOS iz krme in mleka. Rezultati študije so primerni kot modelni sistem pri drugih študijah trdega tipa sira zlasti tistih z zaščitenim geografskim poreklom.

6.2 SUMMARY

The flavour of cheese is a set of sensations made up of smell, taste and texture that people feel during eating and can be pleasant or unlikeable, typical or unspecified. The aroma is a complex of volatile and non-volatile organic compounds. Volatile organic compounds, which give food a specific smell and taste or aroma, can be highly specific and allow clear distinction between dairy products.

There are many types of cheese with various flavours available nowadays. The final flavour of cheese is also a consequence of the technological process of cheesemaking. Thus, the differences between the types of cheeses are welcome because they offer variety of choice. The same type of cheese must reach a certain quality control standard which defines it and makes it specific. The regulation and quality control of individual production steps affords clear insight into those stages of cheese production which are crucial to the final quality and flavour of a particular type of cheese. Nanos cheese is a hard type cheese, the milk production and production of which are limited to a specific geographic area. Characteristics that contribute to the creation of definitive properties of Nanos cheese are all area specific: local fodder, raw milk produced in the Nanos cheese area as well as the specific technology of cheesemaking itself.

In cheese the quantity and diversity of volatile and non-volatile organic compounds is affected by many factors, including those included in our study, namely: cow fodder and milk, season as well as time of ripening, ripening conditions (temperature, type of ripening) and the amount of added starter culture.

The analytical method for the determination of the profile of volatile organic compounds in cheese includes gas chromatography with the mass spectrometry. For the extraction of volatile organic compounds SPME was used. With this technique volatile organic compounds are adsorbed on the multilayer fibre. Despite the fact that there are many techniques for the analysis of compounds in the gas phase, the SPME is most established and it has already been successfully integrated into the analysis of cheese flavour. Its main advantage is the absence of organic solvents. In addition, the technique is rapid, simple, specific and acutely sensitive.

The primary aim of this study is to identify the volatile organic compounds which determine the aromatic profile of Nanos cheese and contribute to the formation of its flavour. We also compared their values according to the season when cheese was made. For the evaluation of Nanos cheese flavour we also monitored certain other factors which contribute to its final flavour. For example, we also focused on the ripening period and on some other ripening conditions (temperature, location). The study also includes the analysis of aromatic profiles of cattle fodder and milk samples from the summer and winter

seasons in order to evaluate the possible impact of fodder and milk itself on the final Nanos cheese flavour.

Part 1 includes the analysis of cattle fodder and milk from areas where milk for processing into Nanos cheese is produced. Fodder and milk were sampled at the same breeders in both summer and winter seasons. Given the fact that the basic fodder during the winter season was grass silage and in the summer grazing (fresh grass), only those two types of fodder were included in the analysis. In the fodder samples we identified 146 volatile organic compounds and in the milk 54 different volatile organic compounds, however not all volatile organic compounds were present in all the samples of cattle fodder as well as milk. According to the season the samples of fodder and milk, differed both in presence, as well as in the content of volatile organic compounds. We list possible transfers of volatile organic compounds, found in a particular season both in fodder as well as in milk. We highlight some volatile organic compounds in fodder or milk, which had shown significant differences between the fodder or milk samples depending on the season (winter, summer). Wilcoxon matched pair test was used to achieve this.

We also analysed volatile organic compounds found in the basic fodder and milk that was identified as present in cheese as well. For some volatile organic compounds identified in cheese where the content was greater in a particular season, a higher content of same was found in fodder and in milk from the same season. Volatile organic compounds from fodder or milk which could contribute to higher content of volatile organic compounds in cheese in the winter season might include: acetic acid, hexanoic acid, hexanoic acid ethyl ester, 2-butanone; whereas in the summer season these would be certain terpenes (pinan, α -pinene, sabine, limonene, p-cymene, β -caryophyllene) and toluene. The final flavour of the Nanos cheese can even be indirectly influenced by the seasonal variation of the fodder fed to cattle. Silage is fermented fodder containing lactic acid bacteria and nutrients which are already partially digested. This could have an effect on the rumen microbiota and the formation of milk compounds. In the summer fodder (fresh grass), we have identified higher levels of terpenes which are known to affect the dynamics of microorganisms in the rumen, milk, as well as during cheesemaking.

In part 2, where the influence of ripening was studied, 63 different volatile organic compounds were identified, which were not always present during ripening and were also not present in both seasons. Among the compounds with the maximum content in Nanos cheese are 2-heptanone, 2-nonanone, butanoic acid and hexanoic acid and butanoic acid ethyl ester. These volatile organic compounds have already been identified in other hard type cheeses (e.g. Bitto, Regusano, Gouda, Cheddar, Parmesan). Given that Nanos cheese has a nutty flavour some volatile organic compounds associated with the almond and nutty aroma were also identified. Among these volatile organic compounds benzaldehyde, acetic acid ethyl ester and toluene could be mentioned. As well as that, at the end of ripening a higher content of volatile organic compounds characterised with so called fruity flavour

(e.g. 2-heptanone, 2-nonanone, butanoic acid ethyl ester) were identified. Based on these findings a new sensory aspect could be attributed to the Nanos cheese.

Seasonal differences were noticed within the aromatic profile of Nanos cheese. In the winter season there was a higher content of certain fatty acids namely, hexanoic acid, octanoic acid and decanoic acid, all of which have the origin in fats and fatty acids. High in content were also 3-methyl butanoic and 2-methyl butanoic acid, having the origin in amino acids. In addition, in the winter season some esters had a higher content, e.g. hexanoic acid ethyl ester and octanoic acid ethyl ester. In the summer season terpenes were particularly of high values as well as that we also observed a higher value of alcohols, however we did not find any connections with fodder or milk. In the winter season a higher level of aldehydes was found. Most of the aldehydes identified in Nanos cheese have their origins in fatty acids, which also had higher levels in the winter season. In addition the seasonal difference was also noted on the basis of PCA analysis. However according to the PCA analysis, it was also noticed that there is no variation between two different summer seasons.

The content of volatile organic compounds changed during the ripening process. Among the free fatty acids, in particular the content of 3-methyl butanoic acid, 2-methyl butanoic acid and hexanoic acid increased. According to the oscillating trends of ketones during ripening, it could be summarized that they could be precursor for other compounds. For example, methyl ketones, resulting from oxidation of fatty acids, can convert to secondary alcohols. In both seasons 2-heptanone and 2-nonanone had the highest levels towards the end of maturing process. Diacetyl, which can convert to acetoin, 2,3-butanediol and 2-butanone, had a downward trend. In addition to 2,3-butanedione (diacetyl), acetoin (3-hidroxy 2-butanone), which could be precursor of 2-butanol, also had a downward trend. The content of primary alcohol 1-hexanol was increased during ripening, which could be explained by the fact that it has its origin in fatty acids. Even the content of esters was increased during the ripening. It was noticed that the trend of butanoic acid ethyl ester followed the trend of butanoic acid. This could be explained by the fact that the content of esters depends on the content of precursors (free fatty acids). Furthermore, hexanoic acid ethyl ester and octanoic acid ethyl ester as well as their precursors had higher value in the winter season. Aldehydes had a similar trend during ripening in both seasons, namely the total content increased at first and then decreased. Aldehydes, in fact, are rapidly reduced to primary alcohols or oxidized to certain acids.

Nanos and Tolmenc cheese differ more by the content of certain volatile organic compounds than their presence. However, benzaldehyde was found only in Nanos cheese. Based on the results we can conclude that Nanos cheese has a slightly less strong flavour in comparison with Tolmenc cheese. In addition, it can be concluded that Nanos cheese has a slightly more "nutty" flavour due to the presence of benzaldehyde, which may be the result of *Lb. helveticus*, which is added to Nanos cheese as a starter culture.

Results of some small preliminary tests with interesting conclusions are presented in the last part of the study. Aromatic profiles of Nanos cheese made from milk sourced from different geographic areas, i.e. milk from the usual Nanos cheese area ("selected" milk) and milk from other areas ("unselected" milk) were not significantly different. Also, the aromatic profile did not differ due to different locations of where cheese was ripened. In addition, we confirmed the known facts from scientific literature that a higher temperature of ripening can significantly influence the size and number of cheese eyes and also it can accelerate the volatile organic compound formation. In the cheese ripened at a higher temperature, higher content of esters and alcohols were measured. The results also indicated that the higher temperature of the ripening may affect the absence or low content of 2,3-butanedione (diacetyl) and 3-hydroxy 2-butanone (acetoin), which are precursors to the other volatile organic compounds. The maximum content of all compounds was determined in cheese manufactured with an increased amount of added starter culture and ripened at a higher temperature. The increased amount of starter culture was also likely to contribute to higher levels of benzaldehyde, which has a characteristic almond flavour. Cheese, ripened on grape skins, was especially marked with esters, both in terms of content as well as presence.

The final flavour of cheese is formed during maturing process due to numerous factors and reactions. Among others, it is formed by microorganisms, which may vary according to variations in cattle fodder. For this reason, it is difficult to consider all volatile organic compounds and assume their origin and their impact on an individual volatile compound. To summarize the results of our study, the final flavour of Nanos cheese is formed during ripening process. In addition, Nanos cheese flavour varies slightly between seasons, despite the fact that the milk intended for processing into Nanos cheese is thermized, has typified milk fat and the technological process is always the same. Some of the identified volatile organic compounds in Nanos cheese originate from fodder and milk. Specific aromatic profile of Nanos cheese could be changed with the higher ripening temperature and a higher amount of starter culture, thus the new Nanos cheese would have higher levels of volatile organic compounds and thus more intense flavour. The results of our study are an important contribution to the developing field of combined approach using instrumental and sensory methods to assure more accurate, precise and reliable information on volatile organic compounds in cheeses. Results of our study are an important contribution to the developing field of combined approach using laboratory and sensory methods to assure more accurate, precise and reliable information on volatile organic compounds in cheeses. This is the first study which deals with the changes in cheese during ripening process influenced by season and fodder system and the transfers of volatile organic compounds from fodder and milk to cheese in the case of traditional Nanos cheese. The results of this study could be used as a model system for other hard type cheeses especially those with Protected Designation of Origin.

7 VIRI

- Abilleira E., De Renobales M., Nájera A.I., Virto M., Gordo J. C., Pérez-Elortondo F. J., Albisu M., Barron L. J. 2010a. An accurate quantitative method for the analysis of terpenes in milk fat by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 120, 4: 1162–1169
- Abilleira E., Schlichtherle-Cerny H., Virto M., De Renobales M., Barron L. J. 2010b. Volatile composition and aroma-active compounds of farmhouse Idiazabal cheese made in winter and spring. *International Dairy Journal*, 20, 8: 537–544
- Alewijn M. 2006. The formation of fat-derived flavour compounds during the ripening of Gouda-type cheese. PhD–Thesis. Wageningen, Wageningen University: 136 str.
- Amenu B., Deeth H. C. 2007. The impact of milk composition on cheddar cheese manufacture. *Australian Journal of Dairy Technology*, 62, 3: 171–184
- Aminifar M., Hamed M., Emam-Djomeh Z., Mehdinia. A. 2014. Investigation on proteolysis and formation of volatile compounds of Lighvan cheese during ripening. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 10: 1–9
- Aminifar M., Emam-Djomeh Z. 2014. Changes of texture, microstructure and free fatty acid contents of lighvan cheese during accelerated ripening with lipase. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16: 113–123
- Al-Attabi Z., D’Arcy B. R., Deeth H. C. 2009. Volatile sulphur compounds in UHT milk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 1: 28–47
- Attaie R. 2009. Quantification of volatile compounds in goat milk Jack cheese using static headspace gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, 92, 6: 2435–2443
- Avsar Y. K., Karagul-Yuceer Y., Drake M. A., Singh T. K., Yoon Y., Cadwallader K. R. 2004. Characterization of nutty flavor in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 87, 7: 1999–2010
- Ayad E. H., Verheul A., Wouters J., Smit G. 2000. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal*, 10, 3: 169–179
- Babnik D., Verbič J. 2003. Vpliv dolgotrajnega skladiščenja travne silaže na njeno hranilno vrednost in kakovost. *Zbornik Biotehniške fakultete*, 82, 2: 109–117
- Bajt N. 2011. Tehnologija mleka. Konzorcij višjih strokovnih šol za izvedbo projekta IMPLETUM. Ljubljana, Zavod IRC: 97 str.
- Bajt N., Golc-Teger S. 2005. Izdelava jogurta, skute in sira. 2. izd. Ljubljana, Kmečki glas: 142 str.

- Barbieri G., Bolzoni L., Careri M., Mangia A., Parolari G., Spagnoli S., Virgili R. 1994. study of the volatile fraction of parmesan cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 5: 1170–1176
- Bastič M. 2006. Metode raziskovanja. Maribor, Univerza v Mariboru, Ekonomsko poslovna fakulteta Maribor: 51 str.
<http://www.shrani.si/f/2J/WJ/1HkYy8qF/file.pdf> (23. apr. 2014).
- Becker M. E., Kumar S. 1965. Synthesis of butyric and other short-chain acids by a partially purified enzyme preparation. *Biochemistry*, 4, 9: 1839–1843
- Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. 2009. Food chemistry. 4th ed. Berlin, Springer: 342–408
- Bendall J. G. 2001. Aroma compounds of fresh milk from New Zealand cows fed different diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 10: 4825–4832.
- Beresford T. 2000. Key flavour compounds of Cheddar cheese. End of Project Report 1999, DPRC no. 27. Dublin, Teagasc: 11 str.
<http://www.teagasc.ie/research/reports/dairyproduction/4337/eopr-4337.pdf> (11. okt. 2014)
- Berezińska A., Bzducha A., Obiedzinski M. 2007. Investigation of the applicability of SPME-GC-MS technique and principal component analysis in the evaluation of a volatile fraction of blue-veined cheeses. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57, 4: 7–11
- Bergère J. L., Lenoir J., 2000. Cheese manufacturing accidents and cheese defect. V: Cheesemaking from science to quality assurance. Eck A., Gillis J. C. (eds.). Paris, Lavoisier Publishing Inc.: 477–506
- Bourdat-Deschamps, M., D. Le Bars, M. Yvon, and M.P. Chapot-Chartier. 2004. Autolysis of *Lactococcus lactis* AM2 stimulates the formation of certain aroma compounds from amino acids in a cheese model. *International Dairy Journal*, 14, 9: 791–800
- Broome M. C., Powell I. B., Limsowtin G. K. Y. 2003. Cheese: Starter cultures: specific properties. V: Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 1. Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. E. (eds.). London, Academic Press: 269–275
- Brulè G., Lenoir J., Remeuf F. 2000. The casein micelle and milk coagulation. V: Cheesemaking from science to quality assurance. Eck A., Gillis J. C. (eds.). Paris, Lavoisier Publishing Inc.: 7–38
- Bunch Kristensen J. M. 1999. Cheese technology - A Northern European approach. Aarhus, International Dairy Books: 201 str.

- Buchin S., Delague V., Duboz G., Berdague J.L., Beuvier E., Pochet S., Grappin R. 1998. Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavor characteristics of a semi-hard cheese. *Journal of Dairy Science*, 81, 12: 3097–3108
- Buchin S., Martin B., Dupont D., Bornard A., Achilleos C. 1999. Influence of the composition of Alpine highland pasture on the chemical, rheological and sensory properties of cheese. *Journal of Dairy Research*, 66, 4: 579–588
- Bugaud C., Buchin S., Hauwuy A., Coulon J.-B. 2001. Relationships between flavour and chemical composition of Abondance cheese derived from different types of pastures. *Le Lait*, 81, 6: 757–773
- Burbank H. M., Qian M. C. 2005. Volatile sulfur compounds in Cheddar cheese determined by headspace solid-phase microextraction and gas chromatograph-pulsed flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1066, 1–2: 149–157
- Cakmakci S., Gundogdu E., Hayaloglu A. A., Dagdemir E., Gurses M., Cetin B., Tahmas-Kahyaoglu D. 2012. Chemical and microbiological status and volatile profiles of mouldy Civil cheese, a Turkish mould-ripened variety. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 11: 2405–2412
- Calbert H. E., Price W. V. 1949. A study of the diacetyl in cheese. I. Diacetyl content and flavor of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 32, 6: 515–520
- Canteri G. 2000. Lactic starters. V: Cheesemaking from science to quality assurance. Eck A., Gillis J. C. (eds.). Paris, Lavoisier Publishing Inc.: 164–182
- Carpino S., Mallia S., La Terra S., Melilli C., Licitra G., Acree T. E., Barbano D. M., Van Soest P. J. 2004. Composition and aroma compounds of Ragusano cheese: native pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*, 87, 4: 816–830
- Casey M. G., Häni J. P., Gruskovnjak J., Schaeren W., Wechsler D. 2006. Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO cheese. *Le Lait*, 86, 6: 407–414
- Centeno J. A., Fernandez-Garcia E., Gaya P., Tomillo J., Medina M., Nunez M. 2004. Volatile compounds in cheeses made from raw ewes milk ripened with a lactic culture. *Journal of Dairy Research*, 71, 3: 380–384
- Charve J. I. 2011. Prediction of mandarin juice flavor: A flavoromic approach. Ph.D. Thesis. Minnesota, University of Minnesota: 210 str.
- Chávarri F., Angeles Bustamante M., Santisteban A., Virto M., Barrón L. J. R., De Renobales M. 1999. Changes in free fatty acids during ripening of idiazabal cheese

