

Acta agriculturae Slovenica

Letnik 88, številka 2
Volume 88, Number 2

88-2

Acta agriculturae Slovenica

str. 63–150

Ljubljana,
december 2006

Acta agriculturae Slovenica, 88(december 2006)2

Acta agriculturae Slovenica

Izdaja	Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana. Letno izhajata dva letnika vsak z dvema številka.
Glavni in odgovorni urednik	prof. dr. Peter DOVČ
Tehnični urednik	Jože STOPAR
Uredniški odbor	prof. dr. Tajana ČERNY (Zagreb), akad. prof. dr. Remzi BAKALLI (Athens, ZDA), prof. dr. Zdenko PUHAN (Zürich), dr. Michel BONNEAU (Saint Gilles), prof. dr.dr.h.c. Franz PIRCHNER (Innsbruck), prof. dr. Jasna M.A. STEKAR (Ljubljana), dr. Drago BABNIK (Ljubljana), prof. dr. Jernej TURK (Maribor), izr.prof. dr. Dejan ŠKORJANC (Maribor), doc. dr. Slavica GOLC TEGER (Ljubljana), izr.prof. dr. Milena KOVAČ (Ljubljana)
Jezikovni pregled	Vanda ŠUŠTERŠIČ
Razmnoževanje	ROTOSI d.o.o., Tomačevo 19, SI-1000 Ljubljana, v 450 izvodih
Naslov uredništva	Groblje 3, SI-1230 Domžale, tel.: 01 7217 800, telefaks: 01 7241 005
E-pošta	peter.dovc@bfro.uni-lj.si
Domača stran	http://aas.bf.uni-lj.si/
Letna naročnina	6 000 SIT (25,04 EUR)*, za tujino 30 EUR
Posamezna številka	4 000 SIT (16,69 EUR)*, za tujino 20 EUR
Imetnik računa	UL, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana
Banka	BANKA SLOVENIJE, Slovenska 35, SI-1505 Ljubljana
Račun	01100-6030707410, sklic na številko 40-521-200341
Sofinancira	Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije
Zbornik redno selektivno zajemajo	AGRIS, CAB Abstracts, COBISS in FSTA
Dokumentacijska obdelava	Mednarodna: Slovenski nacionalni center AGRIS Domača: INDOK Oddelka za zootehniko
Publikacije v zameno za Zbornik pošljite na naslov	Centralna knjižnica Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana, p.p. 2995
Avtorska pravica	© 2006 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

* Za izračun cen v EUR je uporabljen centralni paritetni tečaj, ki znaša 1,00 EUR = 239,640 SIT.

Acta agriculturae Slovenica

Letnik 88

Ljubljana, december 2006

Številka 2

VSEBINA / CONTENTS

	stran page
MIKROBIOLOGIJA / MICROBIOLOGY	
The first decade of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) in microbial ecology Blaž STRES.....	65
Sposobnost biohidrogenacije linolne kisline pri vampni bakteriji <i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5^T Tadej ČEPELJNIK in Estelle DEVILLARD	75
GENETIKA / GENETICS	
Kappa casein gen (CSN3) in horse: genetic variability in exon 1 and 4 Sebastijan HOBOR, Tanja KUNEJ, Tina LENASI and Peter DOVČ.....	83
EKONOMIKA / ECONOMICS	
Odzivnost ponudbe v prašičereji Janez JENKO in Emil ERJAVEC.....	91
RURALNA SOCIOLOGIJA / RURAL SOCIOLOGY	
Kmečka družina na prehodu od tradicionalnosti k post-modernosti Lucija PINTERIČ, Majda ČERNIČ-ISTENIČ in Jernej VRTAČNIK.....	101
PREHRANA / NUTRITION	
Nova spoznanja o krmni vrednosti krmil iz ogrščice in njihova uporaba pri krmljenju domačih živali Heinz JEROCH in Janez SALOBIR.....	117
The effect of conjugated linoleic acid on the growth of weaned piglets Miran KASTELIC and Drago KOMPAN.....	133

Subject index by Agrovoc descriptors	
Tomaž BARTOL.....	141
Subject index by Agris category codes	
Nataša SIARD.....	143
Abecedno kazalo avtorjev	145
Navodila avtorjem.....	147
Notes for authors.....	149

THE FIRST DECADE OF TERMINAL RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (T-RFLP) IN MICROBIAL ECOLOGY

Blaž STRES^{a)}

^{a)} Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Dept. of Food Science and Technology, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, Ph.D., M.Sc., e-mail: blaz.stres@bf.uni-lj.si.

Received November 06, 2006, accepted November 27, 2006.

Delo je prispelo 06. novembra 2006, sprejeto 27. novembra 2006.

ABSTRACT

Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) was introduced to environmental microbiology only a decade ago but it soon became a molecular tool of choice, due to its high throughput and phylogenetic resolution. Fierce discussions accompanied the new method leading to sophistication of the data preparation, acquisition, manipulation and standardization of analysis. Consequently, numerous approaches were proposed at various steps and also criticized. As a result, a combination of variable percentage threshold and Bray-Curtis index used in non-metric multidimensional scaling are now being accepted. Their combination offers a balance between noise elimination and information retention yielding a powerful and yet easily interpreted method to examine community patterns based on T-RFLP data. Its current state of the art and future developments highlight the potential of the method in the field of microbial ecology. However, a more standardized approach and a higher level of control at all stages of T-RFLP fingerprinting are needed.

Key words: microbiology / microbial ecology / molecular genetics / T-RFLP

PRVO DESETLETJE RESTRIKCIJSKEGA POLIMORFIZMA DOLŽINE KONČNIH FRAGMENTOV (T-RFLP) V MIKROBNI EKOLOGIJI

IZVLEČEK

Proučevanje restriksijskega polimorfizma dolžine končnih fragmentov (T-RFLP) tarčnih genov se na področju mikrobne ekologije pričelo šele pred desetletjem. Metoda je hitro postala zelo priljubljena zaradi svoje filogenetske ločljivosti in enostavne analize velikega števila vzorcev. Razvoj priprave vzorcev, zajemanja podatkov, obdelave in standardizacije metod analize so v veliki meri obkrožale silovite razprave. Raziskovalci so tako na vsaki stopnji kritično preizkusili veliko število različnih pristopov. Danes kombinacija tehnik, kot so prag variabilnih deležev, koeficient Bray-Curtis v ne-merskem večdimenzionalnem umerjanju predstavlja ravnotežje med odstranjevanjem šuma in zadrževanjem informacij. Tako je nastalo zelo uporabno orodje z relativno enostavno interpretacijo za proučevanje tipizacijskih profilov T-RFLP mikrobnih združb. Njegova trenutna stopnja dovršenosti in predvidene razvojne izpopolnitve v prihodnosti kažejo na velik potencial tega orodja na področju mikrobne ekologije. Hkrati pa bo potrebno uveljaviti tudi bolj standardizirane in bolje kontrolirane izvedbe posameznih stopenj tipizacije mikrobnih združb s T-RFLP.

Ključne besede: mikrobiologija / mikrobna ekologija / molekularna genetika / T-RFLP

INTRODUCTION

The Golden Age of Microbiology in the early 1900's was shaped on extensive isolation and characterization of pure cultures. As the limitations of culture methods became clear many different techniques for evaluating microbial communities were developed in order to enable 'modern' microbiologists to understand natural microbial community structure and dynamics. The far majority of such studies use polymerase chain reaction (PCR) to amplify genes of interest directly from environmental samples without culture bias. However, the use of PCR introduced other sources of bias which were already addressed elsewhere (Kent and Triplett, 2002). In addition to Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA), Single Stranded Conformation Polymorphism analysis (SSCP), Thermal and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (TGGE and DGGE), Length Heterogeneity analysis (LH), Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) was introduced in early 1997 (Liu *et al.*, 1997; Bruce, 1997). As all of the above mentioned approaches produce a pattern or profile of nucleic acids amplified from a sample, T-RFLP emerged as a tool providing researchers with a large amount of easily analyzed data on microbial community structure. As with any other method, certain aspects need to be highlighted from fundamentally technical perspective. After all, they influence substantially the final conclusions drawn from studies in microbial ecology.

HOW TERMINAL RESTRICTION FRAGMENTS (T-RFS) ARE MADE

T-RFLP patterns are generated and analyzed in a series of steps that combine PCR, restriction enzyme digestion and capillary or gel electrophoresis. From a collection of phylogenetically divergent sequences for the target gene, primers homologous to conserved regions in target gene are designed and used for amplification of a fragment. One primer, either forward or reverse, is labeled at 5'-end with a fluorochrome. The resulting fluorescently labeled amplicons are then digested with a number of restriction enzymes in separate reactions. Restriction enzymes are usually specific for tetranucleotide recognition sequence in amplified product. The digested amplicons are purified in order to remove excess salts resulting from PCR and restriction reactions. Subsequently, they are subjected to capillary electrophoresis using DNA sequencer with a fluorescence detector.

In this way only fluorescently labeled fragments are detected, their length automatically determined according to internal standards and their fluorescent signal integrated as peak height or area. The programs enable simple transfer of resulting sequencer data to text files that are easily transported. Alternatively, raw chromatographic files can also be analyzed with programs used for comparing spectral data (e.g. BioNumerics, Gelcompare (AppliedMath, Belgium)). The patterns of T-RF peaks can then be numerically compared between samples using a variety of multivariate statistical methods (Kitts, 2001; Osborn *et al.*, 2000; Dunbar *et al.*, 2001).

SECOND THOUGHTS ABOUT T-RFLP

As any other method, T-RFLP analysis also suffers from its own inherent pitfalls that need to be taken into account before, during and after data collection. In the next paragraphs the following crucial steps in T-RFLP analysis are highlighted: (i) sample preparation and DNA extraction; (ii) PCR specificity and bias; (iii) digestion with restriction endonucleases; (iv) pseudo-terminal restriction fragments; (v) incomplete digests; (vi) differential migration; (vii) aligning raw T-RFLP data sets.

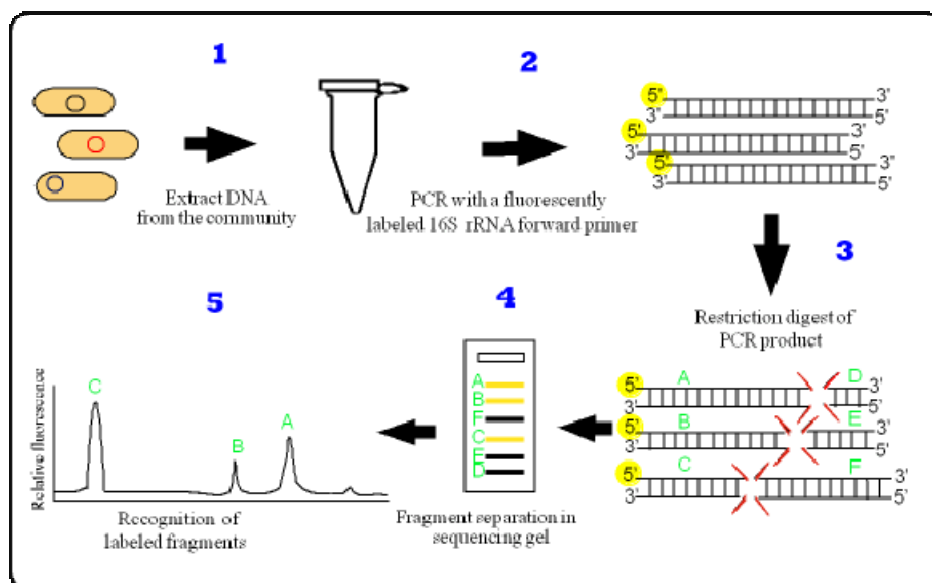


Figure 1. Schematic diagram of T-RFLP approach to community fingerprinting of genes coding for 16S rRNA (modified from Grüntzig *et al.*, 2002).

Slika 1. Shematičen prikaz tehnike T-RFLP pri tipizaciji genov za 16S rRNA združbe (povzeto po Grüntzig in sod., 2002).

(i) Sample preparation and DNA extraction

Fidelity of sample preparation and DNA extraction is often neglected in published literature although this part is possibly one of the most crucial steps in the analysis as representative samples, representative sample size and DNA extraction protocol should be selected and verified carefully to minimize the possibility of later misinterpretation of results (Morris *et al.*, 2002; Stres *et al.*, 2004; Stres and Tiedje, 2006). In order to minimize the inherent random bias present in soil, sediment or feces sample composition, numerous replicate samples should be analyzed or even replicate extractions pooled (Kitts, 2001). As subsequent steps in preparation of T-RFLP patterns may be highly dependent on starting DNA purity and extent of fragmentation, it is needless to say that those factors should be controlled and kept at minimum or at least constant among various samples and replicates. It would also be worthwhile to consider estimating the degree of cell lysis, DNA adhesion and presence of extracellular DNA during preparation of DNA extracts from complex environmental samples.

(ii) PCR specificity and bias

When amplifying complex mixtures of sequences PCR bias has been identified (Farely *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 2001). It has been shown that to all odds the abundance of a specific amplicon in a mixture is reproducible and in direct proportion to the abundance of that template in a sample containing high diversity (Clement *et al.*, 2000; Dunbar *et al.*, 2000). However, primer selection and PCR conditions are those that can be constantly improved. The numbers of ribosomal, housekeeping and other functional genes sequences in databases increase exponentially thus enabling constant improvement in primer quality through their evaluation using freely available tools (Amplicon (<http://sourceforge.net/projects/amplicon/>), Blast at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), FunGene (<http://flyingcloud.cme.msu.edu/fungene/>)) (Lueders and Friedrich, 2003). In this respect also classical optimization of PCR composition and cycling parameters should not be neglected. However, one thing should constantly be kept in mind: it is in the nature of PCR to amplify dominant groups of target sequences with higher

chance. In a community comprised of 10^8 cells, only those populations representing up to 0.1% (10^5 cells) of microbial community have the chance to be detected at best. The appearance or loss of a fragment from a fingerprint is therefore interpreted as a result of changes in detectability, but not a complete loss of population (Kent and Triplett, 2002).