- manufactured at different times of the year. *Journal of Dairy Science*, 82, 5: 885–890
- Chemicaland21. 2013a. 2-BUTANOL. Chemicaland21.com: 2 str.
<http://www.chemicaland21.com/industrialchem/solalc/2-BUTANOL.htm>. (18. jun. 2013)
- Chemicaland21. 2013b. 2,3-HEPTANEDIONE. Chemicaland21.com: 2 str.
<http://www.chemicaland21.com/specialtychem/perchem/2,3-HEPTANEDIONE.htm> (3. feb. 2014)
- Chin H. W., Bernhard R. A., Rosenberg M. 1996. Solid phase microextraction for cheese volatile compound analysis. *Journal of Food Science*, 61, 6: 1118–1123
- Choisy C., Guegen M., Lenoir J., Schmidt J.L., Tourneur C. 2000a. Microbial phenomena. V: *Cheesemaking from science to quality assurance*. Eck A., Gillis J. C. (eds.). Paris, Lavoisier Publishing Inc.: 353–417
- Choisy C., Leonir J., Desmazeaud M. 2000b. The biochemistry of ripening. V: *Cheesemaking from science to quality assurance*. Eck A., Gillis J. C. (eds.). Paris, Lavoisier Publishing Inc.: 82–143
- Collins Y. F., McSweeney P. L. H., Wilkinson M. G. 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13, 11: 841–866
- Collins F., McSweeney P. L. H., Wilkinson M. G. 2004. Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese. V: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. 1. General aspect. Fox P. F., McSweeney P. L., Cogan T. M., Guinee T. P. (eds.). 3rd ed. London, Elsevier: 373–389
- Cornu A., Kondjoyan N., Martin B., Verdier-Metz I., Pradel P., Berdagué J.-L., Coulon J.-B. 2005. Terpene profiles in Cantal and Saint-Nectaire-type cheese made from raw or pasteurised milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 12: 2040–2046
- Cornu A., Rabiau N., Kondjoyan N., Verdier-Metz I., Pradel P., Tournayre P., Berdagué J.L., Martin B. 2009. Odour-active compound profiles in Cantal-type cheese: Effect of cow diet, milk pasteurization and cheese ripening. *International Dairy Journal*, 19, 10: 588–594
- Correa Lelles Nogueira M., Lubachevsky G., Rankin S. A. 2005. A study of the volatile composition of Minas cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 5: 555–563
- Coulon J. B., Delacroix-Buchet A., Martin B., Pirisi A. 2004. Relationships between ruminant management and sensory characteristics of cheeses: a review. *Le Lait*, 84, 3: 221–241

- Curioni P. M. G., Bosset J. O. 2002. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12, 12: 959–984
- Danner H., Holzer M., Mayrhuber E., Braun R. 2003. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 562–567
- Deetae P., Mounier J., Bonnarne P., Spinnler H. E., Irlinger F., Helinck S. 2009. Effects of *Proteus vulgaris* growth on the establishment of a cheese microbial community and on the production of volatile aroma compounds in a model cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 4: 1404–1413
- Delgado F. J., González-Crespo J., Cava R., García-Parra J., Ramírez R. 2010. Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. *Food Chemistry*, 118, 1: 182–189
- Delgado F. J., González-Crespo J., Cava R., Ramírez R. 2011. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. *Food Chemistry*, 129, 3: 1156–1163
- Di Cagno R., Buchin S., De Candia S., De Angelis M., Fox P. F., Gobbetti M. 2007. Characterization of Italian cheeses ripened under nonconventional conditions. *Journal of Dairy Science*, 90, 6: 2689–2704
- DOOR. 2014. Denomination information: Nanoški sir. Brussels, DOOR - European Commission: 1 str.
<http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/registeredName.html?denominationId=10206> (14. okt. 2014)
- El Soda M., Madkor S. A., Tong P. S. 2000. Adjunct cultures: recent developments and potential significance to the cheese industry. *Journal of Dairy Science*, 83, 4: 609–619
- Engels W. J. M., Dekker R., De Jong C., Neeter R., Visser S. 1997. A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7, 4: 255–263
- Fernández-García E., Carbonell M., Nunenz M. 2002a. Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese. 1. Comparison of raw and pasteurized milk cheese. *Journal of Dairy Research*, 69, 4: 579–593
- Fernández-García E., Serrano C., Nuñez M. 2002b. Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese. 2. Seasonal variation. *Journal of Dairy Research*, 69, 4: 595–604

- Fontana C., Cappa F., Rebecchi A., Cocconcelli P. S. 2010. Surface microbiota analysis of Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio di Fossa Italian cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 3: 205–211
- Fox P. F., Lucey J. A., Cogan T. M. 1990. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 29, 4: 237–253
- Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., McSweeney P. L. H. 2000. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg, Springer Science & Business Media: 587 str.
- Fox P. F., Cogan T. M. 2004. Factors that affect the quality of cheese. V: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. 1. General aspects. Fox P. F., McSweeney Paul L., Cogan T. M., Guinee T. P. (eds.). 3rd ed. London, Elsevier: 583–607
- Frank D. C., Owen C. M., Patterson J. 2004. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, 2: 139–154
- Gandolfi R., Gaspari F., Franzetti L., Molinari F. 2000. Hydrolytic and synthetic activities of esterases and lipases of non-starter bacteria isolated from cheese surface. *Annals of Microbiology*, 50, 2: 183–189
- Garde S., Avila M., Medina M., Nunez M., 2005. Influence of a bacteriocin-producing lactic culture on the volatile compounds, odour and aroma of Hispánico cheese. *International Dairy Journal*, 15,10: 1034–1043
- Gioacchini A. M., De Santi M., Guescini M., Brandi G., Stocchi V. 2010. Characterization of the volatile organic compounds of Italian “Fossa”cheese by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 23: 3405–3412
- Grappin R., Beuvier E. 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7, 12: 751–761
- Hantsis-Zacharov E., Halpern M. 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 22: 7162–7168
- Hermier J., Cerf O. 2004. Heat treatments. V: *Cheesemaking from science to quality assurance*. Eck A., Gillis J. C. (eds.). Paris, Lavoisier Publishing Inc.: 239–242

- Högnadóttir A., Rouseff R. L. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 998, 1-2: 201–211
- IDF 161A. Milk : quantitative determination of bacteriological quality : guidance on evaluation of routine methods. 1995: 15 str.
- Ilić M. D., Milanović S. D., Carić M. D. J., Kanurić K. G., Vukić V. R., Hrncez D. V., Ranogajec M. I. 2012. Volatile compounds of functional dairy products. *Acta Periodica Technologica*, 43: 11–19
- Irlinger F., Mounier J. 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 2: 142–148
- ISO 7954. Microbiology - General guidance for the enumeration of yeast and moulds - Colony count technique at 25 °C. 1987: 3 str.
- ISO 9622 / IDF 141. Milk and liquid milk products - Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry. 2nd ed.. 2013: 14 str.
- ISO 21187 / IDF 196. Milk - Quantitative determination of bacteriological quality - Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results. 2004: 13 str.
- ISO 4833-1. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. 2013: 9 str.
- Jaster H., De Campos A. C. L. P., Auer L. B., Los F. G. B., Salem R. D. S., Esmerino L. A., Nogueira A., Demiate I. M. 2014. Quality evaluation of parmesan-type cheese: a chemometric approach. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34, 1: 181–188
- Jerič D., Milošević G., Čop T. 2007. Zaščita izdelkov višje kakovosti kot možnost razvoja kmetijstva v Pomurju. V: Slovensko kmetijstvo in podeželje v Evropi, ki se širi in spreminja 7. konferenca DAES, Moravske Toplice, 8–9. nov. Kavčič S. (ur.). Ljubljana, Društvo agrarnih ekonomistov Slovenije: 305–315
- Johnson M., Law B. A. 2010. The origins, development and basic operations of cheesemaking technology. V: *Technology of cheesemaking*. Law B. A., Tamime A. Y. (eds.). 2nd ed. Oxford, Wiley-Blackwell: 68–97
- Jung H. J., Ganesan P., Lee S. J., Kwak H. S. 2013. Comparative study of flavor in cholesterol-removed Gouda cheese and Gouda cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 96: 1972–1983

- Kalač P. 2011. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: a review. *Food Chemistry*, 125: 307–317
- Keen A. R., Walker N. J., Peberdy M. F. 1974. The formation of 2-butanone and 2-butanol in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 41, 2: 249–257
- Kirste B. 1998. Terpenes. Berlin, Institute of Chemistry, Department of Biology, Chemistry, Pharmacy, FU Berlin: 1 str.
http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/oc/terpene/terpene_en.html (21. jan. 2014).
- Klein N., Maillard M. B., Thierry A., Lortal S. 2001. Conversion of amino acids into aroma compounds by cell-free extracts of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 3: 404–411
- Kocaoglu-Vurma N. A., Harper W. J., Drake M. A., Courtney P. D. 2008. Microbiological, chemical and sensory characteristics of Swiss cheese manufactured with adjunct *Lactobacillus* strains using a low cooking temperature. *Journal of Dairy Science*, 91, 8: 2947–2959
- Košmelj K. 2007. Metoda glavnih komponent: osnove in primer. *Acta agriculturae Slovenica*, 89, 1: 159–172
- Kourkoutas Y., Bosnea L., Taboukos S., Baras C., Lambrou D., Kanellaki M. 2006. Probiotic cheese production using *Lactobacillus casei* cells immobilized on fruit pieces. *Journal of Dairy Science*, 89, 5: 1439–1451
- Kraggerud H., Wold J. P., Høy M., Abrahamsen R. K. 2009. X-ray images for the control of eye formation in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 2: 147–153
- Langler J. E. 1966. Flavor chemistry of Swiss cheese. PhD-Thesis. Corvallis, Oregon State University: 71 str.
<http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/handle/1957/26791> (24. apr. 2014)
- Law B. A. 2010. Cheese-ripening and cheese flavour technology. V: Technology of cheesemaking. Law B. A., Tamime A. Y. (eds.). 2nd ed. New Delhi, Wiley-Blackwell: 231–329
- Lawlor J. B., Delahunty C. M., Wilkinson M. G., Sheehan J. 2002. Relationships between the gross, non-volatile and volatile compositions and the sensory attributes of eight hard-type cheeses. *International Dairy Journal*, 12, 6: 493–509
- Le Quèrè J., Molimard P. 2003. Cheese: Cheese flavour V: Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 1. Roginski H., Fuquary J.W., Fox P. F. (eds.). London, Academic Press: 330–340

- Lindmark Månsson H. 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food & Nutritional Research*, 52: 1–3
- Liu S. Q., Holland R., Crow V. L. 1998. Ethyl butanoate formation by dairy lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 8, 7: 651–657
- Liu S. Q., Holland R., Crow V. 2003. Synthesis of ethyl butanoate by a commercial lipase in aqueous media under conditions relevant to cheese ripening. *Journal of Dairy Research*, 70, 3: 359–363
- Liu S. Q., Holland R., Crow V. L. 2004. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 14, 11: 923–945
- Maconi E., Aragozzini F. 1989. Stereoselective reduction of non-cyclic ketones with lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31: 29–31
- Mahari T., Gashe B. A. 1990. A survey of the microflora of raw and pasteurized milk and the sources of contamination in a milk processing plant in Addis Ababa, Ethiopia. *Journal of Dairy Research*, 57, 2: 233–238
- Mallia S., Fernandez-Garcia E., Olivier Bosset J. 2005. Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses. *International Dairy Journal*, 15, 6: 741–758
- Mariaca R. G., Berger T. F., Gauch R., Imhof M. I., Jeangros B., Bosset J. O. 1997. Occurrence of volatile mono- and sesquiterpenoids in highland and lowland plant species as possible precursors for flavor compounds in milk and dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 11: 4423–4434
- Martin B., Verdier-Metz I., Buchin S., Hurtaud C., J. B. 2005. How do the nature of forages and pasture diversity influence the sensory quality of dairy livestock products? *Animal Science*, 81: 205–212
- Mauriello G., Moio L., Genovese A., Ercolini. 2003. Relationships between flavoring capabilities, bacterial composition, and geographical origin of natural whey cultures used for traditional water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, 86: 486–497
- McSweeney P. L. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 2–3: 127–144
- McSweeney P. L., Sousa M. J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80, 3: 293–324
- Milosavljević N. P., Blagojević P. D., Savić D. S., Radulović N. S. 2012. Application of HS-SPME-GC-MS-derived variables for monitoring ripening-induced changes in cheese volatile compounds. *Dairy Science & Technology*, 92, 4: 321–333

- Mohar Lorbeg P. 2008. Fenotipska in genotipska raznolikost enterokokov iz tradicionalnih slovenskih sirov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta: 134 str.
- Moio L., Rillo L., Ledda A., Addeo F. 1996. Odorous constituents of ovine milk in relationship to diet. *Journal of Dairy Science*, 79, 8: 1322–1331
- Molimard P., Spinnler H. E. 1996. Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science*, 79, 2: 169–184
- Morales P., Feliu I., Fernandez-Garcia E., Nun M. 2004. Volatile compounds produced in cheese by *Enterobacteriaceae* strains of dairy origin. *Journal of Food Protection*, 67, 3: 567–573
- Morand-Fehr P., Fedele V., Decandia M., Le Frileux Y. 2007. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 1–2: 20–34
- Morgan F., Gaborit P. 2001. The typical flavour of goat milk products: technological aspects. *International Journal of Dairy Technology*, 54, 1: 38–40
- Mounchili A., Wichtel J. J., Bosset J.O., Dohoo I. R., Imhof M., Altieri D., Mallia S., Stryhn H. 2005. HS-SPME gas chromatographic characterization of volatile compounds in milk tainted with off-flavour. *International Dairy Journal*, 15, 12: 1203–1215
- Nanoški sir GIZ. 2013. Specifikacija Nanoški sir. Vipava, Nanoški sir GIZ: 28 str. http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/Varna_in_kakovostna_hrana_in_krma/zasciteni_kmetijski_pridelki/Specifikacije/NANOSKI_-_spec._junij_2013.pdf (feb. 2014)
- Nateghi L. 2012. Effects of different adjunct starter cultures on proteolysis of reduced fat Cheddar cheese during ripening. *African Journal of Biotechnology*, 11, 61: 1–6
- Nuath K. R., Hynes J. T., Harris R. D. 1992. Cheese. V: *Encyclopedia of food science and technology*. Vol. 1. Hui Y. H. (ed.). New York, J. Wiley & Sons: 333–348
- Ortigosa M., Bárcenas P., Arizcun C., Pérez-Elortondo F., Albisu M., Torre. P. 1999. Influence of the starter culture on the microbiological and sensory characteristics of ewe's cheese. *Food Microbiology*, 16, 3: 237–247
- Ortigosa M., Torre P., Izco J. M. 2001. Effect of pasteurization of Ewe's milk and use of a native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of roncal cheese. *Journal of Dairy Science*, 84, 6: 1320–1330
- Osman A., Hamed O. I., Zalingei S., Owni E. 2009. Effect of storage temperature on weight loss, chemical composition, microbiological properties and sensory

- characteristics of white cheese (Gibna Bayda). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5, 4: 498–505
- Ozcan T., Kurdal E. 2012. The effects of using a starter culture, lipase, and protease enzymes on ripening of Mihalic cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 4: 585–593
- Palmquist D. L. 2006. Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon V: Advanced dairy chemistry. Vol. 2. Fox P. F., McSweeney P. L. H. (eds.). 3rd ed. Cork, Springer Science + Business Media, Inc. 43–92
- Panseri S., Chiesa L. M., Biondi P. A., Cantoni C. 2009. Head space-solid phase microextraction for characterization of volatile compounds and microbiological parameters in milk tainted with off-flavour. *Milchwissenschaft*, 64, 4: 372–375
- Parente E. 2010. Starter. I principali gruppi di batteri nelle fermentazioni alimentari. Potenza, Università degli Studi della Basilicata: 2 str.
<http://www2.unibas.it/parente/Starter/gruppi.html>. (24. mar. 2014)
- Parente E., Cogan T. M. 2003. Cheese: Starter cultures : General aspects. V: Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 1. Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. E. (eds.). London, Academic Press: 123–147
- Park Y. W. 2001. Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 84: 84–92
- Perotti M. C., Mercanti D.J., Bernal S.M., Zalazar C.A. 2009. Characterization of the free fatty acids profile of Pategrás cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 3: 331–338
- Petersen M. A., Kristensen H. T., Bakman M., Varming C., Jensen M. E. P., Ardö Y. M. 2010. Aroma formation in a cheese model system by different *Lactobacillus helveticus* strains. V: Expression of multidisciplinary flavour science: proceedings of the 12th Weurman Symposium, Switzerland, 2008. Blank I., Wüst M., Yeretizian C. (eds.). Zurich, University of Applied Sciences: 367–370
http://curis.ku.dk/ws/files/32642929/Weurman_2008_Petersen_et_al.pdf (19. dec. 2013)
- Pillonel L., Ampuero S., Tabacchi R., Bosset J. 2003. Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese: volatile compounds by GC/MS-FID and electronic nose. *European Food Research and Technology*, 216, 2: 179–183
- Pinho O., Pérès C., Ferreira I. M. P. L. V. 2003. Solid-phase microextraction of volatile compounds in “Terrincho” ewe cheese: Comparison of different fibers. *Journal of Chromatography A*, 1011, 1–2: 1–9

- Potočnik K., Štepec M., Krsnik J., Gorjanc G., Čepon M. 2013. Poročilo o genotipizaciji telet rjave pasme. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 91 str.
- Poveda J. M., Sánchez-Palomo E., Pérez-Coello M. S., Cabezas L. 2008. Volatile composition, olfactometry profile and sensory evaluation of semi-hard Spanish goat cheeses. *Dairy Science and Technology*, 88, 3: 355–367
- Powell I. B., Broome M. C., Limsowtin G. K. Y. 2003. Cheese: Starter cultures: general aspect. V: *Encyclopedia of dairy sciences*. Vol. 1. Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. E. (eds.). London, Academic Press: 261–268
- Pravilnik o veterinarskih pogojih za proizvodnjo in dajanje na trg surovega mleka, toplotno obdelanega mleka in mlečnih izdelkov. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 28: 83–97
- Qian M., Reineccius G. 2002. Identification of aroma compounds in Parmigiano-Reggiano cheese by gas chromatography/olfactometry. *Journal of Dairy Science*, 85, 6: 1362–1369
- Randazzo C. L., De Luca S., Todaro A., Restuccia C., Lanza C. M., Spagna G., Caggia C. 2007. Preliminary characterization of wild lactic acid bacteria and their abilities to produce flavour compounds in ripened model cheese system. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2: 427–435
- Randazzo C. L., Pitino I., Ribbera A., Caggia C. 2010. Pecorino Crotonese cheese: study of bacterial population and flavour compounds. *Food Microbiology*, 27, 3: 363–374
- Ratray R. P. 2003. Cheese: Secondary cultures. V: *Encyclopedia of dairy sciences*. Vol. 1. Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. E. (eds.). London, Academic Press: 275–281
- Renčelj, S., Perko B., Bogataj J. 1995. Siri-nekdaj in danes. Ljubljana, ČŽD Kmečki glas: 208 str.
- Rogelj I., Perko B. 2003. Mlečni izdelki. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 541–578
- Rondič N. 1996. Površinska mikroflora nanoškega sira. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 61 str.
- Schlichtherle-Cerny H., Imhof M. I., Fernández G. E., Bosset J. O. 2007. From pasture to cheese: changes in terpene composition. V: *Flavor of dairy products*. Cadwallader K. R., Drake M. A., McGorin R. J. (eds.). ACS Symposium Series. Washington, American Chemical Society: 123–133
- Schuetz P., Guggisberg D., Jerjen I., Fröhlich-Wyder M. T., Hofmann J., Wechsler D., Flisch A., Bisig W., Sennhauser U., Bachmann H. P. 2013. Quantitative

- comparison of the eye formation in cheese using radiography and computed tomography data. *International Dairy Journal*, 31, 2: 150–155
- Schulz H. 1991. Beta oxidation of fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1081, 2: 109–120
- Shipe W. F., Ledford R. A., Peterson R. D., Scanlan R. A., Geerken H. F., Dougherty R.W., Morgan M. E. 1962. Physiological mechanisms involved in transmitting flavors and odors to milk. II. Transmission of some flavor components of silage. *Journal of Dairy Science*, 45, 4: 477–480
- Singh T. K., Drake M. A., Cadwallader K. R. 2003. Flavor of Cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 4: 166–189
- Slanovec T. 1982. *Sirarstvo*. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 175 str.
- Smit G., Smit B. A., Engels W. J. M. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 3: 591–610
- Smole Možina S., Raspor. 1994. Starter kulture v živilstvu. V: Aditivi. 16. Bitenčevi živilski dnevi, 1. simpozij živilcev Slovenije, Bled, junij 1994. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 99–108
- Sousa M. J., Ardo Y., McSweeney P. L. H. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 4-7: 327–345
- Srikandakumar A., Johnson E. H., Nsanzi H., Al-Abri K. S. 2004. Microbes and anti-microbial substances in pasteurized milk sold in Oman. *International Journal of Food Properties*, 7, 3: 615–627
- Stamples C. R. 2006. Milk fat depression in dairy cows—Influence of supplemental fats. V: 17th symposium. Florida ruminant nutrition symposium. Gainesville, University of Florida: 122–138
- Statistica. 10, 2011. Team EAT. Tulsa, Stat Soft. Inc: programska oprema
- Stefanon B., Procida G. 2004. Effects of including silage in the diet on volatile compound profiles in Montasio cheese and their modification during ripening. *Journal of Dairy Research*, 71, 1: 58–65
- Stuknyte M., Cattaneo S., Masotti F., De Noni I. 2014. Variations in the volatile fraction of bitto cheese produced during herd transhumance. *Italian Journal of Food Science* 26, 2: 197–202

- Sunesen L. O., Lund P., Sørensen J., Hølmer G. 2002. Development of volatile compounds in processed cheese during storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 35, 2: 128–134
- Sympoura F., Cornu A., Tournayre P., Massouras T., Berdagué, J. L. Martin B. 2009. Odor compounds in cheese made from the milk of cows supplemented with extruded linseed and α -tocopherol. *Journal of Dairy Science*, 92, 7: 3040–3048
- Šabec S. 1964. Osnove sirarske tehnologije. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 157 str.
- Tamime A. Y. 2002. Microbiology of starter cultures. V: *Dairy microbiology handbook*. 3rd ed. Robinson R. K. (ed.). New York, John Wiley & Sons, Inc.: 261–366
- Tarakci Z., Tuncturk Y. 2008. The effect of adjunct cultures on some chemical and biochemical properties of white-brined cheese. *Journal of Food Biochemistry*, 32, 4: 490–505
- Terpene (chemical compound). 2014. Chicago, Encyclopedia Britannica Inc.: 1 str. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/588086/terpene> (21 jan. 2014).
- Tompa G. 2005. Terpeni v tradicionalnih slovenskih sirih. Diplomaska naloga. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Oddelek za živilstvo: 54 str.
- Tompa G., Susič R., Rogelj I., Pompe M. 2013. Cryotrap/SPME/GC/MS Method for profiling of monoterpenes in cheese and their clustering according to geographic origin. *Acta Chimica Slovenica*, 60, 3: 595–603
- Tornambé G., Cornu A., Pradel P., Kondjoyan N., Carnat A. P., Petit M., Martin B. 2006. Changes in terpene content in milk from pasture-fed cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 6: 2309–2319
- Toso B., Procida G., Stefanon B. 2002. Determination of volatile compounds in cows' milk using headspace GC-MS. *Journal of Dairy Research*, 69, 4: 569–577
- Tunick M. H. 2014. The science of cheese. New York, Oxford University Press: 281 str.
- Upadhyay V. K., McSweeney P. L. H., Magboul A. A. A., Fox P. F. 2004. Proteolysis in cheese during ripening. V: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. 1. Fox P. F., McSweeney P. L. H., Cogan T. M., Guinee T. P. (eds.). 3rd ed., General aspects. London, Elsevier: 391–433
- Urbach G. 1990. Effect of feed on flavor in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 73, 12: 3639–3650
- Urbach G. 1997. The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: Contribution of volatile compounds. *International Journal of Dairy Technology*, 50, 3: 79–89
- Ur-Rehman S. U., Banks J. M., Brechany E. Y., Muir D. D., McSweeney P. L. H., Fox P. F. 2000. Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of

- Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. *International Dairy Journal*, 10, 1–2: 55–65
- Van den Berg G., Exterkate F. A. 1993. Technological parameters involved in cheese ripening. *International Dairy Journal*, 3, 4-6: 485–507
- Van Kranenburg R., Kleerebezem M., Van Hylckama Vlieg J., Ursing B. M., Boekhorst J., Smit B. A., Ayad E. H. E., Smit G., Siezen R. J. 2002. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*, 12, 2: 111–121
- Van Leuven I. 2008. Aroma characterisation of Gouda-type cheeses. *International Dairy Journal*, 18, 8: 790–800
- Verzera A., Condurso C., Ziino M., Romeo V., Todaro M., Conte F., Dima G. 2010. Free fatty acids and other volatile compounds for the characterisation of “Vastedda della valle del Belice” cheese. *CyTA – Journal of Food*, 8, 3: 237–243
- Verzera A., Ziino M., Condurso C., Romeo V., Zappalà M. 2004. Solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for rapid characterisation of semi-hard cheeses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380, 7: 930–936
- Wolf I. V., Perotti M. C., Bernal S. M., Zalazar C. A. 2010. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. *Food Research International*, 43, 4: 1204–1211
- Wouters J., Ayad E. H., Hugenholtz J., Smit G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12, 2-3: 91–109
- Zhang S., Yang R., Zhao W., Hua X., Zhang W., Zhang Z. 2011. Influence of pulsed electric field treatments on the volatile compounds of milk in comparison with pasteurized processing. *Journal of Food Science*, 76: 127–132
- Zeppa G., Giordano M., Bertolino M., Gerbi V. 2004. Use of mono-and sesquiterpenes for characterisation of mountain cheeses. *Acta Agriculturae Slovenica*, 84, 1: 17–23
- Zeppa G., Rolie L. 2008. A study on organic acid, sugar and ketone contents in typical Piedmont cheeses. *Italian Journal of Food Science*, 20, 1: 127–139
- Zoon P., Allersma D. 1996. Eye and crack formation in cheese by carbon dioxide from decarboxylation of glutamic acid. *Nederlands Melk en Zuiveltijdschrift*, 50, 2: 309–318

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem se mentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič, da je bila pripravljena sprejeti mentorstvo, za njene strokovne nasvete ter za hitro in potrpežljivo popravljanje naloge.

Velika hvala raziskovalni mentorici dr. Mojci Bavcon Kralj, brez katere vsekakor ne bi šlo. Zahvaljujem se ji, da je ves čas verjela v naše delo, me spodbujala, usmerjala in učila samostojnosti. Hvala ji za zgled, da je vredno vstajati, da je dobro imeti načrte in se jih držati ter za njeno velikodušno pripravljenost pomagati drugim. Poudariti moram, da je zaradi »neustreznih titul« žal nisem mogla navesti kot somentorico. Dr. Mojca Bavcon Kralj je kljub temu vedno bila pripravljena pomagati in se ni ozirala na to, ali bo navedena kot somentorica.

Hvala tudi raziskovalni mentorici dr. Tjaši Jug in vodji Agroživilskega laboratorija. Zahvaljujem se ji za nasvete in spodbude in da mi je omogočila raziskovalno delo v prijetnih delovnih razmerah.

Hvala članom komisije prof. dr. Lei Demšar, prof. dr. Ireni Rogelj ter prof. dr. Matevžu Pompetu za popravke in vse nasvete ter tudi zato, ker so moji prošnji ugodili in mi hitro popravili nalogo.

Hvala tudi razvojnim mentoricam v podjetju Agroind Vipava 1894 Vipava d. d., in sicer Alenki Stopar, Moniki Kosmač ter predvsem Jelki Žvokelj, ki je skušala razumeti moje ideje in je bila pripravljena pomagati in mi omogočala nemoten proces raziskovalnega dela. Vsekakor hvala vodstvu podjetja Agroind Vipava 1894 Vipava d. d., ki je bilo pripravljeno pristopiti k raziskavi. Hvala tudi ostalim zaposlenim, predvsem tistim v mlekarini, ki so mi bili pripravljeni pomagati in me kdaj tudi nasmejali.

Hvala še vodstvu Kmetijsko gozdarskega zavoda, enota Nova Gorica, ki je pri raziskavi sodeloval kot soizvajalec. Zahvaljujem se vsem sodelavcem, predvsem pa sodelavkam v agroživilskem laboratoriju, ki so mi pomagale s praktičnimi nasveti in sprostitev ob kavi. Hvala tudi vodji laboratorija za mleko Mateji Kavčič Korenjak za vse nasvete.

Iskrena hvala dr. Kristjanu Jarniju za neprecenljivo pomoč pri statistični obdelavi podatkov in za izčrpne odgovore na moja nešteta vprašanja.

Zahvaljujem se vsem kmetom na Črnovrški planoti. Brez njih vsekakor ne bi bil Nanoški sir to, kar je bil. Hvala jim za sodelovanje in vse odgovore. Zahvaljujem se tudi kontrolorju g. Andreju Furlanu Poženelu, ki mi je pomagal, da sem prišla do vzorcev mleka.

Iskrena hvala kmetiji Hubjan iz Bat ter kmetiji Pustotnik iz Gorenje vasi, ki sta sodelovali pri izpeljavi nekaterih poskusov.

Ge. Lini Burkan se zahvaljujem za temeljit in potrpežljiv pregled oblikovne ustreznosti doktorske naloge. Zahvaljujem se tudi knjižničarkam na oddelku za zootehniko, ki so mi hitro posredovale kakšen težje dostopen članek.

Hvala ge. Vesni Jaše Janežič, ki mi je s prijaznostjo in strokovnostjo pomagala pri reševanju raznih administrativnih zadev.

Zahvaljujem se poznavalcu za sirarstvo g. Danjelu Čotarju za vse nasvete in posredovano znanje.

Hvaležna sem tudi vsem ljudem, ki so mi velikodušno pomagali pri reševanju številnih zagat in me spodbujali, predvsem sem hvaležna: dr. Manci Knap, stricu Janezu Rabzelju, teti Katjuši Rabzelj, Marini Rabzelj, Janji Šuligoj ter drugim dobrim ljudem, ki jih ni bilo malo.

Seveda najlepša hvala staršem, bratu in sorodnikom, ki so bili z mano in mi pomagali na sto in en način.

PRILOGE

Priloga A: Testiranje SPME vlaken pri 25 °C, 24 h

Annex A: Test of SPME fiber at 25 °C, 24h

SPME-vlakno	Rt ¹	Povprečje ²	s ³	RSD ⁴
Hlapne organske spojine				
Modro vlakno (DVB/PDMS)				
Heptan	8,72	$3,16 \cdot 10^5$	$4,29 \cdot 10^5$	1,36
2,3-butandiol	11,67	$2,59 \cdot 10^5$	$3,34 \cdot 10^4$	0,13
2-heptanol	13,74	$1,11 \cdot 10^5$	$9,79 \cdot 10^3$	0,09
Heksanojska kislina	15,44	$4,21 \cdot 10^6$	$1,85 \cdot 10^5$	0,04
Etil ester heksanojske kisline	16,28	$2,09 \cdot 10^5$	$3,55 \cdot 10^4$	0,17
2-nonanon	18,78	$2,65 \cdot 10^5$	$3,80 \cdot 10^4$	0,14
Oktanojska kislina	20,08	$2,42 \cdot 10^6$	$1,17 \cdot 10^5$	0,05
Belo vlakno (PA)				
Ocetna kislina	6,91	$2,43 \cdot 10^6$	$5,39 \cdot 10^5$	0,22
Butanojska kislina	10,94	$5,25 \cdot 10^6$	$5,42 \cdot 10^5$	0,10
2,3-butandiol	11,68	$6,09 \cdot 10^5$	$1,69 \cdot 10^5$	0,28
Heksanojska kislina	15,45	$5,39 \cdot 10^6$	$9,31 \cdot 10^5$	0,17
Oktanojska kislina	20,09	$1,04 \cdot 10^7$	$1,59 \cdot 10^6$	0,15
Dekanojska kislina	23,82	$1,01 \cdot 10^7$	$1,67 \cdot 10^6$	0,17
Rdeče vlakno(PDMS)				
4-hidksi butanojska kislina	16,07	$7,53 \cdot 10^5$	$4,69 \cdot 10^5$	0,62
Oktanojska kislina	20,06	$2,29 \cdot 10^5$	$2,05 \cdot 10^4$	0,09

¹Retencijski čas; ²povprečna površina kromatografskih vrhov (n=3); ³standardni odklon;

⁴relativna standardna napaka

Priloga B: Testiranje črnega in sivega SPME vlakna pri 25 °C, 24 h
Annex B: Test of black and grey SPME fiber at 25 °C, 24h

Hlapne organske spojine	Črno vlakno (CAR-PDMS)				Sivo vlakno (DVB-CAR-PDMS)		
	Rt ¹	Povprečje ²	s ²	RSD ⁴	Povprečje	s	RSD
Ocetna kislina	6,91	9,09 · 10 ⁶	8,78 · 10 ⁵	0,10	1,32 · 10 ⁷	6,89 · 10 ⁶	0,52
2-butanol	7,49	1,08 · 10 ⁷	1,59 · 10 ⁶	0,15	1,13 · 10 ⁶	4,31 · 10 ⁵	0,38
2,3-butandion	7,58	5,14 · 10 ⁶	1,20 · 10 ⁵	0,02	/	/	/
2-butanon	7,75	5,20 · 10 ⁶	9,17 · 10 ⁵	0,18	4,71 · 10 ⁶	4,97 · 10 ⁶	1,05
Etil ester očetne kisline	7,87	4,25 · 10 ⁶	5,15 · 10 ⁵	0,12	/	/	/
Heptan	8,85	4,35 · 10 ⁸	4,59 · 10 ⁷	0,11	/	/	/
1-butanol	8,81	/	/	/	1,74 · 10 ⁶	3,99 · 10 ⁵	0,23
2-pentanol	9,46	1,80 · 10 ⁷	5,65 · 10 ⁵	0,03	1,02 · 10 ⁶	2,06 · 10 ⁵	0,20
2-Pentanon	9,59	1,41 · 10 ⁷	2,65 · 10 ⁶	0,19	2,51 · 10 ⁶	1,48 · 10 ⁶	0,59
3-metil 1-butanol	10,28	2,30 · 10 ⁶	1,27 · 10 ⁵	0,05	/	/	/
3-hidroksi 2-butanon	10,44	1,01 · 10 ⁷	8,34 · 10 ⁵	0,08	1,14 · 10 ⁶	3,26 · 10 ⁵	0,29
Butanojska kislina	11,10	2,23 · 10 ⁸	6,25 · 10 ⁶	0,03	1,30 · 10 ⁸	2,62 · 10 ⁶	0,02
Etil ester butanojske kisline	11,72	8,48 · 10 ⁷	6,15 · 10 ⁶	0,07	5,36 · 10 ⁶	2,05 · 10 ⁶	0,38
2,3-butandiol	11,94	5,44 · 10 ⁶	2,95 · 10 ⁵	0,05	/	/	/
Heksanal	12,00	3,51 · 10 ⁶	8,16 · 10 ⁵	0,23	6,52 · 10 ⁵	2,17 · 10 ⁵	0,33
3-metil butanojske kisline	12,19	4,20 · 10 ⁶	2,09 · 10 ⁵	0,05	8,13 · 10 ⁵	2,60 · 10 ⁵	0,32
2-metil butanojske kisline	12,38	3,13 · 10 ⁶	2,21 · 10 ⁵	0,07	/	/	/
2-hidroksi 3-pentanon	12,51	1,29 · 10 ⁶	2,25 · 10 ⁵	0,17	/	/	/
1-heksanol	13,19	8,95 · 10 ⁶	8,79 · 10 ⁵	0,10	/	/	/
Etilbenzen	13,55	7,86 · 10 ⁶	8,12 · 10 ⁶	1,03	5,93 · 10 ⁵	1,99 · 10 ⁵	0,34
2-heptanol	13,77	1,54 · 10 ⁷	1,01 · 10 ⁵	0,01	3,68 · 10 ⁶	2,70 · 10 ⁶	0,73
2-heptanon	13,93	1,83 · 10 ⁷	1,06 · 10 ⁶	0,06	8,49 · 10 ⁷	3,38 · 10 ⁷	0,40
Heptanal	14,22	/	/	/	8,32 · 10 ⁵	1,93 · 10 ⁵	0,23
2-butoksi etanol	14,34	/	/	/	2,01 · 10 ⁶	8,94 · 10 ⁵	0,44
α-pinen	14,77	1,35 · 10 ⁶	2,40 · 10 ⁵	0,18	4,50 · 10 ⁵	3,56 · 10 ⁵	0,79
Dekan	15,29	1,81 · 10 ⁶	2,90 · 10 ⁴	0,02	/	/	/
Heksanojska kislina	15,62	8,79 · 10 ⁷	5,16 · 10 ⁶	0,06	9,19 · 10 ⁷	5,23 · 10 ⁶	0,06
Etil ester heksanojske kisline	16,30	7,83 · 10 ⁶	1,93 · 10 ⁵	0,02	2,85 · 10 ⁶	1,54 · 10 ⁶	0,54
4-hidroksi butanojske kisline	16,70	/	/	/	7,16 · 10 ⁵	2,75 · 10 ⁵	0,38
Oktanal	16,76	/	/	/	8,97 · 10 ⁵	1,57 · 10 ³	0,00
2-etil heksanol	17,10	3,47 · 10 ⁶	1,89 · 10 ⁶	0,55	1,35 · 10 ⁶	7,26 · 10 ⁵	0,54
Benzaldehid	17,19	4,01 · 10 ⁶	7,28 · 10 ⁵	0,18	1,24 · 10 ⁷	1,32 · 10 ⁴	0,00
Limonen	17,34	1,97 · 10 ⁶	5,47 · 10 ⁵	0,28	2,63 · 10 ⁶	1,10 · 10 ⁶	0,42
p-cimen	17,54	1,06 · 10 ⁶	2,11 · 10 ⁵	0,20	1,19 · 10 ⁷	/	/
Undekan	17,72	1,10 · 10 ⁶	1,03 · 10 ⁵	0,09	1,11 · 10 ⁶	6,95 · 10 ⁵	0,62
2-nonanol	18,63	2,97 · 10 ⁵	1,05 · 10 ⁵	0,35	3,60 · 10 ⁵	2,01 · 10 ⁵	0,56
4-butoksi 1-butanol	18,70	/	/	/	2,76 · 10 ⁵	2,45 · 10 ⁴	0,09
2-nonanon	18,80	2,72 · 10 ⁶	6,03 · 10 ⁵	0,22	7,29 · 10 ⁶	5,95 · 10 ⁶	0,82
Nonanal	19,11	4,08 · 10 ⁵	1,58 · 10 ⁵	0,39	2,01 · 10 ⁶	6,88 · 10 ⁵	0,34
Benzenacetaldehid	19,22	/	/	/	1,02 · 10 ⁶	/	/
Acetofenon	19,76	/	/	/	8,13 · 10 ⁵	1,69 · 10 ⁵	0,21
Oktanojska kislina	20,09	1,10 · 10 ⁷	7,76 · 10 ⁵	0,07	4,01 · 10 ⁷	3,19 · 10 ⁶	0,08
2-nonenal	20,56	/	/	/	1,74 · 10 ⁶	2,62 · 10 ⁴	0,02
Etil ester oktanojske kisline	20,11	1,53 · 10 ⁶	6,00 · 10 ⁵	0,39	1,62 · 10 ⁶	2,83 · 10 ⁵	0,18
Dekanal	21,22	/	/	/	1,65 · 10 ⁶	1,68 · 10 ⁵	0,10
Etil ester benzojske kisline	21,53	/	/	/	6,71 · 10 ⁵	4,52 · 10 ³	0,01
2-undekanon	22,81	/	/	/	1,36 · 10 ⁶	8,99 · 10 ⁵	0,66
n-dekanojska kislina	23,79	2,23 · 10 ⁶	2,42 · 10 ⁵	0,11	2,70 · 10 ⁷	7,37 · 10 ⁶	0,27
δ-oktalakton	24,42	/	/	/	2,14 · 10 ⁶	2,75 · 10 ⁵	0,13
δ-dekalakton	27,82	1,32 · 10 ⁶	5,50 · 10 ⁵	0,42	5,34 · 10 ⁶	2,25 · 10 ⁶	0,42