(iii) Digestion with restriction endonucleases

Amplicon digestion with restriction endonucleases should be explored to determine which enzyme results in the highest number of peaks detected therefore yielding 'best' enzyme for each primer and PCR conditions set. Although diversity of fragments is increased, such approaches using only one restriction enzyme, limit general comparability of the results. Therefore the use of multiple enzymes is suggested in order to obtain better resolution between different communities (Kitts, 2001; Engebretson and Moyer 2003; Rosch and Bothe, 2005). By choosing the appropriate number and types of restriction endonucleases, an investigator increases the probability that the resulting arrays of T-RFs size distributions more accurately reflect the natural diversity of microbial populations within a sampled community (Engebretson and Moyer, 2003; Lueders and Friedrich, 2003).

(iv) Pseudo-terminal restriction fragments

Formation of single-stranded pseudo-terminal restriction fragments (pseudo T-RFs) was reported (Egert and Friedrich, 2003) as a result of incomplete amplification during PCR. Their fraction is dependent on the number of cycles used in PCR. Digestion of amplicons with single-strand-specific nucleases prior to separation on sequencer completely eliminated pseudo T-RFs. However, the importance of formation of secondary structures during PCR amplification for pseudo T-RF formation should be less of a concern during amplification of functional genes as their secondary structure is usually less complex in comparison to genes for 16S rRNA (Egert and Friedrich, 2003).

(v) Incomplete digests

In some instances enzymatic digestion of amplicons yields incomplete digests due to various reasons, such as template purity, complexity, PCR salt interference or traces of PCR enhancers and additives. Therefore longer restriction times and higher enzyme concentration in restriction reactions of purified PCR products from ecological samples are suggested. Absence of incomplete digestion can be determined by simple incubation of restriction reaction mixtures for varying periods of time, verifying disappearance of uncleaved amplicons and plotting the number of fragments relative to duration of restriction reaction.

(vi) Differential migration

Since there is some experimental error in reading of the fragment lengths, the matching of them must be tolerant to minor differences. Furthermore, this error is highly dependent on the fragment length as shown in table 1. The major fraction of discrepancies in lengths of sequenced fragment and those observed at separation of T-RF on sequencer, arise from differential migration of internal ladder (usually ROX or TAMRA labeled) and the FAM or other labeled sample fragments. The reason is that for example ROX label has 12 more carbon atoms than 6-FAM label (Applied Biosystems). In addition, some marker ladders are double stranded yielding double peaks after separation thus confusing size calling software that then needs to be manually adjusted.

Table 1. Informative scale of difference – lengths of T-RFs and maximum length differences (Marsh *et al.*, 2000)

Preglednica 1. Informativni razpon ugotovljenih razlik – dolžine končnih restrikcijskih fragmentov (T-RF) in maksimalne razlike v dolžinah (Marsh in sod., 2000)

True length of T-RF, bp Prava dolžina T-RF, bp	1	200	400	600	800	1200
Difference, bp Razlika, bp	0.5	0.8	1.2	4	8	20

Purine content (A, G) of fragments was also identified as a source of size variation indicating that subtle differences in molecular weight can significantly affect the observed T-RF length. The remaining factor regularly observed is a variation between observed T-RF lengths in replicate runs of the same sample. The primary cause of this variation was attributed to fluctuations in ambient temperature and minute variations in gel composition and capillary quality after each use (Kaplan and Kitts, 2003). A way to mitigate the above mentioned discrepancies is to determine migration size of already sequenced fragments under strictly defined conditions.

(vii) Aligning raw T-RFLP data sets

The first step in analyzing T-RFLP data that is often overlooked in the literature is an appropriate method for aligning the resulting peaks of the raw T-RFLP data sets. Peaks reflecting the size of T-RFs present are measured in base pairs, and the area and height of each peak are determined in relative fluorescence units. The Gene-scan software (Applied Biosystems), most often used according to published literature, generally reports fragments sizes to 1/100 of a base pair. Aligning macros of resulting files in Excel (Microsoft) were developed and used successfully to round peak sizes to the nearest integer value and then align all the peaks against the rounded sizes of the fragments thus significantly reducing subjective biases and time during manual peak aligning (Rees *et al.*, 2004; Hewson and Fuhrman 2006). However, the issue of the use of peak area versus peak height has not been resolved yet completely as the use of one over the other has its positive and negative aspects and the choice is more sample dependant (Dunbar *et al.*, 2000; Dunbar *et al.*, 2001).

NO MAN'S LAND

Getting to the point where T-RFLP data is collected from sequencer may appear complicated at first glance. This is, however, not the case as analyzing T-RFLP data is currently even more challenging, facing us with an immediate question: how should one reflect on the collected data so as not to overstretch the final conclusions?

It is very important to choose an appropriate community analysis method for use with T-RFLP. The most simplistic approach is to compare presence or absence of different peaks. Such approach is valid, however it lacks the benefits of a quantitative analysis. So far, principal component analysis (PCA) (Braker *et al.*, 2001), cluster analysis (Braker *et al.*, 2001; Kraigher *et al.*, 2006), self-organizing neural networks (Dollhopf *et al.*, 2001) and multidimensional scaling (Wolsing and Prieme, 2004) were explored. However, the T-RFLP analysis requires a more standardized approach, especially one that has statistical rigor and that is easy to carry out. However, before analyzing data sets and extracting information about similarity or changes in community structure, we have to focus on data preparation and standardization.

In this respect, the use of T-RFLP has been criticized by some to lack the degree of resolution required for analyzing complex microbial communities, such as those found in soil (Dunbar *et al.*, 2000; Dunbar *et al.*, 2001; Engebretson and Moyer, 2003) because of the difficulty in assigning accurate identity to each T-RF in complex profiles of genes. Individual soil samples contain a large diversity of microorganisms, estimating many thousand of species (Curtis and Sloan, 2004). Therefore each peak in a profile generated from DNA extracted from a complex community must represent multiple T-RFs of the same size originating from different species (Sessitsch *et al.*, 2001; Engebretson and Moyer, 2003). An *in-silico* analysis of a set of 4600 16S rRNA gene sequences suggested that each T-RF would represent a mean of 9.1 to 18.5 different sequences depending on restriction endonuclease selected (Engebretson and Moyer, 2003). While assignment of identities may be uncertain at present, it does not preclude the use of the fingerprinting technique to compare whole communities on relative basis.

There is, yet, no agreed-upon method for normalizing samples with different amounts of DNA, which would allow easy comparison of profiles with different total amounts of fluorescent label (Blackwood *et al.*, 2003). An appropriate method for calculating a threshold, baseline or minimum fluorescence cutoff needs to be determined as any similarity measures based on presence or absence of small noisy peaks may have profound impact on the conclusions drawn. There are three published threshold determination protocols: (i) constant percentage threshold (Sait *et al.*, 2003), (ii) constant baseline threshold (Dunbar *et al.*, 2001) and (iii) variable percentage threshold (Osborne *et al.*, 2006).

(i) Constant percentage threshold (Sait *et al.*, 2003)

T-RFs that are present in at least one sample are added to the data set of all profiles that lack that T-RF, and an area or height of zero is assigned to that T-RF if it was not detected. A threshold area value is then used to remove small peaks that may be detected purely as a result of the amount of DNA applied before separation. The area that each T-RF contributed is calculated as a proportion of the total area for all T-RFs in that profile. These proportions are then assigned to the appropriate T-RFs as a relative area. T-RFs that contribute less than a designated threshold percentage are reassigned a value of zero.

(ii) Constant baseline threshold (Dunbar *et al.*, 2001)

The total areas in all of the profiles in a data set are normalized to the same value as that of the profile having the smallest total area. Then all of the peaks in each trace are reduced proportionally by the factor required to yield that normalized total area. This constant baseline threshold is usually set as the smallest peak area detected in the unmanipulated data sets (rounded up to 50 fluorescent units). Peaks with an area equal to or smaller than this threshold are then removed from profiles after normalization. Additional analyses can then be carried out reanalyzing the data using constant baseline threshold set to 100 fluorescent units or more.

(iii) Variable percentage threshold (Osborne *et al.*, 2006)

As in the previous approach, the total area of each profile is divided by different arbitrary values (divisors) to yield numbers that are used as percentage thresholds. For each divisor, all peaks that contribute less than the percentage threshold calculated for that profile are removed. Then, for each divisor, the remaining number of peaks is plotted against the total area, so that each profile contributes one point on that plot. Osborne *et al.* (2006) have found that in case there is very little variation in the total area of the profiles, there is no detectable relationship between the number of peaks and the total area, and no threshold needs to be applied. If standardization is required, a useful divisor to start with is 1,000 times the mean total area for the data set. Different

divisors are then tested, and the divisor that results in the weakest relationship between the number of peaks remaining and the initial total area can be considered to be the optimal divisor. The unique percentage threshold value for each profile is calculated by dividing the total area of that profile by the optimal divisor. Peaks that contribute less than that percentage threshold are then removed from that profile before analyzing relationships.

The comparison of all three approaches suggested that their use allows the subsequent analysis to detect real groupings by eliminating noise. However, the variable percentage method appears to be the most useful of the methods tested, providing a balance between noise elimination and information retention (Osborne *et al.*, 2006). The authors of this study also suggested once more that pooling PCRs (Hackl *et al.*, 2004), using a number of restriction enzymes and generating consensus profiles from multiple separations (Dunbar *et al.*, 2001) enable more confident interpretation of T-RFLP analyses to be made.

If there is no agreed upon and widely accepted method for standardization of T-RFLP raw data files there is even less congruency regarding the methods comparing the resulting standardized and manipulated T-RFLP data. So far, various similarity indices, grouping methods were proposed and criticized. Although often described in the literature, Euclidean coefficients are not an appropriate method to determine similarity within T-RFLP data sets, as they do not handle adequately data containing blocks of double zeros or joint absence of fragments (Rees *et al.*, 2004). Also the application of PCA has not been widely accepted as a good tool for T-RFLP data analysis as the data may not always be normally distributed. The most widely accepted are Bray-Curtis coefficient coupled with non-metric multidimensional scaling (NM-MDS) (Wolsing and Prieme, 2004), analysis of similarity (ANOSIM) and similarity percentage (SIMPER) (Rees *et al.*, 2004). The Bray-Curtis coefficient is suggested as an ideal coefficient to be used for the construction of similarity matrices. Its strengths include its ability to deal with data sets containing multiple blocks of zeros in a meaningful manner. In combination with NM-MDS this yields a powerful and yet easily interpreted method to examine community patterns based on T-RFLP data (Wolsing and Prieme, 2004).

FUTURE DIRECTIONS

Currently, efforts are directed towards coupling of quantitative PCR and T-RFLP assays into single molecular assay allowing quantification first and subsequent fingerprinting of detected microbial community members (Yu *et al.*, 2005). In addition, T-RFLP profiles of DNA and RNA extracted from complex microbial communities are now being explored, on ribosomal and functional level (Mengoni *et al.*, 2005) and linked to *in-silico* analyses of matching T-RFs with sequence database entries. Such approaches technically enable high-throughput identification of dominant groups of moderately complex microbial communities (Marsh *et al.*, 2000; Kent *et al.*, 2003). Further, multiplex-T-RFLP was just recently explored thus enabling rapid and simultaneous analysis of bacteria, archaea and fungi in the same PCR reaction (Singh *et al.*, 2006).

However, all technical issues have not been resolved yet and in this respect significant advances need to be made to enable sound use of all aspects of T-RFLP as a method. As data preparation and handling can now be more uniformly conducted also differences in microbial community structures can be more rigorously tested and determined. To identify the critical factors that influence population distribution and activity in complex environments more sophisticated statistical and mathematical techniques are needed to model the relationship between microbial community structure, function and environmental characteristics (Morris *et al.*, 2002; Stres and Tiedje, 2006). In this respect, reconsidering the above mentioned pitfalls, fundamental methodological aspects of T-RFLP and published evidence on their misuse all lead

to sobering conclusion: if more effort were put into standardizing the T-RFLP methodological approaches first, more reliable interpretations of ecologically relevant data would emerge from a decade of T-RFLP use in microbial ecology. As one would put it – a decade of many missed opportunities, but many hard lessons learned. I think it's time to put them to practice.

ACKNOWLEDGMENTS

I acknowledge support of J.M. Tiedje, I. Mahne, G. Avguštin and I. Mandič Mulec.

REFERENCES

- Blackwood, C.B./ Marsh, T.L./ Kim, S.H./ Paul, E.A. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(2003), 926–932.
- Braker G./ Ayala-del-Rio, H.L./, Devol, A.H./ Fesefeldt A./ Tiedje J.M. Community structure of denitrifiers, bacteria, and archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(2001), 1893–901.
- Bruce, K.D. Analysis of *mer* gene subclass within bacterial communities in soils and sediments resolved by fluorescent – PCR – restriction fragment length polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(1997), 4914–4919.
- Clement, B.G./ Kehl, L.E./ DeBord, K.L./ Kitts, C.L. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J. Microbiol. Methods*, 31(1998), 135–142.
- Curtis, T.P./ Sloan W.T. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7(2004), 221–226.
- Dollhopf, S.L./ Hasham, S.A./ Tiedje, J.M. Interpreting 16S rDNA T-RFLP data: Application of self-organizing maps and principal component analysis to describe community dynamics and convergence. *Microb. Ecol.*, 42(2001), 495–505.
- Dunbar, J./ Ticknor, L.O./ Kuske, C.R. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(2000), 2943–2950.
- Dunbar, J./ Ticknor, L.O./ Kuske C.L. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(2001), 190–197.
- Egebert, M./ Friedrich, M.W. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(2003), 2555–2562.
- Engebretson, J.J./ Moyer, C.L. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(2003), 4823–4829.
- Farely, V./ Rainey, F.A./ Stackebrandt, E. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(1995), 2798–2801.
- Grüntzig, V./ Stres, B./ Ayala del Rio, H.L./ Tiedje, J.M. Improved protocol for T-RFLP by capillary electrophoresis. Ribosomal Database Project II protocols, (2002) http://rdp8.cme.msu.edu/html/t-rflp_jul02.html.
- Hackl, E./ Zechmeister-Boltenstern, S./ Bodrossy, L./ Sessitsch, A. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(2004), 5057–5065.
- Hewson, I./ Fuhrman, J.A. Improved strategy for comparing microbial assemblage fingerprints. *Microb. Ecol.*, 51(2006), 147–153.
- Kaplan, C.W./ Kitts, C.L. Variation between observed and true terminal restriction fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *J. Microbiol. Meth.*, 54(2003), 121–125.
- Kent, A.D./ Triplett, E.W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56(2002), 211–236.
- Kent, A.D./ Smith, D.J./ Benson, B.J./ Triplett, E.W. Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(2003), 6768–6776.
- Kitts, C.L. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 2(2001), 17–25.
- Kraigher, B./ Stres, B./ Hacin, J./ Ausec, L./ Mahne, I./ van Elsas, J.D./ Mandič-Mulec, I. Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana Marsh. *Soil Biol. Biochem.*, 38(2006), 2762–2771.

- Liu, W.T./ Marsh, T.L./ Cheng, H./ Forney, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(1997), 4516–4522.
- Lueders, T./ Friedrich, M.W. Evaluation of PCR bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(2003), 320–326.
- Marsh, T.L./ Saxman, P./ Cole, J./ Tiedje, J.M. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Program, a Web-Based Research Tool for Microbial Community Analysis. *Appl Environ Microbiol.*, 66(2000) 3616–3620.
- Mengoni, A./ Tatti, E./ Decorosi, F./ Viti, C./ Bazzicalupo, M./ Giovanetti, L. Comparison of 16S rRNA and 16S rDNA T-RFLP approaches to study bacterial communities in soil microcosms treated with chromate as perturbing agent. *Microb. Ecol.*, 50(2005), 375–384.
- Morris, C.E./ Bardin, M./ Berge, O./ Frey-Klett, P./ Fromin, N./ Girardin, H./ Guinebretière, H.H./ Lebaron, P./ Thiéry, J.M./ Troussellier, M. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(2002), 592–616.
- Osborne, C.A./ Rees, G.N./ Bernstein, Y./ Janssen P.H. New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(2006), 1270–1278.
- Osborn, A.M./ Moore E.R.B./ Timmis N.T. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Env. Microbiol.*, 2(2000), 39–50.
- Qiu, X./ Wu, L./ Huang, H./ McDonel, P.E./ Palumbo, A.V./ Tiedje, J.M. Evaluation of PCR generated chimeras, mutations and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(2001), 880–887.
- Rees, G.N./ Baldwin, D.S./ Watson, G.O./ Perryman, S./ Nielsen, D.L. Ordination and significance testing of microbial community composition derived from terminal restriction fragment length polymorphisms: application of multivariate statistics. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 86(2004), 339–347.
- Rösch, C./ Bothe, H. Improved Assessment of Denitrifying, N₂-Fixing, and Total-Community Bacteria by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using Multiple Restriction Enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2005), 2026–2035.
- Sait, L./ Galic, M./ Strugnell, R.A./ Janssen, P.H. Secretory antibodies do not affect the composition of the bacterial microbiota in the terminal ileum of 10-week old mice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(2003), 2100–2109.
- Sessitsch, A./ Weilharter, A./ Gerzabek, M.H./ Kirchman, H./ Kandeler, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(2001), 4215–4224.
- Singh, B.K./ Nazaries, L./ Munro, S./ Anderson, I. C./ Campbell, C.D. Multiplex-terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(2006), 7278–7285.
- Stres, B./ Mahne, I./ Avguštin, G./ Tiedje, J.M. Nitrous Oxide Reductase (*nosZ*) Gene Fragments Differ between Native and Cultivated Michigan Soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(2004), 301–309.
- Stres, B./ Tiedje, J.M. New frontiers in soil microbiology: How to link structure and function of microbial communities ? Leipzig, Springer-Verlag, 2006, 458 p.
- Wolsing, M./ Prieme, A. Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *Nir* gene fragments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 48(2004), 261–271.
- Yu, C.P./ Ahuja, R./ Sayler, G./ Chu, K.H. Quantitative molecular assay for fingerprinting microbial communities of wastewater and estrogen-degrading consortia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(2005), 1433–1444.

SPOSOBNOST BIOHIDROGENACIJE LINOLNE KISLINE PRI VAMPNI BAKTERIJI *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T

Tadej ČEPELJNIK^{a)} in Estelle DEVILLARD^{b)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, asist., dr., e-pošta: tadej.cepeljnik@bfro.uni-lj.si.

^{b)} Division of Gut Microbiology and Immunology, Rowett Research Institute, Aberdeen, Škotska, dr.

Delo je prispelo 22. avgusta 2006, sprejeto 20. novembra 2006.

Received August 22, 2006, accepted November 20, 2006.

IZVLEČEK

Konjugirane linolne kisline (CLA) so skupina pozicijskih in geometrijskih izomer oktadekadienojske kisline (18:2) in imajo vrsto ugodnih učinkov pri ljudeh in živalih. Glavni tvorci CLA so vampne bakterije, predvsem iz rodu *Butyrvibrio*. Vse več je raziskav, s katerimi se preiskujejo načini za povečanje vsebnosti CLA v prehranskih proizvodih živalskega izvora, kar bi lahko dosegli z uporabo primernih probiotičnih sevov bakterij. Eden izmed njih je tudi *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T. Ta sev je sposoben rasti v gojišču, kjer je prisotna linolna kislina (LA, to je prekursor CLA) vsaj do koncentracije 200 µg ml⁻¹. Pri takih pogojih se rast sicer upočasni, a bakterije še vedno ohranijo svojo aktivnost. Po 24 urah gojenja v gojišču z LA proučevani sev izvede biohidrogenacijo LA do *trans*-vaccenske kisline, ki jo tkivni encim Δ⁹-desaturaza, prisoten v tkivu živali, lahko pretvori nazaj do CLA. Z uporabo seva Mz5^T kot probiotika v prehrani živali bi tako lahko povečali kakovost končnih živil živalskega izvora.

Ključne besede: mikrobiologija / anaerobne bakterije / *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* / konjugirana linolna kislina / biohidrogenacija / vamp

CAPABILITY OF BIOHYDROGENATION OF LINOLEIC ACID IN RUMEN BACTERIUM *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T

ABSTRACT

Conjugated linoleic acids (CLA) are positional and geometrical isomers of octadecadienoic acid (18:2) and have a variety of beneficial effects for the humans and animals. Main producers of CLA are rumen bacteria, mainly from the genus *Butyrvibrio*. Many researches are directed towards increasing the concentration of CLA in food products of animal origin. This could be achieved also with the application of suitable probiotic strains of bacteria. One of those is also *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T. This strain is capable to grow in the presence of linoleic acid (LA, *ie.* the CLA precursor), at least up to concentrations of 200 µg LA/ml. Under these conditions, the lag phase is prolonged, and the growth is slowed down, too. Consequently the bacteria retain their activity. After 24 hour incubation in the medium with LA, the studied strain biohydrogenates the LA to *trans*-vaccenic acid, which can be then transformed back to CLA by tissue Δ⁹-desaturase, which is present in the animal tissue. The strain Mz5^T could be used as a probiotic in animal nutrition in order to increase the quality of the food products of animal origin.

Key words: microbiology / anaerobic bacteria / *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* / conjugated linoleic acid / biohydrogenation / rumen

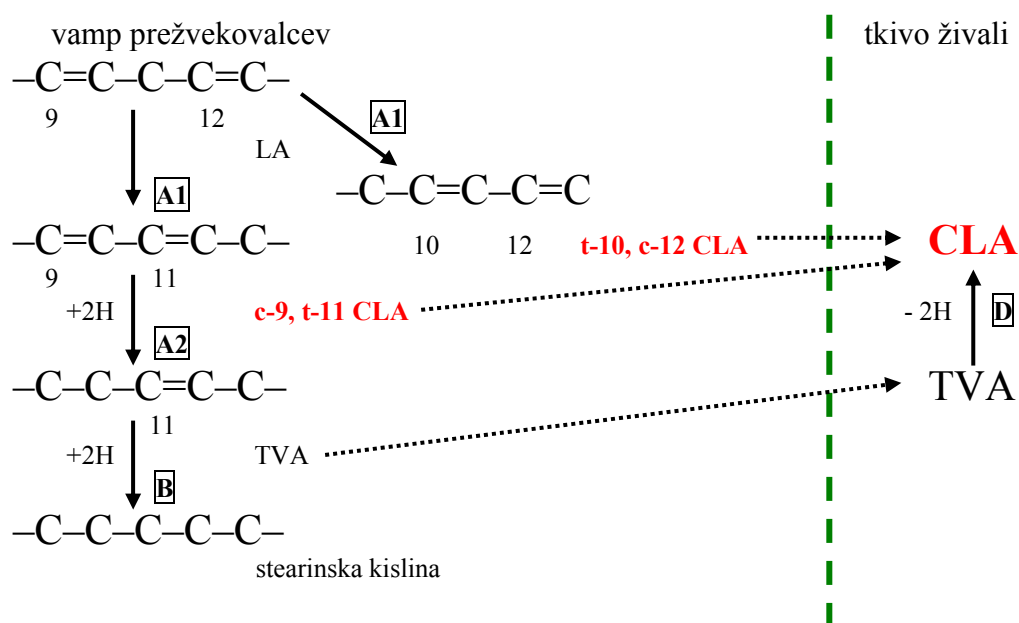
UVOD

Konjugirane linolne kisline (CLA) so skupina pozicijskih in geometrijskih izomer oktadekadienojske kisline (18:2). V mlečni maščobi je večina v *cis*-9, *trans*-11 (c-9, t-11) obliki (80–90 % skupne CLA), nekaj je *trans*-10, *cis*-12 (t-10, c-12) izomere, medtem ko se druge pojavljajo le v sledovih (Bauman in sod., 2000). Najbolj proučena je izomera c-9, t-11, ki ima dokazano antikancerogeno delovanje (preprečuje rak dojke pri modelnih podganah, ki so jo zaužile kot naravno sestavino masla; zavira rast tumorjev prostate in prebavil). Poleg tega ugodno vpliva tako na potek ateroskleroze pri modelnih živalih kot tudi na imunski sistem pri ljudeh in živalih, medtem ko je izomera t-10, c12 vključena v metabolizem maščob pri živalih in ljudeh, kjer povečuje razgradnjo lipidov in oksidacijo maščob (Bauman in sod., 2000; McGuire in McGuire, 2000; Wahle in sod., 2004). Nekatere raziskave pri izomeri t-10, c-12 nakazujejo tudi možne negativne učinke, npr. prooksidativno delovanje. Teh učinkov pri izomeri c-9, t-11 niso zaznali (Wahle in sod., 2004), zato je nujno nadaljnje proučevanje. Vsekakor koristne lastnosti CLA opravičujejo njeno širšo uporabo za izboljšanje kakovosti hrane, pa tudi zdravstvenega stanja pri ljudeh. Trenutno potekajo intenzivne raziskave, kako povečati njeno tvorbo v vampu in nadalje zdravstvenega stanja pri ljudeh (Bauman in sod., 2000; Lipgene, 2004).

Konjugirane linolne kisline najdemo le v mesu prežvekovalcev in njihovem mleku, ne pa tudi v mesu drugačnega izvora. To pomeni, da je za tvorbo CLA odgovorna mikroflora v vampu (Bauman in sod., 2000). Ko lipidi iz krme dospejo v vamp prežvekovalcev, jih tam prisotne mikrobnne lipaze razgradijo in sprostijo proste maščobne kisline, ki jih bakterije nadalje biohidrogenirajo. Najpogosteje je končni produkt nasičena stearinska kislina (18:0) (slika 1). V krmi prežvekovalcev (predvsem olja v semenih iz koncentrirane krme) največji delež maščobnih kislin predstavljata nenasičeni obliki: linolna (18:2, LA) in linolenska (18:3) kislina, ki se večinoma biohidrogenirata v *trans*-vaccensko (18:1, TVA) in stearinsko (18:0) kislino (Harfoot in Hazlewood, 1997). *Butyrivibrio fibrisolvens* je bila prva bakterija, za katero so ugotovili, da je sposobna biohidrogenacije LA (Kepler in sod., 1966). Kasneje so ugotovili, da so v ta proces vključene še druge vampne bakterije (Harfoot in Hazlewood, 1997). Kemp in Lander (1984) sta bakterije na osnovi poteka biohidrogenacije razdelila v dve skupini: skupina A (*Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, *Micrococcus*, *Borrelia*, *Eubacterium*) je lahko reducirala LA do TVA, medtem ko je skupina B (*Fusocillus*) lahko izvršila celotno biohidrogenacijo do stearinske kisline.