¹Retencijski čas; ²povprečna površina kromatografskih vrhov (n=3); ³standardni odklon; ⁴relativna standardna napaka

Priloga C: Rezultati t-testa meritev s sivim (SV) in črnim (CR) vlaknom

Annex C: Results of t-test of grey and black fiber

n	Hlapne organske spojine	Povprečje SV¹	Povprečje CR²	p-vrednost³	Izbira vlakna
V1	Ocetna kislina	$6,64 \cdot 10^6$	$9,45 \cdot 10^6$	0,000	CR
V10	2-butanol	$9,51 \cdot 10^5$	$4,02 \cdot 10^6$	0,069	CR
V37	Diacetil	$2,56 \cdot 10^6$	$4,64 \cdot 10^7$	0,000	CR
V38	2-butanon	$1,16 \cdot 10^6$	$6,81 \cdot 10^6$	0,139	CR
V29	Etil ester očetne kisline	$2,56 \cdot 10^6$	$4,64 \cdot 10^7$	0,000	CR
V11	1-butanol	$1,67 \cdot 10^6$	$8,27 \cdot 10^6$	0,000	CR
V20	3-metil butanal	$4,09 \cdot 10^4$	$1,98 \cdot 10^6$	0,003	CR
V12	2-pentanol	$1,54 \cdot 10^6$	$1,61 \cdot 10^7$	0,000	CR
V39	2-pentanon	$1,16 \cdot 10^7$	$7,06 \cdot 10^7$	0,000	CR
V40	2,3-pentandion	$1,57 \cdot 10^6$	$1,02 \cdot 10^7$	0,000	CR
V13	3-metil 1-butanol	$7,23 \cdot 10^5$	$9,20 \cdot 10^6$	0,002	CR
V41	3-hidroksi 2-butanon	$9,48 \cdot 10^6$	$6,19 \cdot 10^7$	0,016	CR
V2	Butanojska kislina	$9,02 \cdot 10^7$	$1,87 \cdot 10^8$	0,000	CR
V56	2-okten	$1,86 \cdot 10^5$	$2,06 \cdot 10^5$	0,827	CR
V57	Toluen	$1,37 \cdot 10^7$	$8,03 \cdot 10^6$	0,000	SV
V30	Etil ester butanojske kisline	$9,56 \cdot 10^6$	$7,23 \cdot 10^7$	0,000	CR
V14	2,3-butandiol	$3,06 \cdot 10^6$	$1,02 \cdot 10^7$	0,000	CR
V31	Etil ester očetne kisline	$1,82 \cdot 10^5$	$1,99 \cdot 10^6$	0,002	CR
V21	Heksanal	$1,42 \cdot 10^5$	$3,11 \cdot 10^5$	0,002	CR
V3	3-metil butanojske kisline	$1,92 \cdot 10^6$	$1,32 \cdot 10^7$	0,000	CR
V4	3-metil butanojske kisline	$5,24 \cdot 10^5$	$3,22 \cdot 10^6$	0,000	CR
V15	2-metil 3-pentanol	$9,48 \cdot 10^5$	$6,74 \cdot 10^6$	0,000	CR
V42	2-hidroksi 3-pentanon	$1,04 \cdot 10^6$	$7,96 \cdot 10^6$	0,000	CR
V43	2,3-heptandion	samo na SV	/	/	SV
V5	Pentanojska kislina	/	samo na CR	/	CR
V16	1-heksanol	$2,21 \cdot 10^6$	$7,28 \cdot 10^6$	0,000	CR
V32	1-butanol, 3-metil-, acetat	$3,59 \cdot 10^5$	$5,62 \cdot 10^5$	0,011	CR
V58	Etilbenzen	$2,29 \cdot 10^6$	$4,29 \cdot 10^6$	0,000	CR
V17	2-heptanol	$4,38 \cdot 10^6$	$2,75 \cdot 10^7$	0,000	CR
V44	2-heptanon	$1,08 \cdot 10^8$	$2,25 \cdot 10^8$	0,000	CR
V22	Heptanal	$6,13 \cdot 10^5$	$1,69 \cdot 10^6$	0,000	CR
V50	Pinan	$9,65 \cdot 10^5$	$2,94 \cdot 10^6$	0,000	CR
V51	α -pinen	$1,69 \cdot 10^6$	$7,45 \cdot 10^6$	0,000	CR
V6	Heksanojska kislina	$7,80 \cdot 10^7$	$7,79 \cdot 10^7$	0,959	SV
V52	Sabinen	$1,24 \cdot 10^5$	$6,20 \cdot 10^5$	0,000	CR
V33	Etil ester heksanojske kisline	$6,21 \cdot 10^6$	$1,17 \cdot 10^7$	0,000	CR
V45	2-oktanon	$1,65 \cdot 10^6$	$3,64 \cdot 10^6$	0,000	CR
V46	6-metil 5-hepten-2-on	samo na SV	/	/	SV
V23	Oktanal	$5,45 \cdot 10^6$	$5,53 \cdot 10^6$	0,832	CR
V59	Dimetil sulfon	$1,03 \cdot 10^5$	$4,73 \cdot 10^5$	0,000	CR

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge C: Rezultati T-testa meritev s sivim (SV) in črnim (CR) vlaknom

N	Hlapne organske spojine	Povprečje SV	Povprečje CR	p-vrednost	Izbira vlakna
V18	2-etil 1-heksanol	$6,78 \cdot 10^5$	$1,02 \cdot 10^6$	0,000	CR
V24	Benzaldehid	$1,07 \cdot 10^7$	$5,15 \cdot 10^6$	0,000	SV
V53	Limonen	$2,26 \cdot 10^6$	$2,07 \cdot 10^6$	0,368	SV
V54	p-cimen	$1,94 \cdot 10^6$	$1,90 \cdot 10^6$	0,873	SV
V60	Undekan	$3,68 \cdot 10^5$	$2,53 \cdot 10^5$	0,015	SV
V7	Heptanojska kislina	$3,33 \cdot 10^5$	$6,16 \cdot 10^5$	0,000	CR
V19	2-nonanol	$1,06 \cdot 10^6$	$1,09 \cdot 10^6$	0,847	CR
V47	2-nonanon	$6,40 \cdot 10^7$	$6,53 \cdot 10^7$	0,817	CR
V25	Nonanal	$2,09 \cdot 10^6$	$1,27 \cdot 10^6$	0,000	SV
V61	p-krezol	$3,31 \cdot 10^5$	$6,64 \cdot 10^4$	0,001	SV
V26	Benzenacetaldehid	$2,17 \cdot 10^5$	$1,59 \cdot 10^4$	0,000	SV
V34	Metil ester oktanojske kisline	/	samo na CR	/	CR
V48	8-nonen-2-on	$1,42 \cdot 10^5$	$1,50 \cdot 10^5$	0,904	CR
V8	Oktanojska kislina	$3,05 \cdot 10^7$	$1,45 \cdot 10^7$	0,000	SV
V27	2-nonenal	$5,55 \cdot 10^5$	$1,61 \cdot 10^5$	0,052	SV
V35	Etil ester oktanojske kisline	$3,18 \cdot 10^6$	$1,88 \cdot 10^6$	0,000	SV
V28	Dekanal	$3,00 \cdot 10^5$	$2,83 \cdot 10^4$	0,000	SV
V49	2-undekanon	$3,64 \cdot 10^6$	$1,55 \cdot 10^6$	0,000	SV
V9	Dekanojska kislina	$1,25 \cdot 10^7$	$2,86 \cdot 10^6$	0,000	SV
V36	Etil ester dekanojske kisline	$1,34 \cdot 10^6$	$2,40 \cdot 10^5$	0,000	SV
V62	δ-oktalakton	$2,13 \cdot 10^6$	$9,47 \cdot 10^5$	0,000	SV
V55	β-kariofilen	$1,14 \cdot 10^6$	$6,08 \cdot 10^5$	0,000	SV
V63	δ-dekalakton	$3,01 \cdot 10^6$	$1,10 \cdot 10^6$	0,000	SV

V – oznake HOS iz preglednice 11; ¹povprečna površina kromatografskih vrhov z DVB-CAR-PDMS vlaknom (n=3), ²povprečna površina kromatografskih vrhov s CAR-PDMS vlaknom (n=3)

Priloga D: Test SPME - vlaken: 15 min kondicioniranje in 45 min ekstrakcija pri 37 °C

Annex D: Test of SPME - fiber: 15 min conditioning and 45 min of extraction at 37°C

Sivo vlakno (DVB-CAR-PDMS)				
Hlapne organske spojine	Rt¹	Povprečje²	s³	RSD⁴
Ocetna kislina	6.91	$8.17 \cdot 10^6$	$1.90 \cdot 10^6$	0.23
2-butanol	7.48	$7.52 \cdot 10^6$	$1.83 \cdot 10^6$	0.24
1,3-Butandiol	7.76	$1.13 \cdot 10^6$	$1.23 \cdot 10^5$	0.11
Heptan	8.78	$1.02 \cdot 10^6$	$8.11 \cdot 10^4$	0.08
2-pentanol	9.47	$2.26 \cdot 10^6$	$9.15 \cdot 10^5$	0.41
Etil ester butanojske kisline	11.70	$4.85 \cdot 10^6$	$1.72 \cdot 10^6$	0.35
2,3-butnediol	11.93	$3.22 \cdot 10^5$	$2.56 \cdot 10^4$	0.08
Heksanal	11.99	$7.49 \cdot 10^5$	/	/
2-heptanol	13.77	$1.23 \cdot 10^6$	$4.85 \cdot 10^5$	0.39
2-butoksi etanol	14.34	$5.52 \cdot 10^5$	$3.21 \cdot 10^5$	0.58
α-Pinen	14.77	$3.06 \cdot 10^5$	/	/
Dekan	15.31	$2.93 \cdot 10^5$	$1.19 \cdot 10^5$	0.41
Heksanojska kislina	15.44	$5.62 \cdot 10^6$	$2.48 \cdot 10^6$	0.44
Etil ester heksanojske kisline	16.30	$4.53 \cdot 10^5$	$1.93 \cdot 10^5$	0.43
Undekan	17.70	$3.62 \cdot 10^5$	$4.29 \cdot 10^4$	0.12
2-nonanon	18.80	$3.83 \cdot 10^5$	$4.14 \cdot 10^4$	0.11
Črno vlakno (CAR-PDMS)				
Hlapne organske spojine	Rt	Povprečje	s	RSD
3-metil 1-butanol	6.72	$6.49 \cdot 10^5$	$4.05 \cdot 10^5$	0.62
Ocetna kislina	6.91	$2.13 \cdot 10^7$	$3.22 \cdot 10^6$	0.15
2-butanol	7.54	$3.20 \cdot 10^7$	$3.40 \cdot 10^7$	1.06
1,3-butandiol	7.79	$5.31 \cdot 10^6$	$1.90 \cdot 10^5$	0.04
Etil ester očetne kisline	7.88	$6.36 \cdot 10^6$	$9.27 \cdot 10^5$	0.15
Heptan	8.85	$1.78 \cdot 10^7$	$2.62 \cdot 10^6$	0.15
2-pentanol	9.50	$6.60 \cdot 10^6$	$9.87 \cdot 10^5$	0.15
3-metil 1-butanol	10.32	$6.17 \cdot 10^5$	$9.83 \cdot 10^4$	0.16
Etil ester butanojske kisline	11.71	$4.76 \cdot 10^6$	$9.74 \cdot 10^5$	0.20
2-heptanol	13.78	$6.87 \cdot 10^5$	$1.07 \cdot 10^5$	0.16
2-butoksi etanol	14.35	$1.39 \cdot 10^6$	$2.29 \cdot 10^5$	0.16
α-pinen	14.70	$5.94 \cdot 10^5$	$6.21 \cdot 10^4$	0.10
Heksanojska kislina	15.43	$2.51 \cdot 10^6$	$4.14 \cdot 10^5$	0.17
Etil ester heksanojske kisline	16.30	$5.59 \cdot 10^5$	$9.34 \cdot 10^4$	0.17
Undekan	17.73	$6.39 \cdot 10^5$	$3.59 \cdot 10^4$	0.06
2-nonanon	18.80	$1.85 \cdot 10^5$	$2.64 \cdot 10^4$	0.14

¹Retencijski čas; ²povprečna površina kromatografskih vrhov (n=3); ³standardni odklon; ⁴relativna standardna napaka

Priloga E: Hlapne organske spojine v krmi po sezonah, statistični parametri opisne statistike in Wilcoxon-ovega testa

Annex E: Volatile organic compounds in feed by seasons with statistical parameters

Hlapne organske spojine	Poletna sezona (Sveža trava)	Zimska sezona (Travna silaža)	T	P- vrednost
	Povprečje	Povprečje		
Dimetil sulfid	$5,02 \cdot 10^6$	0	0	0,028
Metil ester očetne kisline	$1,41 \cdot 10^7$	$1,72 \cdot 10^7$	6	0,345
1-propanol	0	$1,01 \cdot 10^6$		
2-metil propanal	0	$5,93 \cdot 10^6$	0	0,180
Očetna kislina	$5,49 \cdot 10^6$	$1,90 \cdot 10^8$	0	0,028
2-butanon	$1,02 \cdot 10^6$	$5,98 \cdot 10^6$	1	0,080
Etil ester očetne kisline	$2,81 \cdot 10^8$	$1,49 \cdot 10^8$	6	0,35
2-metil 1-propanol	0	$5,89 \cdot 10^6$	0	0,180
1-heptene	$1,52 \cdot 10^6$	0		
1-butanol	0	$2,67 \cdot 10^7$	0	0,068
3-metil butanal	0	$6,12 \cdot 10^7$	0	0,028
2-metil butanal	0	$2,50 \cdot 10^7$	0	0,068
1-penten-3-ol	$1,19 \cdot 10^7$	$5,93 \cdot 10^6$	0	0,180
Propanojska kislina	0	$4,15 \cdot 10^7$	0	0,068
3-pentanol	0	$1,43 \cdot 10^6$		
2-pentanon	$2,54 \cdot 10^6$	$1,18 \cdot 10^6$	0	0,068
2-etil furan	$3,00 \cdot 10^6$	0	0	0,068
3-pentanon	$1,58 \cdot 10^7$	$3,04 \cdot 10^6$	0	0,028
Pentanal	0	$2,40 \cdot 10^6$	0	0,180
Etil ester propanojske kisline	0	$7,05 \cdot 10^6$	0	0,109
n-propil acetat	0	$1,22 \cdot 10^6$		
Metil ester butanojske kisline	0	$2,34 \cdot 10^7$	0	0,043
3-metil 1-butanol	$3,68 \cdot 10^6$	$5,47 \cdot 10^7$	0	0,028
2-metil 1-butanol	$1,72 \cdot 10^6$	$4,53 \cdot 10^7$	0	0,028
3-metil 3-buten-1-ol	0	$3,05 \cdot 10^6$		
3-hidroksi 2-butanon (acetoin)	$7,99 \cdot 10^6$	$1,08 \cdot 10^7$	7	0,463
Etil ester 2-metil propanojske kisline	0	$1,86 \cdot 10^6$		
Propil ester 2-metil očetne kisline	0	$6,61 \cdot 10^6$		
Metil ester 2-metil butanojske kisline	0	$2,47 \cdot 10^6$		
2-Okten	$2,20 \cdot 10^7$	0		
2-penten-1-ol	$2,61 \cdot 10^6$	0	0	0,068
Dimetil disulfid	$3,03 \cdot 10^6$	0		
Toluen	$5,04 \cdot 10^6$	$1,28 \cdot 10^6$	1	0,046
Etil ester butanojske kisline	0	$7,53 \cdot 10^8$	0	0,043
2,3-Butandiol	0	$1,84 \cdot 10^6$		
Heksanal	$2,21 \cdot 10^6$	0	0	0,043