Prvi korak v procesu biohidrogenacije je izomerizacija LA, ki jo katalizira linoleat-izomeraza (EC 5.2.1.5; A1 v sliki 1) (Kepler in Tove, 1967). Naslednja stopnja je redukcija CLA do TVA, ki jo katalizira reduktaza (A2 v sliki 1) in je počasnejša od predhodne izomerizacije (Kim in sod., 2000). Popolne redukcije so sposobni le nekateri sevi bakterij (skupina B; B v sliki 1) (Chaudhary in sod., 2004). Popolna hidrogenacija ni zaželena, saj na ta način ne pride do kopičenja koristnih CLA v maščobah živali. CLA se sintetizira iz prekursorja (TVA) tudi v živalskem tkivu, kjer encim Δ^9 -desaturaza (D v sliki 1) oksidira TVA v CLA (Griinari in sod., 2000).

Zaželeno je povečati tvorbo bodisi CLA bodisi TVA v vampu, kar bi dosegli z različnimi načini krmljenja, npr. dodajanjem ribjih olj (Wasowska in sod., 2006), pa tudi s povečanjem števila ali aktivnosti ustreznih mikroorganizmov (Ewaschuk in sod., 2006). Tako se odpira široka možnost uporabe možnih probiotičnih sevov vampnih butirivibrijev v ta namen (Kim, 2003). Ker je tudi proučevani sev *Pseudobutyrovibrio xylanivorans* Mz5^T predstavnik teh mikroorganizmov, smo želeli preveriti, ali je sposoben tvoriti CLA, in določiti njegovo občutljivost za prekursor CLA – to je za linolno kislino.



Slika 1. Biokemijska pot biohidrogenacije linolne kisline v vampu in tvorba CLA v tkivu živali. A1 – izomeraza; A2 – reduktaza; B – reduktaza, D – Δ^9 -desaturaza; LA – linolna kislina, CLA – konjugirana linolna kislina, TVA – *trans*-vaccenska kislina. Povzeto po Bauman in sod. (2000) ter Maia in sod. (2004).

Figure 1. Biochemical pathway of linoleic acid biohydrogenation in rumen and CLA production in animal tissue. A1 – isomerase; A2 – reductase; B – reductase; D – Δ^9 -desaturase; LA – linoleic acid, CLA – conjugated linoleic acid, TVA – *trans*-vaccenic acid. Based on Bauman *et al.* (2000) and Maia *et al.* (2004).

MATERIAL IN METODE

Bakterijska kultura

Vampno bakterijo *P. xylanivorans* Mz5^T smo gojili 24 ur v anaerobnih razmerah v gojišču z vampnim sokom M2 (Hobson, 1969) z različno vsebnostjo linolne kisline (LA, *cis*-9, *cis*-12 oktadekadienojska kislina, Sigma): 0, 50, 100 ali 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gojišča. Rast smo spremljali spektrofotometrično z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 650 nm (OD_{650}). Za analizo vmesnih produktov smo gojenje ustavili pri 15 urah.

Priprava vzorca za plinsko kromatografijo

Ekstrakcija lipidov

1 ml bakterijske kulture smo dodali 1,25 ml 17 mM NaCl v 1 mM žvepleni (VI) kislini ter 100 μl 2 mg ml^{-1} C_{17:0} internega standarda v metanolu (maščobna kislina, ki jo bakterije ne sintetizirajo in jo uporabimo za zanesljivo kvantifikacijo) ter 2,5 ml metanola. Mešanico smo intenzivno stresali 1 minuto. Nato smo mešanici dodali še 2,5 ml 0,2 g l^{-1} butiriliranega hidroksi toluena v kloroformu (BHT prepreči avtooksidacijo dvojnih vezi v maščobnih kislinah) in vorteksirali nadaljnji 2 minuti. Vodno plast smo ločili s centrifugiranjem 10 min pri 2000 g. Vodo v kloroformski frakciji smo odstranili tako, da smo jo spustili skozi plast natrijevega sulfata. Kloroform smo odparili v centrifugalnem izparilniku 30–45 minut. Usedlino smo resuspendirali v 0,5 ml toluena.

Derivatizacija

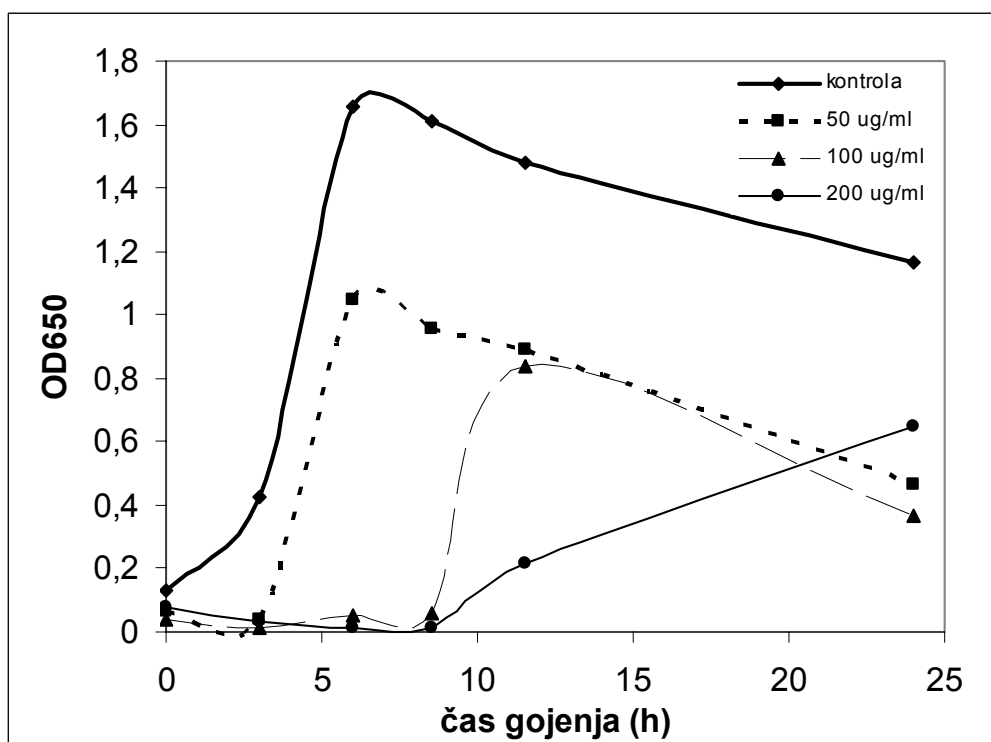
Gornjemu vzorcu smo dodali 100 μl internega standarda v izoheksanu za kontrolo derivatizacije ($\text{C}_{15:0}$, 2 mg ml^{-1}), 1 ml 1 % (v/v) žveplene (VI) kisline v metanolu (za esterifikacijo maščobnih kislin, kjer se metilna skupina zaestri na karboksilno skupino) in ga prepihali z dušikom, da smo preprečili avtooksidacijo, ter inkubirali 1 uro pri 50 °C. Nato smo dodali še 2,5 ml 5 % (m/v) NaCl v vodi, na hitro premešali in estre maščobnih kislin ekstrahirali dvakrat s po 1 ml izoheksana. Nato smo dodali 1,5 ml 2 % (m/v) kalijevega hidrogenkarbonata v vodi, zmešali in gornjo fazo prenesli v novo epruveto ter izoheksan odparili v evaporatorju (~ 1 h). Usedlino smo resuspendirali v 200 μl 0,2 g l^{-1} BHT v izoheksanu, premešali in pripravili za nanos na plinski kromatograf.

Plinska kromatografija

Estre maščobnih kislin smo ločevali na kapilarni koloni (30 m \times 0,25 mm, Supelco) z nosilnim plinom helijem, temperaturami injektorja in detektorja 275 °C in temperaturnim programom 3 min pri 180 °C, nato v 15 min do 220 °C.

REZULTATI

Pri proučevanem sevu *P. xylanivorans* Mz5^T smo preverili, če in do katere stopnje je sposoben biohidrogenirati linolno kislino (LA). Želeli smo uporabiti čim večje koncentracije LA, da bi lažje zaznali končne produkte tega procesa. Zato smo najprej proučili, kako vpliva koncentracija LA na rast izbrane vampne bakterije.



Slika 2. Vpliv povečevanja koncentracije linolne kisline na rast *P. xylanivorans* Mz5^T.

Figure 2. Influence of increasing concentration of linoleic acid on growth of *P. xylanivorans* Mz5^T.

V gojišču M2 brez dodatka LA (kontrola) so se bakterije seva Mz5^T takoj začele namnoževati, skoraj brez zaznavne lag faze (slika 2). Če smo bakterije gojili v gojišču z LA, pa se je občutno povečal čas prilagajanja (lag faza) – pri 50 µg ml⁻¹ na 3 ure, pri 100 in 200 µg ml⁻¹ pa na več kot 8 ur (slika 2). V zadnjem primeru (koncentracija LA 200 µg ml⁻¹) je bila tudi nadaljnja rast občutno počasnejša, kot smo razbrali iz strmine rastne krivulje (slika 2).

Po 24 urah gojenja v gojišču M2 z 200 µg ml⁻¹ LA smo analizirali prisotnost različnih dolgoveriznih maščobnih kislin, ki so bile posledica biohidrogenacije. Ugotovili smo, da so bakterije vso LA reducirale do *trans*-11 vakkenske kisline (TVA), ostale izomere TVA ter CLA smo zaznali le v sledovih. Če smo gojenje ustavili pri 15 urah (na sredini eksponentne faze rasti pri gojišču z 200 µg ml⁻¹ LA, slika 2), smo lahko zaznali še nekaj izomere c-9, t-11 CLA, ki je v teh razmerah le vmesni produkt biohidrogenacije pri sevu Mz5^T (preglednica 1).

Preglednica 1. Koncentracije (µg ml⁻¹) produktov biohidrogenacije linolne kisline pri sevu *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T
 Table 1. Concentration (µg ml⁻¹) of linoleic acid biohydrogenation products for the strain *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T

		Kontrola / control	15 h	24 h
18:2	LA	205,8	2,1	0
18:2	CLA (c-9,t-11)	0	32,7	0
	CLA (t-9,c11)	0	3,8	1,8
	CLA (t-10,c12)	0	0	0
18:1	TVA (t-11)	0	139,6	133,3
	TVA (c-9)	0	1,8	1,8
	TVA (c-11)	0	3,7	3,1
18:0	stearinska kislina / stearic acid	0	0	0

Kontrola je neinokulirano gojišče, ostala dva stolpca pa predstavljata vzorce po 15 oz. 24 urah gojenja; LA – linolna kislina; CLA – konjugirana linolna kislina; TVA – *trans*-vakkenska kislina;
 The control is non-inoculated medium, the other two columns represent samples after 15 or 24-h incubation, respectively; LA – linoleic acid; CLA – conjugated linoleic acid; TVA – *trans*-vaccenic acid;

RAZPRAVA IN SKLEPI

Proučevani sev *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T ima več zanimivih lastnosti, ki ga uvrščajo med kandidatne probiotike za uporabo v prehrani živali (Čepeljnik in sod., 2003). Ena izmed teh je tudi sposobnost tvorbe konjugirane linolne kisline (CLA) in *trans*-vakkenske kisline (TVA) med biohidrogenacijo linolne kisline (LA).

LA je za butirivibrije, ki imajo tanko celično steno (Cheng in Costerton, 1977), toksična in jo butirivibriji na ta način »nevtralizirajo« (Maia in sod., 2004). Butirivibriji spadajo v skupino A in ne biohidrogenirajo LA do stearinske kisline (Harfoot in Hazlewood, 1997). Le nekateri novejši izolati, katerih uvrstitev v rod butirivibrijev še ni dokončna, spadajo v skupino B. Ti LA popolnoma reducirajo (McKain in sod., 2004). Za nekatere predstavnike so ugotovili, da prisotnost LA v gojišču zavira rast – npr. pri *Butyrvibrio hungatei* (prej *B. fibrisolvens*) A38 so to opazili že pri majhnih koncentracijah LA (15 µg ml⁻¹). Če so LA dodali, ko so celice že bile v eksponentni fazi rasti, so tolerirale 10-krat večje koncentracije (Kim in sod., 2000). V naših raziskavah smo ugotovili, da prisotnost LA v gojišču pri sevu Mz5^T sicer podaljša fazo

prilaganja, vendar tudi najvišja uporabljena koncentracija LA ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) ne zavre rasti (slika 2). Podobno velja tudi za večino drugih predstavnikov rodu *Pseudobutyrvibrio* (McKain in sod., 2004). Končni produkt biohidrogenacije pri Mz5^T je bila TVA (Preglednica 1), ki se prenese skozi stene vampa in jo encim Δ^9 -desaturaza, prisoten v tkivu živali, lahko pretvori nazaj do CLA (Griinari in sod., 2000). Ugotovili so, da je kar 78–93 % CLA v mleku posledica tega procesa (Piperova in sod., 2002). Različne izomere CLA imajo vrsto ugodnih učinkov in jih najdemo predvsem v proizvodih, ki izvirajo iz prežvekovalcev (Bauman in sod., 2000). Koncentracija CLA in njena stabilnost pa sta se ohranili tudi v nadaljnjih tehnoloških postopkih pridelave masla ali sira (Ryhänen in sod., 2005). Več različnih sevov butirivibrijev so že uporabili, da so povečali koncentracijo TVA pri prežvekovalcih (Fukuda in sod., 2006a) kot tudi kopičenje CLA pri miših (Fukuda in sod., 2006b). Fukuda in sod. (2006b) predlagajo, da bi sev *B. fibrisolvans* MDT-5 lahko uporabili kot probiotik za družne živali, predvsem pse in mačke, morda tudi pri prehrani perutnine in prašičev. Tako bi lahko vsebnost CLA povečali (ali sprožili njeno tvorbo pri neprežvekovalcih) tudi z uporabo probiotikov iz skupine butirivibrijev (Fukuda in sod., 2006a in 2006b), med katerimi je vsestransko zanimiv kandidat tudi proučevani sev *P. xylanivorans* Mz5^T.

VIRI

- Bauman, D.E./ Baumgard, L.H./ Corl, B.A./ Griinari, J.M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. V: Proceedings of the American Society of Animal Science. Indianapolis, 2000, 8 str.
<http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf> (5. avg. 2006), 15 str.
- Chaudhary, L.C./ McKain, N./ Richardson, A.J./ Barbier, M./ Charbonnier, J./ Wallace, R.J. Screening for *Fusocillus*: factors that affect the detection of ruminal bacteria which form stearic acid from linoleic acid. Reproduction Nutrition Development, 44(2004)Suppl. 1, S65.
- Cheng, K.J./ Costerton, J.W. Ultrastructure of *Butyrvibrio fibrisolvans*: a Gram-positive bacterium? Journal of Bacteriology, 129(1977)3, 1506–1512.
- Čepeljnik, T./ Zorec, M./ Kostanjšek, R./ Nekrep, F.V./ Marinšek-Logar, R. Is *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5^T suitable as a probiotic? An *in vitro* study. Folia Microbiologica, 48(2003)3, 339–345.
- Ewaschuk, J.B./ Walker, J.W./ Diaz, H./ Madsen, K.L. Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs *in vitro* and *in vivo* in mice. Journal of Nutrition, 136(2006), 1483–1487.
- Fukuda, S./ Suzuki, Y./ Murai, M./ Asanuma N./ Hino, T. Augmentation of vaccenate production and suppression of vaccenate biohydrogenation in cultures of mixed ruminal microbes. Journal of Dairy Science 89(2006a), 1043–1051.
- Fukuda, S./ Suzuki, Y./ Murai, M./ Asanuma, N./ Hino, T. Isolation of a novel strain of *Butyrvibrio fibrisolvans* that isomerizes linoleic acid to conjugated linoleic acid without hydrogenation, and its utilization as a probiotic for animals. Journal of Applied Microbiology, 100(2006b), 787–794.
- Griinari, J.M./ Corl, B.A./ Lacy, S.H./ Chouinard, P.Y./ Nurmela, K.V.V./ Bauman, D.E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 -desaturase. Journal of Nutrition, 130(2000), 2285–2291.
- Harfoot, C.G./ Hazlewood, G.P. Lipid metabolism in the rumen. V: The rumen microbial ecosystem (Eds.: Hobson, P.N./ Stewart, C.S.). London, Thomas Science, 1997, 382–426.
- Hobson P.N. Rumen bacteria. V: Methods in microbiology. Vol 3B. (Eds.: Norris J.R./ Ribbons, D.W.). New York, Academic Press, 1969, 133–149.
- Lipgene, The Rowett Research Institute. 2004. Dublin, Trinity College Dublin (24. maj 2004)
<http://www.lipgene.tcd.ie/consortium/rri.php> (14. avg. 2006).
- Kemp, P./ Lander, D.J. Hydrogenation *in vivo* of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. Journal of General Microbiology, 130(1984), 527–533.
- Kim, Y.J./ Liu, R.H./ Bond, D.R./ Russell, J.B. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrvibrio fibrisolvans*. Applied and Environmental Microbiology, 66(2000), 5226–5230.
- Kim, Y.J. Partial inhibition of biohydrogenation of linoleic acid can increase the conjugated linoleic acid production of *Butyrvibrio fibrisolvans* A38. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(2003), 4258–4262.
- Kepler, C.R./ Hiron, K.P./ McNeill, J.J./ Tove, S.B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrvibrio fibrisolvans*. The Journal of Biological Chemistry, 241(1966)6, 1350–1354.
- Kepler, C.R./ Tove, S.B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. III. Purification and properties of a linoleate Δ^{12} -*cis*, Δ^{11} -*trans*-isomerase from *Butyrvibrio fibrisolvans*. The Journal of Biological Chemistry, 242(1967)24, 5686–5692.

- Maia, M./ Ribeiro, J.M.C.R./ Wallace, R.J. Conjugated linoleic acids are formed in a detoxification mechanism which protects *Butyrvibrio fibrisolvens* from the effects of polyunsaturated fatty acids. *Reproduction Nutrition Development*, 44(2004)Suppl. 1, S59.
- McGuire, M.A./ McGuire, M.K. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. V: Proceedings of the American Society of Animal Science. Indianapolis, 2000, 8 str.
<http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0938.pdf> (15. avg. 2006).
- McKain, N./ Chaudhary, L.C./ Walker, N.D./ Pizette, F./ Koppova, I./ McEwan, N.R./ Kopečný, J./ Vercoe, P.E./ Wallace, J. Relation between phylogenetic position and fatty acid metabolism of different *Butyrvibrio* isolates from the rumen. *Reproduction Nutrition Development*, 44(2004)Suppl. 1, S64.
- Piperova, L.S./ Sampugna, J./ Teter, B.B./ Kalscheur, K.F./ Yurawecz, M.P./ Ku, Y./ Morehouse, K.M./ Erdman, R.A. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *Journal of Nutrition*, 132(2002), 1235–1241.
- Ryhänen, E.-L./ Tallavaara, K./ Griinari, J.M./ Jaakkola, S./ Mantere-Alhonen, S./ Shingfield, K.J. Production of conjugated linoleic acid enriched milk and dairy products from cows receiving grass silage supplement with a cereal-based concentrate containing rapeseed oil. *International Dairy Journal*, 15(2005), 207–217.
- Wahle, K.W.J./ Heys, S.D./ Rotondo, D. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Progress in Lipid Research*, 43(2004), 553–587.
- Wasowska, I./ Maia, M.R.G./ Niedzwiedzka, K.M./ Czauderna, M./ Ribeiro, J.M.C.R./ Devillard, E./ Shingfield, K.J./ Wallace, R.J. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. *British Journal of Nutrition*, 95(2006), 1199–1211.

KAPPA CASEIN GEN (CSN3) IN HORSE: GENETIC VARIABILITY IN EXON 1 AND 4

Sebastijan HOBOR^{a)}, Tanja KUNEJ^{b)}, Tina LENASI^{c)} and Peter DOVČ^{d)}

^{a)} Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Zootechnical Dept., Groblje3, SI-1230, Slovenia, email: shobor@bfro.uni-lj.si.

^{b)} Same address as ^{a)}, Ph.D.

^{c)} Departments of Medicine, Microbiology and Immunology, Rosalind Russell Medical Research Center, University of California at San Francisco, 533 Parnassus Avenue, San Francisco, CA 94143-0703, USA, Ph.D.

^{d)} Same address ^{a)}, Prof., Ph.D.

Received July 27, 2006, accepted December 03, 2006.

Delo je prispelo 27. julija 2006, sprejeto 03. decembra 2006.

ABSTRACT

Kappa casein (κ -CN) is milk protein that determines the size and specific function of the casein micelles, and its cleavage by chymosine is responsible for milk coagulation. Any variation in gene promoter or coding sequence may change the expression of the gene or amino acid sequence, effecting functional properties of the protein. The mature κ -CN is encoded by part of the exon 3 and the entire exon 4. Since exon 3 has 33 bp and exon 4 is 497 bp long, the major part of the protein is encoded by exon 4. In this study we identified two SNPs in exon 1 and two in exon 4 of the horse kappa casein gene (*CSN3*) and genotyped them in three horse breeds. The nucleotide sequence of the first exon was included in this study due to its possible role in the regulation of the *CSN3* expression. Because these polymorphisms were analysed for the first time, we used a reference method (RFLP) or at least two other complementing methods (Bi-PASA/PIRA and ASA-PCR/PIRA), for molecular genetic analysis of above mentioned SNPs. The highest variation in genotype frequencies was present in Slovenian cold blood breed. SNPs in exon 4 cause amino acid (AA) change in the mature product, and may very well render chemical/functional properties of the protein. Analysis of the consequences caused by changes in AA sequence, by online available program tools, confirmed our hypothesis.

Key words: horses / molecular genetics / kappa casein / *CSN3* / nucleotides / polymorphism / genetic variation / amino acids / sequence

KAPA KAZEINSKI GEN (CSN3) PRI KONJU: GENETSKA VARIABILNOST V EKSONU 1 IN 4

IZVLEČEK

Kapa kazein (κ -CN) je mlečni protein, ki določa velikost in specifično funkcijo kazeinskih micel, njegova razgradnja s kimozinom pa je odgovorna za koagulacijo mleka. Sprememba v promotorju ali kodirajočem področju gena lahko vpliva na njegovo izražanje, oziroma spremeni aminokislinsko zaporedje, s tem pa vpliva na funkcionalnost proteina. Zrel κ -CN protein je deloma kodiran z eksonom 3 in s celotnim eksonom 4. Zaporedje eksona 1 smo vključili v raziskavo, ker je možno, da ima regulatorno vlogo. Ker je ekson 3 dolg 33 baznih parov, ekson 4 pa ima 497 baznih parov, je pretežni del proteina kodiran z eksonom 4. V tej študiji smo izvedli genetsko analizo dveh nukleotidnih zamenjav v eksonu 1 in dveh v eksonu 4 v genu za kapa kazein (*CSN3*) pri konju in jih genotipizirali pri treh pasmah. Ker ti polimorfizmi še nikoli niso bili analizirani, smo za genetsko molekularno analizo omenjenih polimorfizmov, uporabili referenčno metodo (RFLP) ali vsaj dve drugi dopolnjujoči metodi (Bi-PASA/PIRA in ASA-

PCR/PIRA). Največja raznolikost genotipov je bila prisotna pri Slovenski hladnokrvni pasmi. Nukleotidni zamenjavi v eksonu 4 povzročita zamenjavo aminokislin v končnem produktu, kar pa lahko spremeni kemične/fukcionalne lastnosti proteina. Analiza posledic sprememb aminokislinske sekvence, s programi na internetu, je potrdila našo hipotezo.

Ključne besede: konji / molekularna genetika / kapa kazein / *CSN3* / nukleotidi / polimorfizem / genetska variabilnost / aminokislinske / zaporedje

INTRODUCTION

Kappa casein (κ -CN) is milk protein that determines the size and specific function of the milk micelles, and its cleavage by chymosin is responsible for milk coagulation (Yahyaoui *et al.*, 2003). κ -CN differs from other caseins in its solubility over a broad range of calcium ion concentrations and contains a hydrophilic C-terminal region (Yahyaoui *et al.*, 2003). Mature κ -CN protein has a labile peptide bond whose cleavage by chymosin produces a soluble hydrophilic glycopeptide (caseino-macropeptide) as well as insoluble peptide or para- κ -CN. The consequence of the secession of caseino-macropeptide from κ -CN in milk coagulation. The study of genetic polymorphisms of the caseins is of interest, since some variants could be more beneficial from the point of view of human nutrition or be associated with milk quality, composition and technological characteristics (Yahyaoui *et al.*, 2003). In case of cows milk, B allelic variant of the *CSN3* gene is preferable and animals with genotype BB produce milk with better cheese making ability and shorter rennet clotting time. In sheep two κ -CN variants were found (Ceriotti *et al.*, 2004), bovine κ -CN has 11 variants with A and B being the most common (Farrell *et al.*, 2004) and in goat 16 κ -CN variants were identified (Prinzenberg *et al.* 2005). Since equine milk is already used for human nutrition it may be important to identify the most suitable equine κ -CN variants for various milk products. Bovine milk products are used as milk substitutes for human babies. Since bovine milk proteins sometimes trigger allergic reactions, it is important to look for alternative sources for substitution of mothers milk.

The aim of this work was to search for SNPs (single nucleotide polymorphisms) in equine *CSN3* gene, exon 1 and exon 4 and to assess the consequent changes in amino acid sequence of the mature protein.