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge E: Hlapne organske spojine v krmi po sezonah, statistični parametri opisne statistike in Wilcoxon-ovega testa

Hlapne organske spojine	Poletna sezona (Sveža trava)	Zimska sezona (Travna silaža)	T	P- vrednost
	Povprečje	Povprečje		
Butanojska kislina	0	$2,08 \cdot 10^9$	0	0,043
Etil ester 2-metil butanojske kisline	$1,11 \cdot 10^6$	$1,09 \cdot 10^7$	5	0,500
Etil ester 2-metil butanojske kisline	$1,32 \cdot 10^7$	$3,86 \cdot 10^7$	6	0,345
3-metil butanojske kisline	0	$6,53 \cdot 10^7$	0	0,028
2-metil butanojske kisline	0	$4,93 \cdot 10^7$	0	0,043
1-nonen	$1,42 \cdot 10^7$	0	0	0,109
Nonane	$7,28 \cdot 10^5$	0		
3-Heksen-1-ol, (Z)-	$1,84 \cdot 10^8$	$7,50 \cdot 10^7$	0	0,028
2-Heksen-1-ol, (Z)-	$9,06 \cdot 10^6$	0	0	0,180
1-butanol, 3-metil-, acetat	0	$2,19 \cdot 10^7$		
1-butanol, 2-metil-, acetat	0	$1,15 \cdot 10^7$		
2-Heksenal, (E)-	$1,77 \cdot 10^7$	$2,43 \cdot 10^6$	1	0,080
Pentanojska kislina	0	$1,56 \cdot 10^8$	0	0,068
Furfural	0	$7,67 \cdot 10^7$	0	0,068
Propil ester butanojske kisline	0	$1,20 \cdot 10^7$	0	0,068
Etil ester pentanojske kisline	0	$2,78 \cdot 10^7$	0	0,043
Pentil ester očetne kisline	$4,96 \cdot 10^6$	0	0	0,028
Heptanal	0	$7,99 \cdot 10^5$		
Pinan	$1,51 \cdot 10^8$	$4,85 \cdot 10^6$	0	0,028
Metil ester heksanojske kisline,	0	$6,88 \cdot 10^5$		
1-metilpropil ester butanojske kisline	0	$3,95 \cdot 10^6$	0	0,180
α -pinen	$1,50 \cdot 10^8$	$2,21 \cdot 10^7$	1	0,046
2-metilpropil ester butanojske kisline	0	$4,45 \cdot 10^7$	0	0,043
6-metil 3-heptanol	0	$3,52 \cdot 10^6$		
Dekan	$8,92 \cdot 10^6$	0	0	0,068
6-metil 3-heptanon	0	$9,96 \cdot 10^5$		
Kampen	$6,67 \cdot 10^7$	$9,71 \cdot 10^6$	4	0,173
Heksanojske kisline	0	$1,47 \cdot 10^8$	0	0,043
1-heptanol	0	$2,57 \cdot 10^6$		
1-okten-3-ol	$1,74 \cdot 10^6$	$6,62 \cdot 10^6$	1	0,655
Sabinen	$3,18 \cdot 10^8$	$2,61 \cdot 10^7$	0	0,028
3-oktanol	$1,08 \cdot 10^7$	$3,66 \cdot 10^7$	6	0,345
Butil ester butanojske kisline	0	$2,03 \cdot 10^8$	0	0,043
β -pinen	$3,04 \cdot 10^8$	$3,71 \cdot 10^7$	3	0,116
Etil ester heksanojske kisline	0	$6,74 \cdot 10^7$	0	0,043
2-oktanon	0	$4,80 \cdot 10^7$	0	0,043

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge E: Hlapne organske spojine v krmi po sezonah, statistični parametri opisne statistike in Wilcoxon-ovega testa

Hlapne organske spojine	Poletna sezona (Sveža trava)	Zimska sezona (Travna silaža)	T	P- vrednost
	Povprečje	Povprečje		
2-metil-, 3-metilbutil ester propanojske kisline	0	$1,08 \cdot 10^7$	0	0,043
6-metil 5-hepten-2-on	$8,70 \cdot 10^5$	$1,63 \cdot 10^7$		
2-metilbutl ester, 2-metil propanojske kisline	0	$4,47 \cdot 10^6$		
Heksil ester očetne kisline	$6,09 \cdot 10^6$	0	0	0,180
Etil ester 3-heksenojske kisline (Z)-	0	$1,22 \cdot 10^7$	0	0,109
3-heksen-1-ol acetat (Z)-	$6,06 \cdot 10^8$	$2,33 \cdot 10^7$	0	0,028
Oktanal	0	$2,21 \cdot 10^7$	0	0,028
Fenol	0	$1,29 \cdot 10^7$	0	0,180
2-heksen-1-ol acetat (Z)-	$3,66 \cdot 10^7$	0	0	0,068
α -terpinen	$7,41 \cdot 10^7$	$5,44 \cdot 10^6$	0	0,028
Benzaldehid	0	$3,76 \cdot 10^8$	0	0,028
Limonen	$1,31 \cdot 10^8$	$2,21 \cdot 10^7$	1	0,046
p-cimen	$1,60 \cdot 10^8$	$2,07 \cdot 10^7$	0	0,028
α -felandren	$1,13 \cdot 10^7$	0	0	0,068
2-metilbutil ester butanojske kisline	0	$9,53 \cdot 10^7$		
Undekan	$1,06 \cdot 10^8$	0		
Eukaliptol	$1,57 \cdot 10^8$	$5,86 \cdot 10^7$	7	0,463
Pentil ester pentanojske kisline	0	$3,81 \cdot 10^7$	0	0,043
Etil ester heptanojske kisline	0	$1,44 \cdot 10^7$	0	0,068
cis- α -terpineol	$9,29 \cdot 10^6$	0	0	0,068
Benzil alkohol	0	$1,27 \cdot 10^8$		
2-nonanon	$2,21 \cdot 10^6$	$8,15 \cdot 10^6$		
β -linalol	$8,64 \cdot 10^7$	$1,13 \cdot 10^8$	8	0,600
3-oktanol acetat	0	$1,90 \cdot 10^7$	0	0,068
Nonanal	0	$1,37 \cdot 10^7$		
Benzeneacetaldehid	0	$3,26 \cdot 10^7$		
Metil ester oktanojske kisline	0	$6,84 \cdot 10^6$	0	0,068
Acetofenon	0	$2,27 \cdot 10^7$		
3-metilbutil ester pentanojske kisline	0	$5,46 \cdot 10^6$		
3-tujanon	$2,74 \cdot 10^6$	$4,10 \cdot 10^7$	0	0,109
Tujon	0	$1,05 \cdot 10^7$	0	0,068
1-nonanol	0	$1,05 \cdot 10^7$		
Izotujol	0	$2,76 \cdot 10^6$		
Heksl ester butanojske kisline	0	$7,88 \cdot 10^7$	0	0,068
(-)-Lavandulol	$1,54 \cdot 10^6$	0		

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge E: Hlapne organske spojine v krmi po sezonah, statistični parametri opisne statistike in Wilcoxon-ovega testa

Hlapne organske spojine	Poletna sezona (Sveža trava)	Zimska sezona (Travna silaža)	T	P- vrednost
	Povprečje	Povprečje		
Feniletil alkohol	$9,53 \cdot 10^6$	$1,07 \cdot 10^8$	6	0,345
(E)-3-heksenil ester butanojske kisline	0	$2,67 \cdot 10^8$	0	0,043
Octil ester očetne kisline	$8,11 \cdot 10^6$	$8,02 \cdot 10^6$	4	0,715
2-furanilmetil ester butanojske kisline	0	$9,56 \cdot 10^6$	0	0,068
4-etil fenol	0	$4,75 \cdot 10^7$	0	0,043
Kampor, (1R,4R)-(+)-	$9,39 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^8$	9	0,753
Borneol	$2,87 \cdot 10^7$	$2,70 \cdot 10^7$	9	0,753
Etil ester benzojske kisline	$2,40 \cdot 10^6$	$3,71 \cdot 10^7$	0	0,028
α -terpineol	$9,10 \cdot 10^6$	$4,97 \cdot 10^7$	0	0,028
3-pinanon	0	$3,17 \cdot 10^6$		
Lila alkohol C	0	$1,86 \cdot 10^6$		
Tridekan	$1,02 \cdot 10^7$	0	0	0,043
Safranal	0	$7,28 \cdot 10^6$	0	0,180
Oktil ester butanojske kisline	0	$3,81 \cdot 10^7$	0	0,018
Heptil ester butanojske kisline	0	$2,31 \cdot 10^7$	0	0,043
Etil ester nonanojske kisline	0	$1,37 \cdot 10^7$		
Eukarvon	0	0		
Etil ester benzenocetne kisline	0	$1,12 \cdot 10^7$	0	0,109
2-feniletil ester očetne kisline	0	$6,01 \cdot 10^6$		
α -Etilfenetil alkohol	0	$7,02 \cdot 10^6$		
4-etil-2-metoksi fenol	0	$7,19 \cdot 10^7$	0	0,109
α -kubeben	$6,90 \cdot 10^7$	$8,61 \cdot 10^7$	10	0,917
Etil ester dekanajojske kisline	0	$1,28 \cdot 10^7$	0	0,109
Ilangen	$3,36 \cdot 10^7$	$3,52 \cdot 10^7$	10	0,917
Kopaen	$8,82 \cdot 10^7$	$1,62 \cdot 10^8$	6	0,345
β -elemen	$3,15 \cdot 10^6$	0		
α -kubeben	0	$1,58 \cdot 10^7$	0	0,180
β -kubeben	0	$2,65 \cdot 10^7$	0	0,109
β -bourbonen	$3,82 \cdot 10^6$	0		
Eugenol	0	$6,71 \cdot 10^6$	0	0,180
γ -amilbutirolakton	0	$1,76 \cdot 10^7$	0	0,180
β -kariofilen	$3,59 \cdot 10^8$	$3,32 \cdot 10^8$	9	0,753
α -feniletil butirat	0	$4,70 \cdot 10^7$	0	0,068
γ -murolen	$1,82 \cdot 10^8$	$2,56 \cdot 10^8$	6	0,686
α -murolen	$1,06 \cdot 10^8$	$1,65 \cdot 10^8$	6	0,686
α -ionon	0	$3,30 \cdot 10^7$	0	0,068

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge E: Hlapne organske spojine v krmi po sezonah, statistični parametri opisne statistike in Wilcoxon-ovega testa

Hlapne organske spojine	Poletna sezona (Sveža trava) Povprečje ¹	Zimska sezona (Travna silaža) Povprečje	T ²	P-vrednost ³
β-kadinen, (-)-	4,17 ·10 ⁸	3,28 ·10 ⁸	7	0,463
Kalamenen	4,76 ·10 ⁷	7,35 ·10 ⁷	5	0,249
α-Kalakoren	2,09 ·10 ⁷	2,29 ·10 ⁷	10	0,917

¹povprečne površine posamezne HOS (n=18); ²T-vrednost ničelne hipoteze iz Wilcoxon-onovega testa,

³p-vrednost iz Wilcoxon-onovega testa

Priloga F: Hlapne organske spojine v mleku po sezonah, statistični parametri opisne statistike in Wilcoxon-ovega testa

Annex F: Volatile organic compounds in milk by seasons with statistical parameters

Hlapne organske spojine	Poletna sezona	Zimska sezona	T	P-vrednost
	Povprečje	Povprečje		
Aceton	$6,35 \cdot 10^7$	$1,02 \cdot 10^8$	3	0,116
Dimetil sulfid	$1,26 \cdot 10^6$	$4,05 \cdot 10^6$	1	0,144
Heksan	$2,25 \cdot 10^5$	0	0	0,180
Heptan	0	$5,73 \cdot 10^4$		
2-metil propanal	$3,27 \cdot 10^5$	0		
2-butanol	0	$1,82 \cdot 10^6$	0	0,043
2,3-butandion	$2,04 \cdot 10^5$	0		
2-butanon	$5,53 \cdot 10^6$	$1,76 \cdot 10^8$	0	0,028
Etil ester očetne kisline	$2,88 \cdot 10^6$	0	0	0,028
Kloroform	$4,44 \cdot 10^5$	0	0	0,109
3-metil 2-pentanon	$6,79 \cdot 10^5$	0	0	0,180
1-butanol	0	$4,52 \cdot 10^5$	0	0,180
3-metil butanal	$3,38 \cdot 10^6$	$2,03 \cdot 10^5$		
Trikloronitrometan	$2,20 \cdot 10^5$	0		
2-pentanon	$3,01 \cdot 10^5$	$1,97 \cdot 10^6$	1	0,046
3-pentanon	0	$2,58 \cdot 10^6$	0	0,109
Pentanal	$4,91 \cdot 10^5$	$9,45 \cdot 10^5$	5	0,500
Metil ester butanojske kisline	$2,12 \cdot 10^5$	$3,82 \cdot 10^5$	3	0,225
1-pentanol	0	$2,48 \cdot 10^5$	0	0,068
3-metil 1-butanol	$1,43 \cdot 10^6$	$7,45 \cdot 10^4$	2	0,593
2-metil 1-butanol	$2,76 \cdot 10^5$	$6,11 \cdot 10^4$	1	0,655
3-metil 3-buten-1-ol	$8,11 \cdot 10^4$	0	0	0,109
3-hidroksi 2-butanon	$7,88 \cdot 10^5$	$2,69 \cdot 10^6$	5	0,249
Metil isobutil keton	$6,16 \cdot 10^4$	$4,11 \cdot 10^4$		
Butanojska kislina	$1,44 \cdot 10^7$	$1,22 \cdot 10^7$	9	0,753
2-okten	$6,50 \cdot 10^5$	0	0	0,043
Toluen	$8,77 \cdot 10^6$	$1,62 \cdot 10^6$	0	0,028
Etil ester butanojske kisline	$9,68 \cdot 10^6$	$1,61 \cdot 10^7$	5	0,249
Heksanal	$5,94 \cdot 10^5$	$3,77 \cdot 10^6$	0	0,028
4-metil oktan	$1,08 \cdot 10^5$	0		
Nonan	$9,23 \cdot 10^4$	0		
Heptanal	$2,43 \cdot 10^5$	$7,05 \cdot 10^5$	1	0,046
Pinan	$3,50 \cdot 10^6$	$3,56 \cdot 10^5$	0	0,028
Metil ester heksanojske kisline	0	$9,41 \cdot 10^4$		
α -pinen	$1,03 \cdot 10^7$	$1,75 \cdot 10^6$	0	0,028
2,2,4,6,6-pentametil- heptan	$4,46 \cdot 10^5$	$3,15 \cdot 10^5$	3	0,225
Dekan	$3,76 \cdot 10^5$	$6,23 \cdot 10^5$	6	0,345

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge F: Hlapne organske spojine v mleku po sezonah, statistični parametri opisne statistike in Wilcoxon-ovega testa

Hlapne organske spojine	Poletna sezona	Zimska sezona	T ²	p-vrednost ³
	Povprečje ¹	Povprečje		
Kampen	$8,74 \cdot 10^5$	$5,46 \cdot 10^5$	1	0,144
Heksanojska kislina	$7,86 \cdot 10^5$	$9,36 \cdot 10^5$	1	0,655
Isopinokarveol	$1,24 \cdot 10^5$	0		
Sabinen	$6,74 \cdot 10^5$	$3,89 \cdot 10^5$	5	0,500
2,3-oktanedion	0	$1,39 \cdot 10^5$	0	0,180
β-pinen	$6,95 \cdot 10^6$	0	0	0,028
Etil ester heksanojske kisline	0	$3,16 \cdot 10^6$	0	0,028
Oktanal	$1,37 \cdot 10^6$	$1,71 \cdot 10^6$	9	0,753
2-etil 1-heksanol	$4,69 \cdot 10^5$	$5,43 \cdot 10^5$	8	0,600
Limonen	$2,62 \cdot 10^6$	$1,65 \cdot 10^6$	3	0,116
p-Cimen	$1,81 \cdot 10^6$	$3,06 \cdot 10^5$	0	0,028
Undekan	$6,98 \cdot 10^5$	$5,36 \cdot 10^4$	0	0,028
Eukaliptol	$2,46 \cdot 10^5$	0	0	0,180
2-nonanon	$2,42 \cdot 10^5$	$1,10 \cdot 10^5$	1	0,285
Nonanal	$2,35 \cdot 10^5$	$3,88 \cdot 10^5$	4	0,173
Etil ester oktanojske kisline	$4,84 \cdot 10^5$	$8,16 \cdot 10^5$	5	0,249
β-kariofilen	$8,44 \cdot 10^5$	$2,72 \cdot 10^5$	0	0,028

¹povprečne površine posamezne HOS (n=18); ²T-vrednost ničelne hipoteze iz Wilcoxon-onovega testa,

³p-vrednost iz Wilcoxon-onovega testa

Priloga G: Povprečne vrednosti vsebnosti (površina kromatografskih vrhov) hlapnih organskih spojin (HOS) v Nanoškem siru na različne dneve zorenja v poletni sezoni

Annex G: Means of volatile organic compounds (arbitrary area units) in Nanos cheese at different stages of ripening time in summer season

HOS	Dnevi zorenja								
Maščobne kisline	0. dan (sirnina)	7. dan	21. dan	35. dan	49. dan	63. dan	77. dan	99. dan	187. dan
Ocetna kislina	$5,06 \cdot 10^6$ ab	$1,06 \cdot 10^7$ ab	$9,00 \cdot 10^6$ ab	$1,04 \cdot 10^7$ bc	$6,26 \cdot 10^6$ ab	$5,90 \cdot 10^6$ a	$5,56 \cdot 10^6$ a	$7,14 \cdot 10^6$ ab	$1,82 \cdot 10^7$ c
Butanojska kislina	$4,04 \cdot 10^7$ c	$9,95 \cdot 10^7$ bc	$1,62 \cdot 10^8$ ab	$1,92 \cdot 10^8$ a	$1,73 \cdot 10^8$ a	$1,50 \cdot 10^8$ ab	$1,26 \cdot 10^8$ abc	$1,76 \cdot 10^8$ a	$3,87 \cdot 10^8$ d
3-metil butanojska kislina	0 a	$3,60 \cdot 10^6$ a	0 a	$5,20 \cdot 10^6$ a	$6,50 \cdot 10^6$ a	$6,25 \cdot 10^6$ a	$7,54 \cdot 10^6$ a	$1,42 \cdot 10^7$ b	$3,47 \cdot 10^7$ c
2-metil butanojska kislina	0 a	0 a	0 a	$9,33 \cdot 10^5$ ab	$2,48 \cdot 10^6$ b	$2,42 \cdot 10^6$ b	$2,39 \cdot 10^6$ b	$4,80 \cdot 10^6$ c	0 a
Pentanojska kislina	0 b	0 b	0 b	$1,68 \cdot 10^6$ a	$1,65 \cdot 10^6$ a	$1,96 \cdot 10^6$ a	$1,74 \cdot 10^6$ a	$1,78 \cdot 10^6$ a	$3,70 \cdot 10^6$ c
Heksanojska kislina	$1,67 \cdot 10^7$ b	$2,49 \cdot 10^7$ b	$3,24 \cdot 10^7$ bc	$4,51 \cdot 10^7$ ac	$4,46 \cdot 10^7$ ac	$5,19 \cdot 10^7$ a	$5,39 \cdot 10^7$ a	$7,61 \cdot 10^7$ d	$1,72 \cdot 10^8$ e
Heptanojska kislina	$3,65 \cdot 10^5$ abc	$9,15 \cdot 10^5$ bd	0 c	$4,74 \cdot 10^5$ a	0 c	$4,38 \cdot 10^5$ a	$7,70 \cdot 10^5$ ab	$6,63 \cdot 10^5$ ab	$1,24 \cdot 10^6$ d
Oktanojska kislina	$9,33 \cdot 10^6$ a	$8,06 \cdot 10^6$ a	$7,46 \cdot 10^6$ a	$7,81 \cdot 10^6$ a	$8,47 \cdot 10^6$ a	$8,95 \cdot 10^6$ a	$8,54 \cdot 10^6$ a	$1,16 \cdot 10^7$ a	$2,89 \cdot 10^7$ b
Dekanojska kislina	0 b	$7,78 \cdot 10^6$ a	$7,71 \cdot 10^6$ a	$7,50 \cdot 10^6$ a	$8,68 \cdot 10^6$ a	$7,92 \cdot 10^6$ a	$7,67 \cdot 10^6$ a	0 b	$2,01 \cdot 10^7$ c
Alkoholi									
2-butanol	0 a	0 a	0 a	$1,81 \cdot 10^6$ b	$1,18 \cdot 10^6$ ab	$3,38 \cdot 10^5$ a	$4,71 \cdot 10^5$ ab	$6,33 \cdot 10^5$ ab	$3,26 \cdot 10^6$ c
1-butanol	0 ab	0 a	$9,57 \cdot 10^6$ bc	$1,03 \cdot 10^7$ c	$3,26 \cdot 10^6$ abc	$4,91 \cdot 10^6$ abc	$3,69 \cdot 10^6$ abc	$5,73 \cdot 10^6$ abc	$2,18 \cdot 10^7$ d
2-pentanol	0 ac	0 a	$4,13 \cdot 10^5$ a	$1,31 \cdot 10^7$ cd	$2,42 \cdot 10^7$ bd	$2,57 \cdot 10^7$ b	$2,50 \cdot 10^7$ b	$3,97 \cdot 10^7$ e	$5,68 \cdot 10^7$ f
3-metil 1-butanol	$2,35 \cdot 10^6$ abc	$4,24 \cdot 10^6$ ab	$1,34 \cdot 10^7$ c	$8,49 \cdot 10^6$ abc	$3,53 \cdot 10^6$ ab	$7,84 \cdot 10^5$ a	$1,70 \cdot 10^6$ a	$1,87 \cdot 10^6$ a	$1,18 \cdot 10^7$ bc
2,3-butandiol	0 ab	$7,86 \cdot 10^5$ a	$2,10 \cdot 10^7$ d	$4,09 \cdot 10^7$ e	$1,84 \cdot 10^7$ cd	$1,04 \cdot 10^7$ bc	$6,14 \cdot 10^6$ ab	$6,57 \cdot 10^6$ ab	$4,73 \cdot 10^6$ ab
2-metil 3-pentanol	$2,22 \cdot 10^7$ c	$3,22 \cdot 10^7$ e	$2,73 \cdot 10^7$ d	$5,70 \cdot 10^6$ b	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
1-hekanol	$9,29 \cdot 10^5$ a	$9,26 \cdot 10^5$ a	$8,78 \cdot 10^5$ a	$1,55 \cdot 10^6$ a	$2,14 \cdot 10^6$ a	$2,44 \cdot 10^6$ a	$3,55 \cdot 10^6$ a	$6,61 \cdot 10^6$ b	$3,16 \cdot 10^7$ c
2-heptanol	0 a	0 a	$2,69 \cdot 10^5$ a	$1,17 \cdot 10^7$ ac	$2,72 \cdot 10^7$ bc	$3,48 \cdot 10^7$ b	$5,91 \cdot 10^7$ de	$3,97 \cdot 10^7$ bd	$6,18 \cdot 10^7$ e
2-etil 1-heksanol	$8,68 \cdot 10^5$ abc	$2,88 \cdot 10^5$ a	$5,35 \cdot 10^5$ ab	$7,76 \cdot 10^5$ b	$6,78 \cdot 10^5$ ab	$6,60 \cdot 10^5$ ab	$1,38 \cdot 10^6$ c	$6,36 \cdot 10^5$ ab	$1,44 \cdot 10^6$ c
2-nonanol	0 a	0 a	0 a	$2,46 \cdot 10^5$ a	$1,41 \cdot 10^6$ ab	$8,53 \cdot 10^5$ ab	$3,86 \cdot 10^6$ b	$9,94 \cdot 10^5$ ab	$2,08 \cdot 10^6$ ab
Aldehidi									
3-metil butanal	$1,53 \cdot 10^7$ c	$3,45 \cdot 10^6$ b	$4,49 \cdot 10^6$ b	$1,85 \cdot 10^6$ ab	$3,45 \cdot 10^6$ b	0 a	0 a	0 a	0 a
Heksanal	$1,27 \cdot 10^6$ b	$1,51 \cdot 10^6$ b	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge G: Povprečne vrednosti vsebnosti (površina kromatografskih vrhov) hlapnih organskih spojin (HOS) v Nanoškem siru na različne dneve zorenja v poletni sezoni

HOS	Dnevi zorenja								
Aldehidi	0. dan (sirčina)	7. dan	21. dan	35. dan	49. dan	63. dan	77. dan	99. dan	187. dan
Heptanal	$9,64 \cdot 10^5$ abc	$8,52 \cdot 10^5$ ac	$5,27 \cdot 10^5$ c	$1,46 \cdot 10^6$ ab	$2,21 \cdot 10^6$ bd	$3,08 \cdot 10^6$ de	$3,45 \cdot 10^6$ e	$1,67 \cdot 10^6$ ab	$1,80 \cdot 10^6$ ab
Oktanal	0 c	$1,34 \cdot 10^6$ d	$4,35 \cdot 10^5$ ac	$6,89 \cdot 10^5$ ab	$7,88 \cdot 10^5$ ab	$7,92 \cdot 10^5$ ab	$1,01 \cdot 10^6$ bd	$8,02 \cdot 10^5$ ab	$2,34 \cdot 10^6$ e
Benzaldehid	$1,06 \cdot 10^7$ cde	$2,92 \cdot 10^7$ f	$1,53 \cdot 10^7$ e	$8,21 \cdot 10^6$ bcd	$2,32 \cdot 10^6$ a	$4,50 \cdot 10^6$ ab	$3,89 \cdot 10^6$ abc	$4,24 \cdot 10^6$ ab	$1,13 \cdot 10^7$ de
Nonanal	$1,91 \cdot 10^6$ bd	$1,39 \cdot 10^6$ ab	$1,19 \cdot 10^6$ ac	$1,48 \cdot 10^6$ abd	$1,63 \cdot 10^6$ abd	$1,24 \cdot 10^6$ abc	$1,17 \cdot 10^6$ abc	$8,45 \cdot 10^5$ c	$1,94 \cdot 10^6$ d
Benzeneacetaldehid	0 a	0 a	0 a	0 a	$7,02 \cdot 10^5$ b	$1,11 \cdot 10^5$ a	0 a	$3,10 \cdot 10^5$ a	$1,14 \cdot 10^6$ c
2-nonenal	0 a	0 a	$2,06 \cdot 10^5$ b	0 a	$1,01 \cdot 10^5$ ab	0 a	51078 a	0 a	0 a
Dekanal	0 b	$6,43 \cdot 10^5$ ac	0 b	$9,07 \cdot 10^5$ a	0 b	$7,97 \cdot 10^5$ a	$2,81 \cdot 10^5$ bc	$7,12 \cdot 10^5$ ac	$9,52 \cdot 10^5$ a
Estri									
Etil ester očetne kisline	0 ab	0 a	$4,74 \cdot 10^6$ b	$1,01 \cdot 10^7$ c	$3,55 \cdot 10^6$ ab	$1,84 \cdot 10^6$ ab	$1,23 \cdot 10^6$ ab	$1,54 \cdot 10^6$ ab	$4,13 \cdot 10^6$ ab
Etil ester butanojske kisline	$2,41 \cdot 10^7$ c	$4,90 \cdot 10^7$ bc	$6,46 \cdot 10^7$ abc	$8,33 \cdot 10^7$ a	$7,46 \cdot 10^7$ ab	$7,01 \cdot 10^7$ ab	$5,73 \cdot 10^7$ abc	$8,21 \cdot 10^7$ a	$1,90 \cdot 10^8$ d
Butil ester očetne kisline	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	$1,82 \cdot 10^7$ b
1-butanol 3-metil acetate	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	$4,41 \cdot 10^5$ b	0 a
Etil ester heksanojske kisline	$5,53 \cdot 10^6$ a	$6,65 \cdot 10^6$ a	$6,63 \cdot 10^6$ a	$7,61 \cdot 10^6$ a	$7,68 \cdot 10^6$ a	$6,31 \cdot 10^6$ a	$7,41 \cdot 10^6$ a	$8,98 \cdot 10^6$	$2,82 \cdot 10^7$ b
Metil ester oktanojske kisline	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Etil ester oktanojske kisline	$1,15 \cdot 10^6$ ab	$5,63 \cdot 10^5$ a	$5,44 \cdot 10^5$ a	$1,62 \cdot 10^6$ b	$1,51 \cdot 10^6$ ab	$9,56 \cdot 10^5$ ab	$1,22 \cdot 10^6$ ab	$1,53 \cdot 10^6$ ab	$5,93 \cdot 10^6$ c
Etil ester dekanjske kisline	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Ketoni									
2,3-butandion (Diacetil)	$1,98 \cdot 10^8$ e	$1,50 \cdot 10^8$ d	$1,27 \cdot 10^8$ c	$2,82 \cdot 10^7$ b	$1,03 \cdot 10^7$ ab	$4,74 \cdot 10^6$ a	$1,98 \cdot 10^6$ a	$2,75 \cdot 10^6$ a	$4,35 \cdot 10^6$ a
2-butanon	0 a	0 a	0 a	$6,28 \cdot 10^6$ b	$1,85 \cdot 10^6$ a	$5,27 \cdot 10^5$ a	$4,37 \cdot 10^5$ a	$5,81 \cdot 10^5$ a	$8,24 \cdot 10^5$ a
2-pentanon	0 c	$9,22 \cdot 10^6$ c	$1,34 \cdot 10^7$ c	$1,20 \cdot 10^8$ ab	$1,37 \cdot 10^8$ ab	$1,39 \cdot 10^8$ a	$1,05 \cdot 10^8$ ab	$1,43 \cdot 10^8$ a	$8,69 \cdot 10^7$ b
2,3-pentandion	$9,49 \cdot 10^7$ d	$4,56 \cdot 10^7$ c	$3,73 \cdot 10^7$ b	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
3-hidroksi 2-butanon (Acetoin)	$2,61 \cdot 10^8$ d	$1,86 \cdot 10^8$ b	$1,79 \cdot 10^8$ b	$4,76 \cdot 10^7$ c	$1,42 \cdot 10^7$ a	$6,28 \cdot 10^6$ a	$3,39 \cdot 10^6$ a	$5,43 \cdot 10^6$ a	$7,11 \cdot 10^6$ a
2-hidroksi 3-pentanon	$2,66 \cdot 10^7$ d	$3,36 \cdot 10^7$ b	$2,90 \cdot 10^7$ b	$6,47 \cdot 10^6$ c	$2,59 \cdot 10^6$ a	$1,45 \cdot 10^6$ a	$1,08 \cdot 10^6$ a	$1,23 \cdot 10^6$ a	0 a
2,3-heptandion	$2,62 \cdot 10^6$ b	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge G: Povprečne vrednosti vsebnosti (površina kromatografskih vrhov) hlapnih organskih spojin (HOS) v Nanoškem siru na različne dneve zorenja v poletni sezoni

HOS	Dnevi zorenja								
Ketoni	0. dan (sirčina)	7. dan	21. dan	35. dan	49. dan	63. dan	77. dan	99. dan	187. dan
2-heptanon	$7,69 \cdot 10^6$ b	$3,97 \cdot 10^7$ b	$4,65 \cdot 10^7$ b	$2,27 \cdot 10^8$ a	$2,88 \cdot 10^8$ a	$3,77 \cdot 10^8$ c	$3,92 \cdot 10^8$ c	$2,74 \cdot 10^8$ a	$2,42 \cdot 10^8$ a
2-oktanon	$2,27 \cdot 10^5$ a	$4,00 \cdot 10^5$ a	$4,41 \cdot 10^5$ a	$2,75 \cdot 10^6$ ab	$6,42 \cdot 10^6$ bc	$8,52 \cdot 10^6$ c	$9,88 \cdot 10^6$ c	$2,90 \cdot 10^6$ ab	$2,38 \cdot 10^6$ ab
6-metil 5-hepten-2-on	$4,41 \cdot 10^5$ b	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
2-nonanon	$6,06 \cdot 10^5$ a	$2,17 \cdot 10^6$ a	$3,00 \cdot 10^6$ a	$5,24 \cdot 10^7$ a	$1,16 \cdot 10^8$ bc	$1,19 \cdot 10^8$ b	$1,59 \cdot 10^8$ b	$5,46 \cdot 10^7$ ac	$4,03 \cdot 10^7$ a
8-nonen-2-on	0 ab	0 a	0 a	0 a	$1,15 \cdot 10^6$ d	$5,60 \cdot 10^5$ bc	$9,36 \cdot 10^5$ cd	0 a	0 a
2-undekanon	0 ab	$3,27 \cdot 10^5$ a	$4,59 \cdot 10^5$ a	$1,88 \cdot 10^6$ a	$1,42 \cdot 10^7$ b	$3,79 \cdot 10^6$ ab	$4,35 \cdot 10^6$ ab	$1,36 \cdot 10^6$ a	$2,16 \cdot 10^6$ a
Ostale HOS									
2-okten	$3,33 \cdot 10^6$ b	$2,37 \cdot 10^6$ b	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Toluen	$4,67 \cdot 10^7$ a	$3,46 \cdot 10^7$ a	$3,83 \cdot 10^7$ a	$3,41 \cdot 10^7$ a	$1,38 \cdot 10^7$ b	$1,04 \cdot 10^7$ b	$9,53 \cdot 10^6$ b	$1,32 \cdot 10^7$ b	$2,94 \cdot 10^7$ a
Etilbenzen	$6,09 \cdot 10^6$ ab	$8,40 \cdot 10^6$ b	$7,52 \cdot 10^6$ b	$8,92 \cdot 10^6$ b	$2,07 \cdot 10^6$ a	$9,25 \cdot 10^5$ a	$7,63 \cdot 10^5$ a	$4,97 \cdot 10^5$ a	$8,13 \cdot 10^6$ b
Dimetil sulfone	0 a	$1,10 \cdot 10^6$ cde	$1,51 \cdot 10^6$ e	$1,30 \cdot 10^6$ de	$7,62 \cdot 10^5$ bc	$4,91 \cdot 10^5$ ab	$7,06 \cdot 10^5$ abcd	$1,95 \cdot 10^5$ a	$6,26 \cdot 10^5$ ab
Undekan	$5,45 \cdot 10^5$ ab	$7,14 \cdot 10^5$ ab	$6,23 \cdot 10^5$ ab	$6,70 \cdot 10^5$ ab	$4,82 \cdot 10^5$ ab	$3,68 \cdot 10^5$ a	$8,18 \cdot 10^5$ b	$5,85 \cdot 10^5$ ab	$1,29 \cdot 10^6$ c
p-krezol	0 a	0 a	0 a	$2,03 \cdot 10^5$ ab	$2,89 \cdot 10^5$ ab	$9,18 \cdot 10^5$ c	$7,45 \cdot 10^5$ bc	$3,13 \cdot 10^5$ ab	$7,01 \cdot 10^5$ bc
δ-oktalakton	$1,38 \cdot 10^6$ abc	$1,39 \cdot 10^6$ abc	$1,70 \cdot 10^6$ a	$1,70 \cdot 10^6$ a	$1,73 \cdot 10^6$ a	$1,23 \cdot 10^6$ bc	$1,21 \cdot 10^6$ bc	$9,76 \cdot 10^5$ b	$1,53 \cdot 10^6$ ac
δ-dekalakton	0 d	$1,80 \cdot 10^6$ a	$2,22 \cdot 10^6$ ab	$2,47 \cdot 10^6$ ab	$2,82 \cdot 10^6$ bc	$2,79 \cdot 10^6$ bc	$2,38 \cdot 10^6$ ab	$1,87 \cdot 10^6$ a	$3,54 \cdot 10^6$ c
Terpeni									
Pinan	$9,45 \cdot 10^6$ e	$6,08 \cdot 10^6$ c	$5,02 \cdot 10^6$ b	$4,68 \cdot 10^6$ ab	$3,88 \cdot 10^6$ a	$4,70 \cdot 10^6$ ab	$4,49 \cdot 10^6$ ab	$4,38 \cdot 10^6$ ab	$7,64 \cdot 10^6$ d
α-pinen	$1,56 \cdot 10^7$ ab	$1,80 \cdot 10^7$ b	$1,73 \cdot 10^7$ ab	$1,66 \cdot 10^7$ ab	$9,71 \cdot 10^6$ d	$6,59 \cdot 10^6$ cd	$4,77 \cdot 10^6$ c	$6,59 \cdot 10^6$ cd	$1,39 \cdot 10^7$ a
Sabinen	$7,79 \cdot 10^5$ abc	$7,31 \cdot 10^5$ b	$9,68 \cdot 10^5$ ab	$1,35 \cdot 10^6$ ac	$1,35 \cdot 10^6$ ac	$1,05 \cdot 10^6$ ab	$1,09 \cdot 10^6$ abc	$1,54 \cdot 10^6$ c	$2,67 \cdot 10^6$ d
Limonen	$2,98 \cdot 10^6$ abcd	$2,76 \cdot 10^6$ ab	$2,75 \cdot 10^6$ ab	$2,44 \cdot 10^6$ abc	$1,38 \cdot 10^6$ ac	$9,29 \cdot 10^5$ c	$4,20 \cdot 10^6$ bd	$2,49 \cdot 10^6$ abc	$4,88 \cdot 10^6$ d
p-cimen	$3,51 \cdot 10^6$ a	$3,29 \cdot 10^6$ a	$3,29 \cdot 10^6$ a	$2,57 \cdot 10^6$ a	$4,48 \cdot 10^6$ a	$1,09 \cdot 10^6$ a	$1,72 \cdot 10^6$ a	$1,94 \cdot 10^6$ a	$3,02 \cdot 10^6$ a
β-kariofilen	$2,41 \cdot 10^6$ c	$8,51 \cdot 10^5$ b	$1,30 \cdot 10^6$ ab	$1,57 \cdot 10^6$ a	$1,50 \cdot 10^6$ a	$1,36 \cdot 10^6$ ab	$1,19 \cdot 10^6$ ab	$1,06 \cdot 10^6$ ab	$2,32 \cdot 10^6$ c