MATERIALS AND METHODS

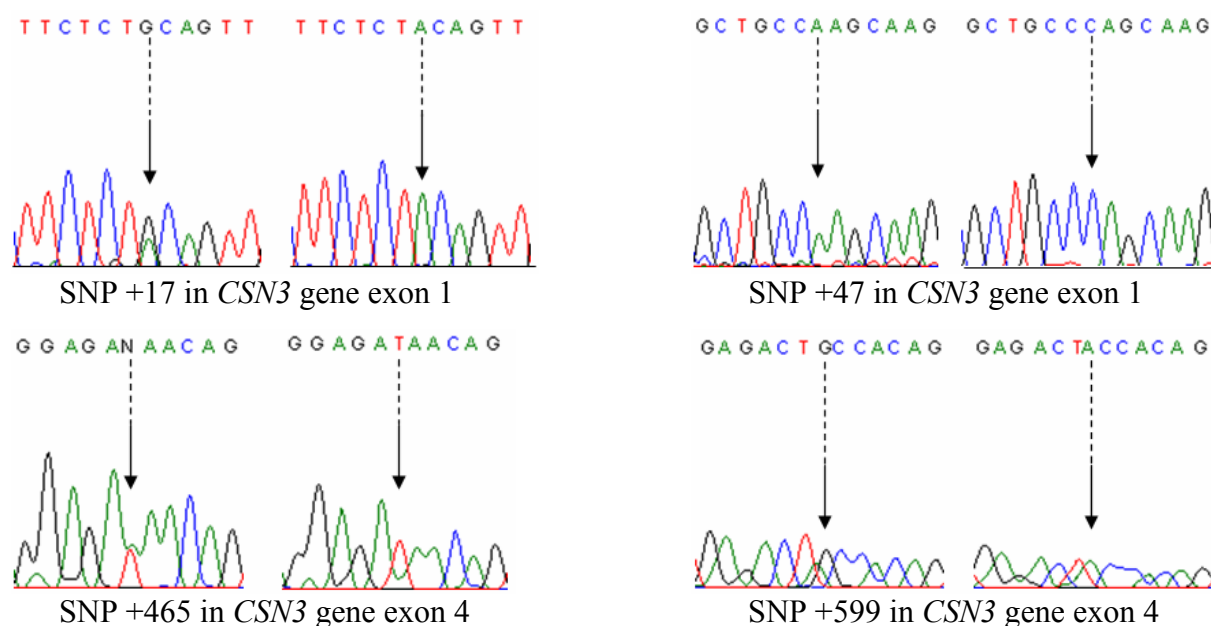
Detection of SNPs in exon 1 and exon 4

Blood samples of horses were received in our laboratory as part of the breeding control program for various horse breeds in Slovenia. DNA was extracted from blood samples using a standard procedure (Miller, 1988). We analysed 51 DNA samples, 17 from each breed (Slovenian coldblood, trotter and haflinger)

Based on the known sequence of *CSN3* gene (acc. No. AY579426) we designed primers HKPR2-F and KEX1-R (Table 1) for amplification of 237 bp region that harboured the end part of the promoter and exon 1. 20 μ l PCR reaction included 50 ng of genomic DNA, 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 150 μ M dNTPs, 0.25 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Vilnius, Lithuania) and 0.25 pmol of each primer. The conditions of the PCR reaction were: initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C (1 min), annealing at 53 °C (30 sec), extension at 72 °C (1 min) with final extension step at 72 °C for 7 min.

Primers for sequencing of exon 4 were designed on the basis of the known cDNA sequence (Lenasi *et al.*, 2003) (acc. No. AY040863). PCR conditions were the same as described

previously. PCR products were sequenced by MacroGen (Seoul, South Korea) (http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp). SNPs were detected by inspecting a DNA sequence manually (Figure 1).



Slika 1. Prikaz SNP-jev v eksonu 1 in 4 v *CSN3* genu.

Figure 1. Illustrations of SNPs in exons 1 and 4 of *CSN3* gene.

Genotyping of SNPs in exon 1

The same PCR product used for sequencing of exon 1, was also used for genotyping of detected polymorphisms. SNPs +17 (A/G) and +47 (C/A) were genotyped by restriction fragment length polymorphism (RFLP) method using *Pst*I (Fermentas; Vilnius, Lithuania) and *Bse*YI (NEB; Ipswich, MA, USA) restriction endonucleases, respectively. Restrictions were performed in a volumen of 10 μ l with 2 U of the encime and 1x restriction buffer at 37 $^{\circ}$ C for 3 hours. Restriction products were examined by electrophoresis on 3% agarose gels with 0.5x TBE buffer and stained with ethidium bromide.

Genotyping of SNPs in exon 4

SNP +465 (A/T) in exon 4 was genotyped by bidirectional PCR amplification of specific alleles (Bi-PASA) method (Liu *et al.*, 1997 ; Jiang and Gibson, 1999) using four primers: left primer KEX4-F, right primer KEX4-R, inner T nucleotide-specific primer K-bi-pasa-T and inner A nucleotide-specific primer K-bi-pasa-A (Table 1). Annealing temperature was 58 $^{\circ}$ C. PCR products were examined on 2% agarose gels.

For confirmation of genotypes obtained with Bi-PASA we used primer-introduced restriction analysis (PIRA) (Ke *et al.*, 2001). Primers for PIRA are in table 1, annealing temperature was 56.3 $^{\circ}$ C. Restriction of 142 bp PCR product was performed by 4 U of encime *Eco*RV (Fermentas, Vilnius, Lithuania) in 10 μ l reaction, at 37 $^{\circ}$ C, over night. Restriction fragments were visualised on 4% agarose gel, stained with ethidium bromide.

SNP +599 (A/G) in exon 4 was genotyped by allele specific amplification-PCR (ASA-PCR) method (Hézar *et al.*, 1997), specificity of the reaction was confirmed by

PIRA (Ke *et al.*, 2001). In ASA-PCR reaction we used one common forward primer KEX4PO-F and two 3' allele-specific reverse primers: A-specific primer KEX4ASA-As-R, G-specific primer KEX4ASA-Gs-R (Table 1). Annealing temperature was 65 °C. Because one primer was prolonged with 18 bp G+C-rich 5' tail, the SNP specific use of the primer in reaction could be visualised on 3% agarose gel.

PCR for PIRA was performed with primers: KEX4-INTR-F and Pira+599-R (Table 1). Annealing temperature was 54 °C. Depending on the presence of the SNP at the site of introduced mismatch, endonuclease recognised the specific sequence. Restriction of 227 bp fragment was performed using the enzyme *Hpy*CH4V (NEB; Ipswich, MA, USA). Restriction products were examined on 4% agarose gels.

Table 1. Conditions for PCR-based identification of SNPs
Preglednica 1. Pogoji za detekcijo SNP z verižno reakcijo s polimerazo

SNP	Method, enzyme	primer name	sequence	Ta, °C
+17 (A/G)	RFLP	HKPR2.F	5'-GATGACAACCTCTATTTTCGCCCT-3'	53
	<i>Pst</i> I	KEX1.R	5'-TTTGCAGGTCAGGTCTTGCT-3'	
+47 (C/A)	RFLP	HKPR2.F	5'-GATGACAACCTCTATTTTCGCCCT-3'	53
	<i>Bse</i> YI	KEX1.R	5'-TTTGCAGGTCAGGTCTTGCT-3'	
+465 (A/T)	Bi-PASA	KEX4.F	5'-GATGAAAGGTTTTTCGATCTG-3'	58
		KEX4.R	5'-TGGACCACAGGTGAAGTAACTG-3'	
		K-bi-pasa-T	5'-GGGCGGGGAGAACTTCAGGAGAT-3'	
	PIRA	K-bi-pasa-A	5'-GGGCGGGCTAGGGATGACTGTTT-3'	56.3
		kCN3cDNA-F	5'-TGTTCCAAATTCCTCAATGGC-3'	
	<i>Eco</i> RV	PIRAEX4+465-R	5'-AATAGTATTGATCTTAGGGATGACTGAT-3'	
+599 (A/G)	ASA-PCR	KEX4PO.F	5'-TCCTACCCCTGAACCAACAG-3'	65
		KEX4ASA-As.R	5'-GAAGTAACTGGGACTGTGGT-3'	
		KEX4ASA-Gs.R	5'-GGGCGGGGCGGGGCGGGGGAAGTAACTGGGA CTGTGGC-3'	
	PIRA	KEX4-INTR.F	5'-CTGTGGTACGTCATCCATGC-3'	54
		<i>Hpy</i> CH4V	Pira+599.R	

Amino acid exchange analysis

Consequent changes in amino acid (AA) sequence of the mature protein were analysed by three tools available online: ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>), NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) and ProtScale (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>).

RESULTS

SNPs in exon 1 and 4 of horse *CSN3* gene and genotype frequencies

Genetic polymorphisms in kappa casein gene (*CSN3*) in 60 animals from three horse breeds, Slovenian Coldblood, Trotter and Haflinger were investigated. We identified four SNPs: +17 (A/G) and +47 (A/C) in exon 1 and +465 (A/T) and +599 (A/G) in exon 4 (acc. No AY040863). Genotype frequencies of four SNPs in Slovenian Cold blood (n = 20), Trotter (n = 20) and Haflinger (n = 20) breeds are listed in Table 2. By analysis of possible haplotypes we concluded that the most frequent haplotypes were ACTA and AATA (Table 3).

Table 2. Genotype frequencies of the *CSN3* gene SNPs in three horse breeds
 Preglednica 2. Frekvence genotipov nukleotidnih zamenjav v genu *CSN3* pri treh pasmah konj

SNP	Genotypes	Exon 1						Exon 4					
		+17			+47			+465			+599		
		AA	AG	GG	CC	AC	AA	TT	AT	AA	GG	AG	AA
Coldblood	(n)	5	10	2	6	8	3	14	3	0	2	9	6
	(%)	0.29	0.58	0.12	0.35	0.47	0.17	0.82	0.17	0	0.12	0.53	0.35
Trotter	(n)	17	0	0	10	6	1	17	0	0	0	0	17
	(%)	1.00	0	0	0.58	0.35	0.06	1.00	0	0	0	0	1.00
Haflinger	(n)	17	0	0	5	10	2	17	0	0	1	0	16
	(%)	1.00	0	0	0.29	0.58	0.12	1.00	0	0	0.06	0	0.94

Table 3. Haplotype frequencies according to analysis of three horse breeds
 Preglednica 3. Frekvence haplotipov glede na analizo treh pasem konj

Position	Exon 1		Exon 4		Freq.
	+17	+47	+465	+599	
Haplotype	A	C	T	A	0.82
	A	A	T	A	0.56
	G	A	T	G	0.21
	G	A	A	G	0.06
	G	C	A	G	0.04
	A	C	A	G	0.04

Change in amino acid sequence of κ -CN

Nucleotide substitutions in exon 4 cause potentially significant corresponding AA change, that could effect structure in function of the mature protein. Substituted amino acids are different in charge and polarity. SNP +465 (A/T) causes substitution of Isoleucin (hydrophobic/nonpolar) for Lysine (hydrophilic/polar) and SNP +599 (A/G) causes substitution of Alanine (hydrophobic/nonpolar) for Threonine (uncharged/polar). ProtParam results for changes in molecular weight (Mw) and isoelectric point (pI) are in Table 4. We predicted loss of one highly potential phosphorylation site at position 153 With program NetPhos 2.0 (Figure 2) and with ProtScale, we predicted a change in polarity profile of the whole *CSN3* protein as a result of Isoleucin/Lysine exchange at position 108 (Figure 3).

Table 4. ProtParam predictions of theoretical Mw and pI of whole protein, for alternatively included amino acids

Preglednica 4. Napoved teoretične Mw in pI celotnega proteina, s programom ProtParam, za alternativno vključene aminokisliline

Position	108	153	Theoretical Mw	Theoretical pI
Amino acid	Isoleucine	Threonine	18844.7	8.03
	Isoleucine	Alanine	18814.6	8.03
	Lysine	Alanine	18829.6	8.55

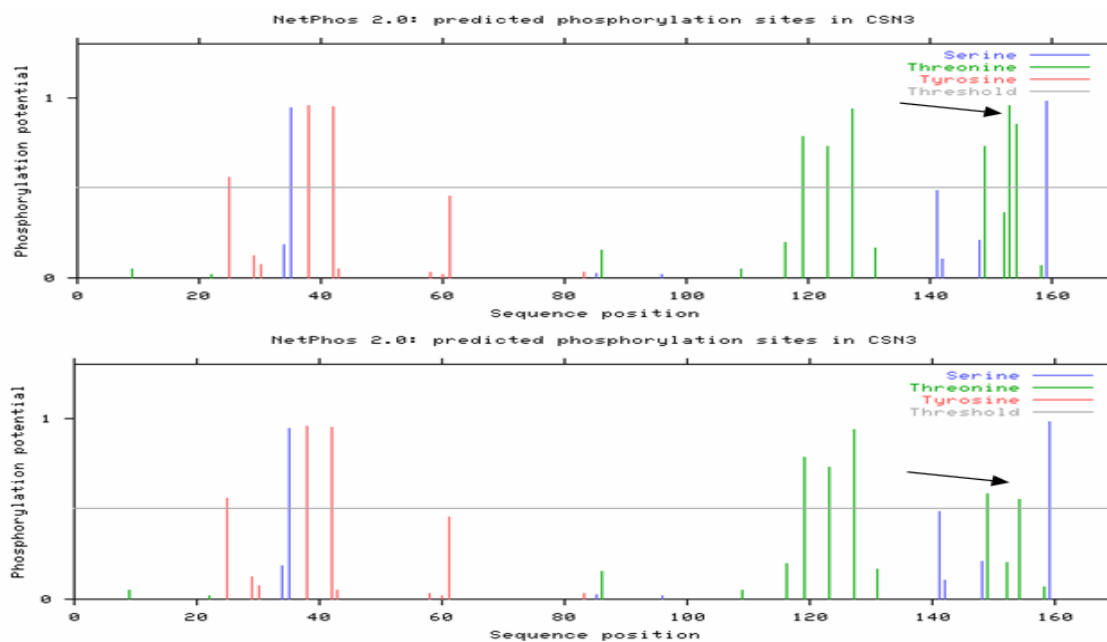


Figure 2. NetPhos 2.0 prediction of a consequent loss of one phosphorylation site at position 153.