Iste črke v vrstici nakazujejo, da razlike niso statistično značilne (Tukey test, $p < 0.05$)

Priloga H: Povprečne vrednosti vsebnosti (površina kromatografskih vrhov) hlapnih organskih spojin (HOS) v Nanoškem siru na različne dneve zorenja v zimski sezoni

Annex H: Means of volatile organic compounds (arbitrary area units) in Nanos cheese at different stages of ripening time in winter season

HOS	Dnevi zorenja (zimska sezona)								
Maščobne kisline	0. dan (sirčina)	7. dan	21. dan	35. dan	49. dan	63. dan	77. dan	99. dan	187. dan
Ocetna kislina	$1,01 \cdot 10^7$ abc	$1,26 \cdot 10^7$ a	$5,28 \cdot 10^6$ bc	$4,39 \cdot 10^6$ b	$8,83 \cdot 10^6$ abc	$9,74 \cdot 10^6$ ac	$8,21 \cdot 10^6$ abc	$9,70 \cdot 10^6$ abc	$1,22 \cdot 10^7$ a
Butanojska kislina	$8,07 \cdot 10^7$ a	$1,89 \cdot 10^8$ ab	$1,48 \cdot 10^8$ ab	$1,28 \cdot 10^8$ ab	$1,92 \cdot 10^8$ abcd	$2,37 \cdot 10^8$	$1,91 \cdot 10^8$ abc	$2,08 \cdot 10^8$ bcd	$2,81 \cdot 10^8$ d
3-metil butanojska kislina	0 a	0 a	$1,33 \cdot 10^6$ a	$5,75 \cdot 10^6$ a	$1,13 \cdot 10^7$ ac	$2,00 \cdot 10^7$ bc	$2,43 \cdot 10^7$ bc	$3,30 \cdot 10^7$ b	$3,32 \cdot 10^7$ b
2-metil butanojska kislina	0 a	0 a	0 a	$2,54 \cdot 10^6$ ab	$3,79 \cdot 10^6$ ab	$6,29 \cdot 10^6$ bc	$7,34 \cdot 10^6$ bc	$9,95 \cdot 10^6$ b	$9,62 \cdot 10^6$ b
Pentanojska kislina	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	$5,93 \cdot 10^6$ b
Heksanojska kislina	$4,66 \cdot 10^7$ a	$7,00 \cdot 10^7$ ab	$5,94 \cdot 10^7$ a	$6,64 \cdot 10^7$ ab	$8,56 \cdot 10^7$ b	$1,13 \cdot 10^8$ c	$1,23 \cdot 10^8$ cd	$1,47 \cdot 10^8$ de	$1,50 \cdot 10^8$ e
Heptanojska kislina	0 de	$8,61 \cdot 10^5$ abc	$2,88 \cdot 10^5$ e	$6,92 \cdot 10^5$ a	$7,90 \cdot 10^5$ ab	$8,48 \cdot 10^5$ ab	$1,11 \cdot 10^6$ c	$1,03 \cdot 10^6$ bc	0 d
Oktanojska kislina	$5,34 \cdot 10^7$ ab	$5,61 \cdot 10^7$ ab	$4,55 \cdot 10^7$ a	$3,06 \cdot 10^7$ c	$4,58 \cdot 10^7$ a	$4,94 \cdot 10^7$ ab	$5,61 \cdot 10^7$ ab	$6,45 \cdot 10^7$ b	$5,00 \cdot 10^7$ ab
Dekanojska kislina	$1,06 \cdot 10^7$ ab	$1,38 \cdot 10^7$ abc	$1,21 \cdot 10^7$ ab	$1,09 \cdot 10^7$ a	$1,38 \cdot 10^7$ abc	$1,60 \cdot 10^7$ bc	$1,72 \cdot 10^7$ cd	$2,15 \cdot 10^7$ d	$1,81 \cdot 10^7$ cd
Alkoholi									
2-butanol	0 a	0 a	21691 a	0 a	$3,22 \cdot 10^5$ a	$3,39 \cdot 10^5$ a	$1,86 \cdot 10^5$ a	$2,83 \cdot 10^5$ a	$1,01 \cdot 10^6$ b
1-butanol	0 a	0 a	0 a	0 a	$3,40 \cdot 10^5$ a	$2,41 \cdot 10^6$ a	$3,56 \cdot 10^6$ a	$5,10 \cdot 10^6$ a	$1,91 \cdot 10^7$ b
2-pentanol	0 b	0 b	$1,09 \cdot 10^6$ bc	$4,45 \cdot 10^6$ abc	$9,67 \cdot 10^6$ abc	$1,12 \cdot 10^7$ ac	$1,44 \cdot 10^7$ a	$1,51 \cdot 10^7$ a	$2,77 \cdot 10^7$ d
3-metil 1-butanol	0 a	$5,98 \cdot 10^6$ a	$2,78 \cdot 10^6$ a	$6,48 \cdot 10^7$ b	$2,72 \cdot 10^6$ a	$3,09 \cdot 10^6$ a	$4,21 \cdot 10^6$ a	$4,59 \cdot 10^6$ a	$1,37 \cdot 10^7$ a
2,3-butandiol	$3,05 \cdot 10^6$ abc	0 a	$1,30 \cdot 10^7$ d	$7,98 \cdot 10^6$ bcd	$1,27 \cdot 10^7$ cd	$1,01 \cdot 10^7$ bcd	$5,49 \cdot 10^6$ abc	$3,95 \cdot 10^6$ ab	0 a
2-metil 3-pentanol	$7,87 \cdot 10^6$ b	$2,58 \cdot 10^7$ d	$5,18 \cdot 10^6$ bc	$5,55 \cdot 10^6$ b	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
1-heksanol	$6,89 \cdot 10^6$ abc	$4,64 \cdot 10^6$ a	$3,44 \cdot 10^6$ a	$3,29 \cdot 10^6$ a	$4,82 \cdot 10^6$ b	$8,17 \cdot 10^6$ bc	$9,96 \cdot 10^6$ cd	$1,23 \cdot 10^7$ d	$2,48 \cdot 10^7$ e
2-heptanol	0 ab	$2,47 \cdot 10^5$ a	$1,04 \cdot 10^7$ ab	$1,45 \cdot 10^7$ abc	$1,94 \cdot 10^7$ bc	$2,69 \cdot 10^7$ cd	$5,91 \cdot 10^7$ f	$4,50 \cdot 10^7$ ef	$3,67 \cdot 10^7$ de
2-etil 1-heksanol	$1,47 \cdot 10^6$ a	$1,62 \cdot 10^6$ a	$1,30 \cdot 10^6$ a	$1,05 \cdot 10^6$ a	$9,86 \cdot 10^5$ a	$9,79 \cdot 10^5$ a	$1,31 \cdot 10^6$ a	$1,67 \cdot 10^6$ a	$1,56 \cdot 10^6$ a
2-nonanol	0 ab	0 a	$6,08 \cdot 10^5$ ab	$1,21 \cdot 10^6$ bc	$8,61 \cdot 10^5$ ab	$1,08 \cdot 10^6$ bc	$2,89 \cdot 10^6$ d	$1,93 \cdot 10^6$ c	0 a
Aldehidi									
3-metil butanal	0 a	0 a	$2,21 \cdot 10^6$ a	$1,33 \cdot 10^7$ b	$1,42 \cdot 10^6$ a	0 a	0 a	0 a	0 a
Heksanal	0 a	$2,76 \cdot 10^6$ b	$1,61 \cdot 10^5$ a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge H: Povprečne vrednosti vsebnosti (površina kromatografskih vrhov) hlapnih organskih spojin (HOS) v Nanoškem siru na različne dneve zorenja v zimski sezoni

HOS	Dnevi zorenja (zimska sezona)									
Aldehidi	0. dan (sirnina)	7. dan	21. dan	35. dan	49. dan	63. dan	77. dan	99. dan	187. dan	
Heptanal	0 ^a	1,35 · 10 ⁶ ab	3,93 · 10 ⁶ c	3,00 · 10 ⁶ c	1,45 · 10 ⁶ ab	1,02 · 10 ⁶ ab	1,72 · 10 ⁶ b	1,34 · 10 ⁶ ab	5,75 · 10 ⁵ ab	
Oktanal	1,14 · 10 ⁷ a	1,01 · 10 ⁷ a	8,92 · 10 ⁶ a	9,76 · 10 ⁶ a	7,95 · 10 ⁶ a	9,17 · 10 ⁶ a	1,09 · 10 ⁷ a	8,80 · 10 ⁶ a	1,15 · 10 ⁷ a	
Benzaldehid	0 ^{bc}	3,56 · 10 ⁷ e	1,77 · 10 ⁷ d	6,52 · 10 ⁶ a	7,44 · 10 ⁶ a	6,62 · 10 ⁶ a	0 ^b	7,29 · 10 ⁶ a	5,88 · 10 ⁶ ac	
Nonanal	1,01 · 10 ⁶ ab	3,00 · 10 ⁶ b	5,02 · 10 ⁶ c	5,37 · 10 ⁶ c	2,12 · 10 ⁶ ab	1,81 · 10 ⁶ ab	2,28 · 10 ⁶ ab	2,15 · 10 ⁶ ab	7,95 · 10 ⁵ a	
Benzenacetaldehid	0 ^a	0 ^a	3,98 · 10 ⁵ b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	9,80 · 10 ⁵ c	
2-nonenal	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	
Dekanal	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1,39 · 10 ⁶ b	0 ^a	0 ^a	
Estri										
Etil ester očetne kisline	0 ^a	0 ^a	0 ^a	7,87 · 10 ⁵ a	9,46 · 10 ⁵ a	2,22 · 10 ⁶ a	1,49 · 10 ⁶ a	1,78 · 10 ⁶ a	1,21 · 10 ⁷ b	
Etil ester butanojske kisline	2,72 · 10 ⁷ ab	8,26 · 10 ⁷ bc	3,05 · 10 ⁷ a	3,73 · 10 ⁷ a	5,86 · 10 ⁷ ab	7,80 · 10 ⁷ bc	6,17 · 10 ⁷ ab	7,02 · 10 ⁷ abc	1,03 · 10 ⁸ c	
Butil ester očetne kisline	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1,68 · 10 ⁷ b	
1-butanol 3-metil acetate	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	3,09 · 10 ⁶ b	5,93 · 10 ⁶ c	
Etil ester heksanojske kisline	6,56 · 10 ⁶ a	1,07 · 10 ⁷ ab	7,35 · 10 ⁶ a	9,12 · 10 ⁶ a	9,92 · 10 ⁶ ab	1,27 · 10 ⁷ b	1,70 · 10 ⁷ c	1,97 · 10 ⁷ c	2,82 · 10 ⁷ d	
Metil ester oktanojske kisline	1,18 · 10 ⁶ a	1,29 · 10 ⁶ a	4,26 · 10 ⁵ bc	1,26 · 10 ⁶ a	4,85 · 10 ⁵ c	1,36 · 10 ⁶ a	1,51 · 10 ⁶ a	1,33 · 10 ⁶ a	0 ^b	
Etil ester oktanojske kisline	5,34 · 10 ⁶ abc	4,25 · 10 ⁶ ab	5,51 · 10 ⁶ bc	2,63 · 10 ⁶ a	3,36 · 10 ⁶ a	3,67 · 10 ⁶ a	5,91 · 10 ⁶ bc	5,91 · 10 ⁶ bc	6,82 · 10 ⁶ c	
Etil ester dekanjske kisline	4,40 · 10 ⁶ a	2,88 · 10 ⁶ a	2,25 · 10 ⁶ ab	1,05 · 10 ⁶ b	2,15 · 10 ⁶ ab	2,06 · 10 ⁶ ab	2,53 · 10 ⁶ ab	3,20 · 10 ⁶ a	3,69 · 10 ⁶ a	
Ketoni										
2,3-butandion (diacetil)	3,23 · 10 ⁸ c	1,32 · 10 ⁸ b	2,78 · 10 ⁷ a	3,35 · 10 ⁷ a	7,89 · 10 ⁶ a	5,74 · 10 ⁶ a	2,02 · 10 ⁶ a	2,61 · 10 ⁶ a	0 ^a	
2-butanon	0 ^a	2,73 · 10 ⁷ b	1,28 · 10 ⁴ a	0 ^a	5,69 · 10 ⁵ a	1,13 · 10 ⁶ a	3,77 · 10 ⁵ a	7,43 · 10 ⁵ a	7,06 · 10 ⁵ a	
2-pentanon	2,95 · 10 ⁶ a	1,81 · 10 ⁷ a	8,62 · 10 ⁷ b	6,11 · 10 ⁷ ab	7,05 · 10 ⁷ ab	5,27 · 10 ⁷ ab	4,78 · 10 ⁷ ab	5,72 · 10 ⁷ ab	2,32 · 10 ⁷ a	
2,3-pentandion	3,18 · 10 ⁷ c	4,98 · 10 ⁷ d	0 ^a	9,56 · 10 ⁶ b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	
3-hidroksi 2-butanon (acetoin)	3,75 · 10 ⁸ d	1,95 · 10 ⁸ c	5,06 · 10 ⁷ b	8,28 · 10 ⁷ ab	1,25 · 10 ⁷ a	9,73 · 10 ⁶ a	5,72 · 10 ⁶ a	3,06 · 10 ⁶ a	0 ^a	
2-hidroksi 3-pentanon	8,16 · 10 ⁶ bc	2,83 · 10 ⁷ d	7,50 · 10 ⁶ c	6,82 · 10 ⁶ bcd	1,41 · 10 ⁶ ab	1,53 · 10 ⁶ ab	0 ^a	0 ^a	0 ^a	
2,3-heptandion	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	
2-heptanon	5,49 · 10 ⁶ a	9,03 · 10 ⁷ a	4,51 · 10 ⁸ e	4,09 · 10 ⁸ de	2,37 · 10 ⁸ bc	1,42 · 10 ⁸ ab	2,78 · 10 ⁸ cd	2,58 · 10 ⁸ bc	3,78 · 10 ⁷ a	
2-oktanon	0 ^{ab}	7,24 · 10 ⁵ ab	1,11 · 10 ⁷ d	6,52 · 10 ⁶ c	2,01 · 10 ⁶ ab	1,17 · 10 ⁶ ab	4,40 · 10 ⁶ bc	3,04 · 10 ⁶ abc	0 ^a	
6-metil 5-hepten-2-on	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge H: Povprečne vrednosti vsebnosti (površina kromatografskih vrhov) hlapnih organskih spojin (HOS) v Nanoškem siru na različne dneve zorenja v zimski sezoni