Slika 2. Napoved izgube fosforilacijskega mesta na poziciji 153, s programom NetPhos 2.0.

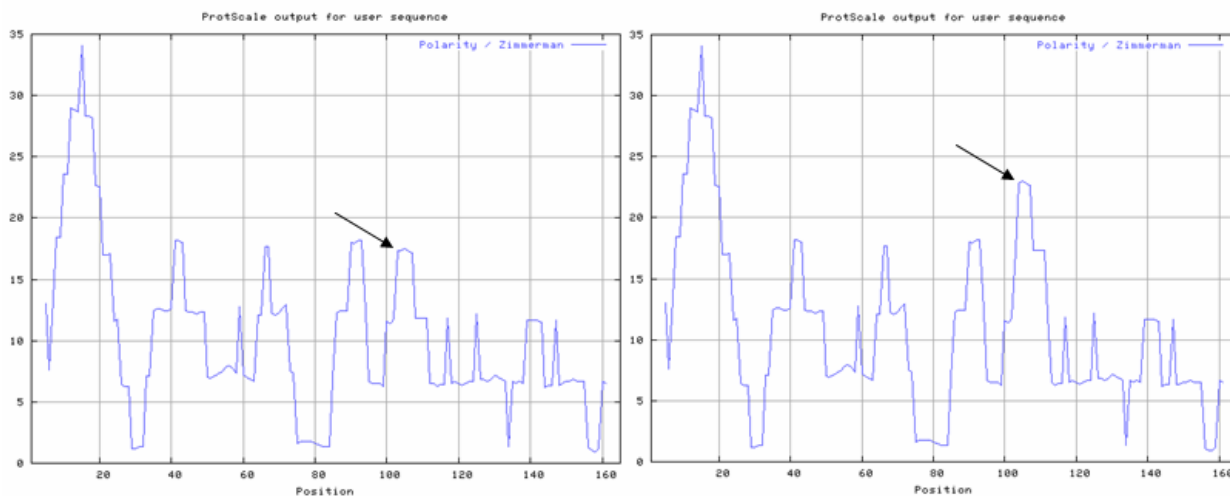


Figure 3. ProtScale prediction of different polarity profiles because of AA change at position 108.

Slika 3. Napoved drugačnega profila polarnosti zaradi zamenjave AA na poziciji 108, s programom ProtScale.

DISCUSSION

The study of four SNPs (+17, +47 in exon 1 and +465, +599 in exon 4) in three horse breeds revealed that the highest variation in genotype frequencies is present in Slovenian cold blood breed. In trotter and haflinger breed, variation was present only for SNP+47. Exon 1 is not part of the coding sequence, therefore SNPs in exon 1 do not cause AA substitutions. However, taking into account, that exon 1 is possibly involved in the regulation of expression of the gene,

functional testing of the detected SNPs could be promising orientation for the future research. Nucleotide substitutions in exon 4 cause potentially significant corresponding AA change, that could effect structure in function of the mature protein. Since substituted amino acids differ in charge and polarity, this might be an indication of two allelic variants of equine caseins and a starting point for the first nomenclature of these proteins in horse. To follow an established model for detecting new allelic variants of casein genes in cow (Farrell *et al.*, 2004), further research at the proteomic level is needed. Two protein analysis methods, isoelectric focusing (IEF) and two dimensional electroforesis (2D-EF) should provide the final answer.

REFERENCES

- Ceriotti, G./ Chessa, S./ Bolla, P./ Budelli, E./ Bianchi, L./ Duranti, E./ Caroli, A. Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *J Dairy Sci.*, 87(2004), 2606–2613.
- Farrell, H.M. Jr./ Jimenez-Flores, R./ Bleck, G.T./ Brown, E.M./ Butler, J.E./ Creamer, L.K./ Hicks, C.L./ Hollar, C.M./ Ng-Kwai-Hang, K.F./ Swaisgood, H.E. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk-Sixth Revision. *J Dairy Sci.*, 87(2004), 1641–1674.
- Hézarard, N./ Cornillet, P./ Droullé, C./ Gillot, L./ Potron, G./ Nguyen, P. Factor V Leiden: Detection in whole blood by ASA PCR using an additional mismatch in antepenultimate position. *Tromb Res.*, 88(1997), 59–66.
- Jiang, Z.H./ Gibson, J.P. Bi-PASA genotyping of a new polymorphism in the APOB gene shows no evidence for an association with fatness in pigs. *Anim Genet.*, 30(1999), 54–56.
- Ke, X./ Collins, A./ Ye, S. PIRA PCR designer for restriction analysis of single nucleotide polymorphisms. *Bioinformatics*, 17(2001), 838–839.
- Lenasi, T./ Rogelj, I./ Dovc, P. Characterization of equine cDNA sequences for α 1, β and κ -casein. *J Dairy Res.*, 70(2003), 29–36.
- Liu, Q./ Thorland, E.C./ Heit, J.A./ Sommer, S.S. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: A rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome Res.*, 7(1997), 389–398.
- Miller, S.A./ Dykes, D.D./ Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16(1988), 1215–1216.
- Prinzenberg, E.M./ Gutscher, K./ Chessa, S./ Caroli, A./ Erhardt, G. Caprine kappa-casein (CSN3) polymorphism: new developments in molecular knowledge. *J Dairy Sci.*, 88(2005), 1490–1498.
- Yahyaoui, M.H./ Angiolillo, A./ Pilla, F./ Sanchez, A./ Folch, J.M. Characterization and genotyping of the caprine κ -casein variants. *J Dairy Sci.*, 86(2003), 2715–2720.

ODZIVNOST PONUDBE V PRAŠIČEREJI

Janez JENKO ^{a)} in Emil ERJAVEC ^{b)}

^{a)} Poljanska cesta 41, SI-4224 Gorenja vas, Slovenija.

^{b)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, prof., dr.

Delo je prispelo 16. oktobra 2006, sprejeto 20. novembra 2006.

Received October 16, 2006, accepted November 20, 2006.

IZVLEČEK

Analizirali smo dejavnike ponudbe prašičev v Sloveniji v obdobju med januarjem 1995 in decembrom 2005. Razvili smo dva sklopa modelov, ki pojasnjujeta tržne količine prodane žive mase prašičev. Prvi sklop pojasnjuje odzivnost ponudbe prašičev z realnimi cenami, drugi sklop pa na podlagi doseženih pokritij. Uporabili smo standardno Cobb-Douglasovo obliko profitne funkcije. Modeli so razviti na podlagi metode navadnih najmanjših kvadratov in ustreznih testov. S testiranjem različnih oblik modelov in znotraj njih različnih odlogov eksogenih spremenljivk smo razvili dva modela. Modela pojasnjujeta najvišji delež variabilnosti količinskega odkupa žive mase prašičev v Sloveniji ob upoštevanju statistične značilnosti parametrov in celotnega modela. Rezultati so pokazali, da ima največji vpliv na ponudbo prašičev cena žive mase prašičev oziroma doseženo pokritje v prašičerejski proizvodnji in cena koruze, ki tudi v Sloveniji predstavlja glavni vložek v reji prašičev. Med drugimi statistično značilnimi vplivi omenimo še vpliv sezone in nekaterih nepredvidljivih vplivov, kot sta vpliv prisotnosti pojavnosti bolezni BSE ter vpliv krize na trgu s prašičjim mesom. Vrednosti koeficientov lastne cenovne elastičnosti so bile pričakovano nizke in so znašale okoli 0,3 ter tako potrdile tezo o neelastičnosti ponudbe prašičev. Dobljene vrednosti lahko razložimo z neprilagoditvami tržnim razmeram in prisotnostjo kvazi-fiksnih stroškov v prašičereji.

Ključne besede: prašiči / živa masa / ponudba / odzivnost ponudbe / Slovenija

SUPPLY ELASTICITY IN PIG PRODUCTION

ABSTRACT

The article analyses determinants influencing supply response in Slovenian pig production, in the period from January 1995 to December 2005. The two sets of models are developed. Both sets of models explain the quantity of pigs (live weight) sell on the market. The first set of models explains the quantity with own producer prices, whereas the second set of models is based on the gross margin. Standard Cobb-Douglas form of the profit function is used. The models are based on the ordinary least squares method and the corresponding tests. Based on the testing of various alternatives, including models, testing of statistical significance of individual lags of the exogenous variables, two models are developed. The model results reveal that the pig supply is influenced primarily by the own producer price, implying the achieved gross margins, and secondly by the price of maize, which also in Slovenia presents the main cost item in pig breeding. Other statistically significant determinants are the season and some unpredictable factors, such as the influence of the BSE disease and the crisis on the pork market. The elasticity of price values was low (about 0.3), as expected, thus confirming the thesis about the inelasticity of pig supply. Such results can be explained by a low level of producers adaptation to the market situation and by the presence of quasi-fixed expenses in pig production.

Key words: pigs / live weight / supply / supply elasticity / Slovenia

UVOD

V prašičereji zanzavamo v zadnjih letih precejšnje strukturne spremembe. Povečanju in koncentraciji rej sledijo spremembe v selekciji in prehrani živali. Ponudba klavnih prašičev se je zgostila okoli poljedelskih območij ali v bližini trga s krmnimi žiti in nadomestki. Povpraševanje po prašičih se v zadnjem obdobju ni bistveno spremenilo in stagnira (Volk, 2004).

Agrarno ekonomska teorija izhaja iz tega, da je ponudba posamezne kmetije odvisna predvsem od cene proizvoda, cene ostalih proizvodov, ki jih kmetija lahko proizvaja, proizvodnih stroškov, vrste (ravni) uporabljene tehnologije in ciljev kmeta (Erjavec in sod., 1999). Analize dejavnikov ponudbe so pomembne z vidika proizvodnih odločitev. Pomembne so odločitve o izbiri vložkov ob danih cenah na trgu ter vpliv dostopnost stalnih dejavnikov, ki se v kratkem času ne morejo spremeniti (Sadoulet in de Janvry, 1995).

Temeljni pristop pri analizi ponudbe žive mase prašičev predpostavlja odvisnost ponujene količine od razmerja med pričakovano ceno proizvoda in pričakovano ceno vložkov (Heien, 1975). Glavni vložek v prašičereji so krmna žita (Coase in Fowler, 1935; Heien, 1975; Ezekiel, 1938). Pomembno vlogo pri ponudbi žive mase prašičev imajo tudi nekateri nepričakovani vplivi na trg, npr. uvedba proizvodnih kvot za žita (Vere in sod., 2000), omejitve zaloga krmnih žit, trgovinski sporazumi, spremembe v tržni politiki (Zwart in Martin, 1982), vojna (Coase in Fowler, 1935), bolezni (USDA, 1997). Pomemben je vpliv sezone. Prašičji ali olimpijski cikel (dve leti cene prašičev padajo in zatem naslednji dve leti rastejo) pomembno vpliva na ponujeno količino žive mase prašičev na trgu (Coase in Fowler, 1935). Značilno je, da se ti sezonski in večletni ciklusi periodično ponavljajo.

Dixon in Martin (1982) ugotavljata, da se s povečano kapitalno intenzivnostjo mobilnost proizvodnje zmanjša, gledano v smislu odzivnosti na spremembe v lastnih cenah in sezonskih nihanjih. Zvišanje cen žit lahko pri kmetijah s kombinirano proizvodnjo žit in prašičev povzroči zvišanje obsega neposredne prodaje žit na trg in obenem zmanjšanje obsega prireje žive mase prašičev.

Raziskave odzivnosti ponudbe prašičev v Sloveniji zajemajo predvsem obdobje do leta 1995 (Turk, 1995; Erjavec in Turk, 1997; Turk in sod., 1999). Želeli smo preveriti, kaj se je na tem področju dogajalo po tem obdobju, in sicer z uporabo bolj konsistentnih časovnih serij podatkov. Temeljni cilj prispevka je torej analiza dejavnikov ponudbe žive mase prašičev v Sloveniji v obdobju med leti 1995 in 2005. Z identifikacijo in kvantitativnim ovrednotenjem dejavnikov, ki vplivajo na ponudbo žive mase prašičev, smo želeli prispevati k razpravi o gospodarskih vprašanjih v slovenski prašičereji ter obenem podpreti gradnjo različnih modelnih sektorskih orodij.

ANALIZA ODZIVNOSTI PONUDBE

Temeljni cilj sleherne ekonomske analize trga kmetijske ponudbe je po Turku (2001) nazorno prikazati učinke določenih procesov sprememb gospodarskega okolja na posamezne tržne dejavnike. Ocenjevanje učinkov raznovrstnih gospodarskih kazalcev na trgih kmetijske ponudbe se običajno odvija s pomočjo aplikacije bolj ali manj sofisticiranih ekonometričnih modelov.

Analiza odzivnosti ponudbe določa, kako se bodo proizvajalci odzvali na spremembe cen proizvoda in cen vplivov v tehnologiji in dostopnosti do določenih omejitvenih dejavnikov proizvodnje. Sadoulet in de Janvry (1995) poudarjata, da je taka analiza glavna pri političnih odločitvah v tem, da pomaga razumeti vplive alternativnih politik in zunanjih vplivov na proizvajalce. S spremembami, ki se kažejo v ponudbi nekega proizvoda in povpraševanju po dejavniki proizvodnje, je analiza odzivnosti ponudbe glavna sestavina modelov, ki skušajo pojasniti tržno ceno, plačo, zaposlenost, zunanjo trgovino in proračunska plačila.