HOS	Dnevi zorenja (zimski sezona)								
Ketoni	0. dan (sirčina)	7. dan	21. dan	35. dan	49. dan	63. dan	77. dan	99. dan	187. dan
2-nonanon	$1,93 \cdot 10^6$ ^a	$8,02 \cdot 10^6$ ^a	$2,10 \cdot 10^8$ ^c	$1,41 \cdot 10^8$ ^{bc}	$4,91 \cdot 10^7$ ^a	$1,72 \cdot 10^7$ ^a	$7,77 \cdot 10^7$ ^{ab}	$5,13 \cdot 10^7$ ^a	$7,36 \cdot 10^6$ ^a
8-nonen-2-on	0 ^{ab}	0 ^a	0 ^a	$3,76 \cdot 10^5$ ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a	$9,87 \cdot 10^4$ ^{ab}	0 ^a
2-undekanon	0 ^a	$1,22 \cdot 10^6$ ^a	$6,03 \cdot 10^6$ ^b	$1,17 \cdot 10^7$ ^c	$2,01 \cdot 10^6$ ^a	$1,78 \cdot 10^6$ ^a	$3,74 \cdot 10^6$ ^{ab}	$2,47 \cdot 10^6$ ^{ab}	$1,63 \cdot 10^6$ ^a
Ostale HOS									
2-okten	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Toluen	$7,54 \cdot 10^6$ ^c	$7,34 \cdot 10^6$ ^c	$4,08 \cdot 10^6$ ^a	$2,08 \cdot 10^6$ ^b	$3,57 \cdot 10^6$ ^a	$3,76 \cdot 10^6$ ^a	$3,92 \cdot 10^6$ ^a	$2,96 \cdot 10^6$ ^{ab}	$2,93 \cdot 10^6$ ^{ab}
Etilbenzen	$2,37 \cdot 10^6$ ^{ab}	$5,64 \cdot 10^6$ ^{ab}	$4,67 \cdot 10^6$ ^{ab}	$9,35 \cdot 10^6$ ^b	$3,93 \cdot 10^5$ ^a	$7,18 \cdot 10^5$ ^a	$9,58 \cdot 10^5$ ^a	$6,77 \cdot 10^5$ ^a	$7,25 \cdot 10^5$ ^a
Dimetil sulfone	0 ^a	$1,54 \cdot 10^6$ ^b	0 ^a	0 ^a	$2,30 \cdot 10^5$ ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Undekan	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	$5,01 \cdot 10^5$ ^b
p-krezol	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
δ-oktalakton	$2,07 \cdot 10^6$ ^{abc}	$4,43 \cdot 10^6$ ^d	$3,95 \cdot 10^6$ ^d	$2,94 \cdot 10^6$ ^b	$2,96 \cdot 10^6$ ^b	$2,45 \cdot 10^6$ ^{bc}	$2,12 \cdot 10^6$ ^{ac}	$1,58 \cdot 10^6$ ^a	$1,61 \cdot 10^6$ ^a
δ-dekalakton	$1,87 \cdot 10^6$ ^b	$4,06 \cdot 10^6$ ^a	$3,79 \cdot 10^6$ ^a	$3,27 \cdot 10^6$ ^{ab}	$3,62 \cdot 10^6$ ^a	$3,57 \cdot 10^6$ ^a	$4,11 \cdot 10^6$ ^a	$3,91 \cdot 10^6$ ^a	$3,33 \cdot 10^6$ ^{ab}
Terpeni									
Pinan	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	$2,64 \cdot 10^6$ ^a	$2,77 \cdot 10^6$ ^b	$2,65 \cdot 10^6$ ^b	0 ^b
α-pinen	$2,22 \cdot 10^6$ ^a	$6,42 \cdot 10^6$ ^b	$3,20 \cdot 10^6$ ^a	$2,32 \cdot 10^6$ ^a	$2,98 \cdot 10^6$ ^a	$3,39 \cdot 10^6$ ^a	$2,48 \cdot 10^6$ ^a	$2,43 \cdot 10^6$ ^a	$2,77 \cdot 10^6$ ^a
Sabinen	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Limonen	$4,20 \cdot 10^6$ ^c	$3,50 \cdot 10^6$ ^c	$1,63 \cdot 10^6$ ^{ab}	$1,02 \cdot 10^6$ ^b	$1,78 \cdot 10^6$ ^{ab}	$2,42 \cdot 10^6$ ^a	$2,44 \cdot 10^6$ ^a	$1,58 \cdot 10^6$ ^{ab}	$1,63 \cdot 10^6$ ^{ab}
p-cimen	$1,56 \cdot 10^6$ ^{de}	$1,80 \cdot 10^6$ ^e	$9,18 \cdot 10^5$ ^{abc}	$5,80 \cdot 10^5$ ^a	$1,06 \cdot 10^6$ ^{bcd}	$1,10 \cdot 10^6$ ^{cd}	$1,33 \cdot 10^6$ ^d	$7,70 \cdot 10^5$ ^{abc}	$6,68 \cdot 10^5$ ^{ab}
β-kariofilen	0 ^b	$9,55 \cdot 10^5$ ^a	$8,54 \cdot 10^5$ ^a	$8,06 \cdot 10^5$ ^a	$1,03 \cdot 10^6$ ^a	$8,22 \cdot 10^5$ ^a	$9,69 \cdot 10^5$ ^a	$9,42 \cdot 10^5$ ^a	$9,97 \cdot 10^5$ ^a

Iste črke v vrstici nakazujejo, da razlike niso statistično značilne (Tukey test, $p < 0.05$)

Priloga I: Skupna vsota hlapnih organskih spojin (HOS) po funkcionalnih skupinah in deleži posamezne skupine v Nanoškem siru v različnih sezonah

Annex: Total sum of volatile compounds by functional groups and their parts in Nanos cheese by season

MAŠČOBNE KISLINE	0. dan–sirnina	7. dan	21. dan	35. dan	49. dan	63. dan	77. dan	99. dan	187. dan
VSOTA MK – poletje	$7,19 \cdot 10^7$	$1,55 \cdot 10^8$	$2,18 \cdot 10^8$	$2,71 \cdot 10^8$	$2,51 \cdot 10^8$	$2,36 \cdot 10^8$	$2,14 \cdot 10^8$	$2,93 \cdot 10^8$	$6,65 \cdot 10^8$
DELEŽ MK (%) – poletje	8,53	18,54	24,03	25,77	23,56	21,42	19,35	28,72	41,79
VSOTA MK – zima	$2,01 \cdot 10^8$	$3,42 \cdot 10^8$	$2,72 \cdot 10^8$	$2,49 \cdot 10^8$	$3,62 \cdot 10^8$	$4,52 \cdot 10^8$	$4,28 \cdot 10^8$	$4,94 \cdot 10^8$	$5,60 \cdot 10^8$
DELEŽ POLETJE (%) – zima	19,21	30,50	21,45	20,29	39,76	50,86	39,78	44,72	57,95
ALKOHOLI									
VSOTA ALKOHOLI – poletje	$2,63 \cdot 10^7$	$3,84 \cdot 10^7$	$7,33 \cdot 10^7$	$9,46 \cdot 10^7$	$8,20 \cdot 10^7$	$8,10 \cdot 10^7$	$1,05 \cdot 10^8$	$1,02 \cdot 10^8$	$1,95 \cdot 10^8$
DELEŽ ALKOHOLI (%) – poletje	3,12	4,58	8,07	9,00	7,68	7,36	9,48	10,05	12,27
VSOTA ALKOHOLI – zima	$1,93 \cdot 10^7$	$3,83 \cdot 10^7$	$3,79 \cdot 10^7$	$1,03 \cdot 10^8$	$5,19 \cdot 10^7$	$6,42 \cdot 10^7$	$1,01 \cdot 10^8$	$8,99 \cdot 10^7$	$1,25 \cdot 10^8$
DELEŽ ALKOHOLI (%) – zima	1,84	3,42	2,99	8,39	5,70	7,22	9,39	8,13	12,88
ALDEHIDI									
VSOTA ALDEHIDI – poletje	$3,00 \cdot 10^7$	$3,84 \cdot 10^7$	$2,22 \cdot 10^7$	$1,46 \cdot 10^7$	$1,12 \cdot 10^7$	$1,05 \cdot 10^7$	$9,85 \cdot 10^6$	$8,58 \cdot 10^6$	$1,95 \cdot 10^7$
DELEŽ ALDEHIDI (%) – poletje	3,56	4,58	2,44	1,39	1,05	0,96	0,89	0,84	1,22
VSOTA ALDEHIDI – zima	$1,24 \cdot 10^7$	$5,27 \cdot 10^7$	$3,87 \cdot 10^7$	$3,79 \cdot 10^7$	$2,04 \cdot 10^7$	$1,86 \cdot 10^7$	$1,63 \cdot 10^7$	$1,96 \cdot 10^7$	$1,97 \cdot 10^7$
DELEŽ ALDEHIDI (%) – zima	1,18	4,71	3,05	3,09	2,24	2,09	1,51	1,77	2,04
ESTRI									
VSOTA ESTRI – poletje	$3,08 \cdot 10^7$	$5,62 \cdot 10^7$	$7,65 \cdot 10^7$	$1,03 \cdot 10^8$	$8,73 \cdot 10^7$	$7,92 \cdot 10^7$	$6,72 \cdot 10^7$	$9,46 \cdot 10^7$	$2,46 \cdot 10^8$
DELEŽ ESTRI (%) – poletje	3,66	6,71	8,42	9,76	8,18	7,20	6,07	9,28	15,48
VSOTA ESTRI – zima	$4,47 \cdot 10^7$	$1,02 \cdot 10^8$	$4,60 \cdot 10^7$	$5,22 \cdot 10^7$	$7,55 \cdot 10^7$	$1,00 \cdot 10^8$	$9,01 \cdot 10^7$	$1,05 \cdot 10^8$	$1,77 \cdot 10^8$
DELEŽ ESTRI (%) – zima	4,26	9,07	3,63	4,26	8,29	11,25	8,37	9,51	18,25
KETONI									
VSOTA KETONI – poletje	$5,91 \cdot 10^8$	$4,68 \cdot 10^8$	$4,36 \cdot 10^8$	$4,93 \cdot 10^8$	$5,91 \cdot 10^8$	$6,60 \cdot 10^8$	$6,78 \cdot 10^8$	$4,85 \cdot 10^8$	$3,86 \cdot 10^8$
DELEŽ KETONI (%) – poletje	70,13	55,79	47,97	46,84	55,38	60,07	61,18	47,60	24,24
VSOTA KETONI – zima	$7,49 \cdot 10^8$	$5,51 \cdot 10^8$	$8,50 \cdot 10^8$	$7,62 \cdot 10^8$	$3,83 \cdot 10^8$	$2,33 \cdot 10^8$	$4,20 \cdot 10^8$	$3,79 \cdot 10^8$	$7,06 \cdot 10^7$
DELEŽ KETONI (%) – zima	71,43	49,12	67,06	62,16	42,06	26,24	39,00	34,28	7,30
OSTALE HOS									
VSOTA OSTALE HOS – poletje	$5,80 \cdot 10^7$	$5,04 \cdot 10^7$	$5,19 \cdot 10^7$	$4,69 \cdot 10^7$	$2,20 \cdot 10^7$	$1,71 \cdot 10^7$	$1,62 \cdot 10^7$	$1,76 \cdot 10^7$	$4,52 \cdot 10^7$
DELEŽ OSTALE HOS (%) – poletje	6,89	6,01	5,71	4,46	2,06	1,55	1,46	1,73	2,84
VSOTA OSTALE HOS – zima	$1,39 \cdot 10^7$	$2,30 \cdot 10^7$	$1,65 \cdot 10^7$	$1,76 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^7$	$1,05 \cdot 10^7$	$1,11 \cdot 10^7$	$9,12 \cdot 10^6$	$9,10 \cdot 10^6$
DELEŽ OSTALE HOS (%) – zima	1,32	2,05	1,30	1,44	1,18	1,18	1,03	0,83	0,94
TERPENI									
VSOTA TERPENI – poletje	$3,47 \cdot 10^7$	$3,17 \cdot 10^7$	$3,06 \cdot 10^7$	$2,92 \cdot 10^7$	$2,23 \cdot 10^7$	$1,57 \cdot 10^7$	$1,75 \cdot 10^7$	$1,80 \cdot 10^7$	$3,44 \cdot 10^7$
DELEŽ TERPENI (%) – poletje	4,12	3,79	3,37	2,78	2,09	1,43	1,58	1,77	2,16
VSOTATERPENI – zima	$7,98 \cdot 10^6$	$1,27 \cdot 10^7$	$6,60 \cdot 10^6$	$4,73 \cdot 10^6$	$6,85 \cdot 10^6$	$1,04 \cdot 10^7$	$1,00 \cdot 10^7$	$8,37 \cdot 10^6$	$6,06 \cdot 10^6$
DELEŽ TERPENI (%) – zima	0,76	1,13	0,52	0,39	0,75	1,17	0,93	0,76	0,63

Priloga J: Vsebnost hlapnih organskih spojin (HOS) v Nanoškem siru, zorenem na različnih lokacijah
Annex: The content of volatile organic compounds in Nanos cheese ripen at different location

HOS		Vipava		Poljane	
		Povprečje	RSD ¹	Povprečje	RSD
MAŠČOBNE KISLINE					
V1	Ocetna kislina	$3,34 \cdot 10^7$	0,08	$3,22 \cdot 10^7$	0,29
V2	Butanojska kislina	$1,95 \cdot 10^8$	0,06	$3,27 \cdot 10^8$	0,43
V3	3-metil butanojska kislina	$1,90 \cdot 10^6$	0,14	$1,10 \cdot 10^7$	0,48
V4	2-metil butanojska kislina			$3,34 \cdot 10^6$	0,39
V6	Heksanojska kislina	$1,77 \cdot 10^8$	0,05	$1,94 \cdot 10^8$	0,36
V7	Heptanojska kislina	$1,87 \cdot 10^6$	0,13	$2,56 \cdot 10^6$	0,13
V8	Oktanojska kislina	$7,70 \cdot 10^7$	0,08	$3,72 \cdot 10^7$	0,42
V9	Dekanojska kislina	$1,76 \cdot 10^7$	0,13	$1,02 \cdot 10^7$	0,42
ALKOHOLI					
V10	2-butanol	$1,76 \cdot 10^6$	0,32	$4,18 \cdot 10^6$	0,48
V11	1-butanol	$1,78 \cdot 10^6$	0,21	$1,58 \cdot 10^6$	0,42
V12	2-pentanol	$1,38 \cdot 10^6$	0,40	$2,79 \cdot 10^6$	0,48
V13	3-metil 1-butanol			$1,13 \cdot 10^6$	0,60
V16	1-heksanol	$3,88 \cdot 10^6$	0,08	$5,51 \cdot 10^6$	0,08
V17	2-heptanol	$2,39 \cdot 10^6$	0,14	$1,11 \cdot 10^7$	0,31
V18	2-etil, 1-heksanol			$1,18 \cdot 10^6$	0,38
V19	2-nonanol	$4,22 \cdot 10^6$	0,10	$1,69 \cdot 10^6$	0,38
ALDEHIDI					
V22	Heptanal	$1,31 \cdot 10^6$	0,18	$6,29 \cdot 10^5$	0,03
V23	Oktanal	$3,40 \cdot 10^7$	0,05	$1,61 \cdot 10^7$	0,30
V24	Benzaldehid	$1,56 \cdot 10^7$	0,07	$1,38 \cdot 10^7$	0,30
V25	Nonanal	$1,56 \cdot 10^6$	0,21	$7,48 \cdot 10^5$	0,49
V28	Dekanal	$2,15 \cdot 10^6$	0,11		
ESTRI					
V29	Etil estre ocetne kisline	$4,10 \cdot 10^7$	0,73	$6,49 \cdot 10^6$	0,28
V30	Etil ester butanojske kisline	$1,02 \cdot 10^7$	0,06	$3,21 \cdot 10^7$	0,48
V33	Etil estre heksanojske kisline	$9,90 \cdot 10^6$	0,15	$1,78 \cdot 10^7$	0,36
V34	Metil ester oktanojske kisline	$4,07 \cdot 10^6$	0,04	$3,21 \cdot 10^6$	0,31
V35	Etil ester oktanojske kisline	$7,66 \cdot 10^6$	0,27	$4,04 \cdot 10^6$	0,23
V36	Etil ester dekanoske kisline	$2,99 \cdot 10^6$	0,18	$1,77 \cdot 10^6$	0,41
KETONI					
V37	2,3 butandion (diacetil)	$2,22 \cdot 10^6$	0,03	$4,06 \cdot 10^6$	0,63
V38	2-butanon	$3,32 \cdot 10^6$	0,32	$5,32 \cdot 10^6$	0,45
V39	2-pentanon	$1,20 \cdot 10^7$	0,14	$6,14 \cdot 10^6$	0,46
V41	3-hidroksi 2-butanon (acetoin)	$1,15 \cdot 10^6$	0,07	$3,97 \cdot 10^6$	0,56
V44	2-heptanon	$8,07 \cdot 10^7$	0,10	$8,62 \cdot 10^7$	0,21
V45	2-oktanon	$1,77 \cdot 10^6$	0,40	$1,18 \cdot 10^6$	0,24
V47	2-nonanon	$3,36 \cdot 10^7$	0,24	$1,11 \cdot 10^7$	0,40
V49	2-undekanon	$1,98 \cdot 10^6$	0,11	$8,13 \cdot 10^5$	0,30
TERPENI					
V51	α -pinen	$3,10 \cdot 10^5$	0,11	$1,00 \cdot 10^6$	0,50
V53	Limonen	$5,47 \cdot 10^6$	0,30	$6,50 \cdot 10^6$	0,09
V54	p-cimen	$9,41 \cdot 10^5$	0,31	$2,01 \cdot 10^6$	0,56
V55	β -kariofilen	$7,77 \cdot 10^5$	0,14	$4,68 \cdot 10^5$	0,46
OSTALE KOMPONENTE					
V57	Toluen	$1,32 \cdot 10^7$	0,04	$1,34 \cdot 10^7$	0,07
V58	Etilbenzen	$6,57 \cdot 10^5$	0,16	$1,65 \cdot 10^6$	0,45
V62	δ -oktalakton	$3,21 \cdot 10^6$	0,08	$1,80 \cdot 10^6$	0,42
V63	δ -dekalakton	$3,78 \cdot 10^6$	0,09	$1,65 \cdot 10^6$	0,39

¹relativna standardna napaka

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Iva BOLTAR

**OBLIKOVANJE IN VREDNOTENJE AROME
NANOŠKEGA SIRA – OD KRME DO SIRA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015