Modeliranje kmetijskega trga po Turku (1998) zajema pester spekter uporabe najrazličnejših gospodarskih analiz ter pristopov na mikro ravni. Agrarni ekonomisti se za potrebe celovite ekonomske analize kmetijskih trgov odločajo za uporabo raznovrstnih ekonometričnih modelov. Sledijo jim različni simulacijski statični modeli, s pomočjo katerih se ne ocenjuje postavljenih proizvodno-ekonomskih razmerij, temveč so ocene parametrov pridobljene na podlagi prejšnjih ekonometričnih ali ekspertnih ocen. Kategorizacija izbranih modelov tržnega ravnovesja (parcialni in splošni model ravnotežja) je naslednji način ocenjevanja obravnavanih parametrov kmetijskega sistema in je v osnovi praviloma ekonometrične narave. Sodobna agrarno-ekonomska znanost razpolaga z najrazličnejšimi načini simuliranja gospodarskih dogodkov znotraj posameznih ali med seboj odvisnih kmetijskih trgov.

Vrednotenje obstoječih proizvodno-gospodarskih razmerij navadno poteka na podlagi vrednosti ekonomskih kazalcev pridobljenih z empiričnim modeliranjem (Turk, 1998). Pri tem je razpoložljivost kakovostnih podatkov temeljni pogoj za izdelavo ustreznih kvantitativnih analiz. Za potrebe učinkovite izvedbe ekonometričnih modelov ponudbe na trgu so zanimive predvsem statistične informacije o količinski porabi obravnavanih kmetijskih proizvodov, njihovih cenah ter uporabljeni tehnologiji pridelave in priraje.

DEJAVNIKI PONUDBE V PRAŠIČEREJI

Coase in Fowler (1935) ločita povečan obseg ponudbe klavnih prašičev v kratkem in dolgem obdobju. Kot pravita, so vse spremembe ponudbe, ki so krajše od dvanajstih mesecev, kratkoročne in so posledica povečanja povprečne klavne mase pitancev oziroma povečanega števila izločenih plemenskih svinj.

Glavni dejavnik ponudbe klavnih prašičev je pričakovano razmerje med stroški, katerih velik del predstavlja krma in prihodki. Časovni odziv ponudbe klavnih prašičev glede na spremembe v razmerju med cenami krme in žive mase prašičev pogojujejo biološki dejavniki (Vere in sod., 2000; Coase in Fowler, 1935).

Poleg pričakovanj o ceni krme, katere precejšen delež v prašičereji predstavlja kuruza, in pričakovanj o ceni žive mase prašičev, lahko na ponujeno količino žive mase prašičev vplivajo tudi drugi dejavniki. Coase in Fowler (1935) skupni vpliv pričakovanih cen žive mase prašičev in kuruze razširjata tako, da ponudbo prašičev pojasnjujeta s pričakovanim pokritjem pri vzreji prašičev za zakol, ki je lahko pozitivno ali negativno.

Že Harlow (1960) v modele za analizo vplivov na ceno žive mase prašičev vključuje vplive cen nadomestnih proizvodov. Martin in Zwart (1982) pa v model za pojasnjevanje ponujene količine žive mase prašičev vključujeta vpliv doseženega pokritja v konkurenčnih živinorejskih panogah. Znotraj živinorejskih panog se kot glavna tekmeča proizvodnji prašičev omenjata govedoreja (Martin in Zwart, 1982; Harlow, 1960) in perutninarstvo (Harlow, 1960; Heien, 1975). Z večjim doseženim pokritjem oziroma višjimi cenami končnih proizvodov pri konkurenčnih proizvodnjah, lahko pričakujemo manjšo količino proizvedene žive mase prašičev.

Martin in Zwart (1935) kot pomemben dejavnik ponudbe žive mase prašičev navajajta vpliv sezone. Tako se povpraševanje po klavnih prašičih spomladi zmanjša, prasiatve pa so načrtovane v času višjih letnih temperatur zaradi škodljivih vplivov neugodnih zimskih razmer, ki bi lahko povečale smrtnost pujskov v gnezdu.

Napredek v prašičereji naj bi po besedah nekaterih avtorjev (Vere in sod., 2000; Heien, 1975) pomembno prispeval k večji količini ponujene žive mase prašičev. Vere in sod. (2000) napredek merijo v obliki časovnega trenda. S časovnim trendom zajamejo vplive napredka v selekciji in veterinarski oskrbi.

Poleg zgoraj opisanih dejavnikov, za katere avtorji predpostavljajo vpliv na količino ponujene žive mase prašičev, so za analizirano obdobje značilni tudi nekateri nenapovedljivi vplivi. To sta

predvsem dva, učinek prisotnosti bolezni BSE (USDA, 1997) pri govedu in učinek prisotnosti krize na trgu s prašičjim mesom (Agra CEAS consulting, 2003)

MATERIAL IN METODE

Podatkovni viri

Osnovni podatki izhajajo iz več različnih virov. Na Kmetijskem inštitutu Slovenije smo pridobili podatke o nominalnih odkupnih (proizvajalčevih) cenah, nominalnih vrednostih materialnih stroškov in količinskem odkupu v kilogramih ali litrih. Podatki se nanašajo na pet kmetijskih proizvodov, in sicer živo maso prašičev, živo maso mladega pitanega goveda, živo maso piščancev, mleko in koruzo. Podatke o krmnih dnevih smo pridobili na Biotehniški fakulteti (Kovač, 2006). Predstavljeni so v obliki števila krmnih dni na živorojenega in odstavljenega pujska. Podatke o indeksu cen življenjskih potrebščin pridobljenih na portalu ISPO (Portal ISPO, 2006).

Osnovne podatke o nominalnih cenah posameznih proizvodov smo s pomočjo podatkov o indeksu cen življenjskih potrebščin spremenili v realne cene po naslednjem postopku:

$$realV_t = \frac{nomV_t * 100}{I_{t/1995M1}} \quad [1]$$

pri čemer $realV_t$ predstavlja realno ceno izbranega kmetijskega proizvoda za izbran mesec t , preračunano na bazni mesec januar 1995 (1995M1), $nomV_t$ nominalno ceno določenega kmetijskega proizvoda za izbran mesec t in $I_{t/1995M1}$ kumulativni indeks cen življenjskih potrebščin glede na bazni mesec januar 1995 (1995M1).

Realne vrednosti cen za posamezni mesec smo na podlagi aritmetičnih sredin preoblikovali v četrtletne realne cene. Na podlagi realnih podatkov o proizvajalčevi ceni, neposrednih plačilih in materialnih stroških smo izračunali pokritje na kilogram žive mase prašičev, mladega pitanega goveda, piščancev in kilogram mleka. Pokritje izračunamo tako, da od vrednosti proizvodnje (v tem primeru vsote proizvajalčeve cene določenega proizvoda in neposrednih plačil za ta proizvod) odštejemo vrednost vmesne potrošnje oziroma potrošenih vloženi sredstev (v tem primeru materialnih stroškov neposredno vezanih na proizvodnjo določenega proizvoda; Volk 2004). To spremembo se izrazimo v SIT/kg mase.

Mesečne količinske podatke o odkupu žive mase prašičev smo sešteli v obliko četrtletnega odkupa žive mase prašičev. Mesečne podatke o številu krmnih dni na živorojenega oziroma odstavljenega pujska smo agregirali po četrtletjih in nato izračunali srednjo vrednost posameznega četrtletja.

Po končani obdelavi smo dobili podatke za 44 časovnih enot oziroma četrtletij med januarjem 1995 in decembrom 2005, ki jih bomo uporabili v modelih ponudbe prašičjega mesa.

Model

Podatki narekujejo izbiro ekonometričnega modeliranja trga klavnih prašičev, kjer so koeficienti elastičnosti ponudbe določeni s pomočjo modificiranih profitnih funkcij ali stroškovnih funkcij.

Odločili smo se za Cobb-Douglasovo obliko profitne funkcije, ki sta jo uporabila tudi Erjavec in Turk (1998) pri proučevanju koeficientov elastičnosti ponudbe v slovenskem kmetijstvu. Ena od pozitivnih lastnosti Cobb-Douglasove profitne funkcije je enostavnost izračuna koeficientov parcialne konstantne elastičnosti odvisne spremenljivke na ustrezno pojasnjevalno spremenljivko

(povprečna konstantna odstotna sprememba odvisne spremenljivke zaradi odstotne spremembe posamezne pojasnjevalne spremenljivke), ocene parcialnih regresijskih koeficientov za diskretno porazdeljene (v našem primeru neprave) spremenljivke pa parcialne konstante semielastičnosti. Torej, če imamo k spremenljivk v logaritemsko linearnem modelu:

$$\ln Y_i = \beta_0 + \beta_1 \ln X_{1i} + \beta_2 \ln X_{2i} + \dots + \beta_k \ln X_{ki} + u_i \quad [2]$$

Vsak od (parcialnih) regresijskih koeficientov od β_1 do β_k pomeni (parcialno) elastičnost Y glede na spremenljivke med X_1 do X_k (Gujarati, 2003). Druga pomembna prednost take oblike funkcije je zmanjšanje variabilnosti podatkov (Erjavec in Turk, 1998).

Pri razlagi ocen parcialnih regresijskih koeficientov za neprave spremenljivke raje uporabljamo razlago parcialne konstantne semielastičnosti, ki sta jo predlagala Halvorsen in Palmquist (1980) in jo izračunamo takole:

$$(e^{\beta_k} - 1) * 100 = i \quad [3]$$

pri čemer je $e = 2,71828183$, β_k koeficient ocene parcialnega regresijskega koeficienta in i koeficient ocene parcialne semielastičnosti.

Oba sklopa modelov smo razvijali po induktivnem pristopu, ki ga v svojih raziskavah uporabljajo tudi Davis in sod. (2001). Osnovni model smo do končnega razvili v več korakih, v katerih smo v modela vključili po eno eksogeno spremenljivko, katere značilnost smo nato testirali v obliki različnih odlogov. V primeru, da se je vpliv spremenljivke kot statistično značilen izkazal v več odlogih, smo za nadaljnji razvoj uporabili odlog z večjo statistično značilnostjo. Če nobeden nobeden od uporabljenih odlogov ni izkazal statistične značilnosti, tega vpliva nismo zadržali v modelu. Na koncu smo dobili modela, s katerima smo ob upoštevanju statistične ustreznosti pojasnili največji del variabilnosti količinskega odkupa žive mase prašičev izmed uporabljenih modelov posameznega sklopa.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Analiza trendov uporabljenih spremenljivk

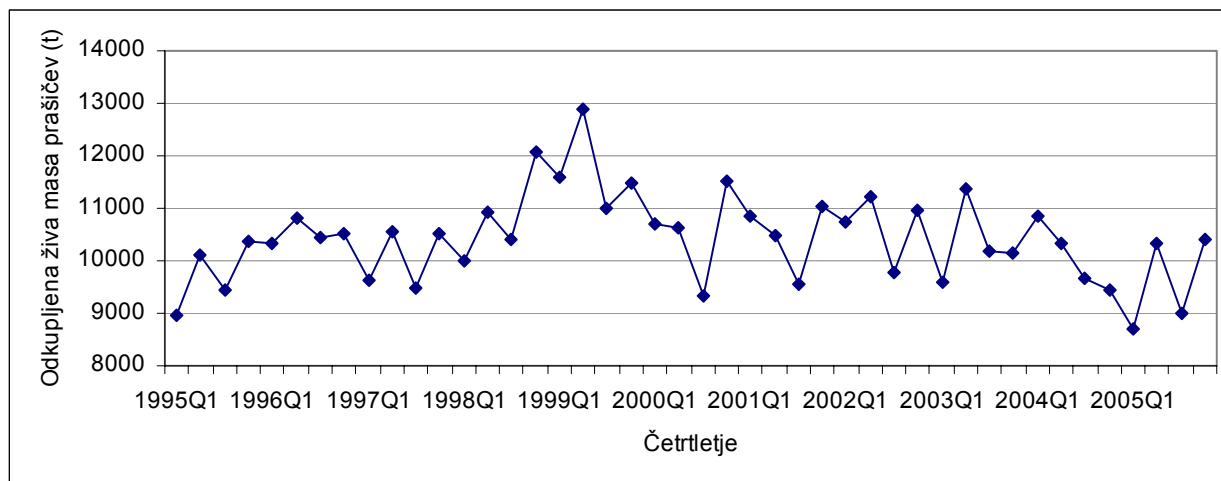
Podatke, uporabljene v modelih ponudbe žive mase prašičev, smo analizirali s pomočjo grafičnega prikaza.

Za opazovano obdobje pri odkupu žive mase prašičev ni opaziti trenda rasti ali padanja odkupa. Na sliki 1 lahko opazimo nekatera zelo izrazita nihanja v količinskem odkupu žive mase prašičev. Nihanja lahko pojasnimo z nekaterimi nepredvidenimi vplivi na trg prašičev ali na trg konkurenčnih proizvodov, kot je na primer trg govejega mesa.

Za opazovano obdobje je značilen trend padanja realnih odkupnih cen žive mase živali vseh treh analiziranih vrst. Posebno je padec realnih odkupnih cen žive mase izrazit pri pitanem govedu in prašičih. Poleg trenda padanja realnih cen žive mase prašičev so predvsem za prašičerejo značilna izrazita nihanja v cenah žive mase prašičev. Iz slike 2 lahko vidimo, da so cene kravjega mleka v opazovanem obdobju realno rasle. Realne cene koruze, ki predstavljajo glavni vložek v prašičereji, so ostale na enaki ravni in niso sledile trendu padanja realnih cen žive mase prašičev.

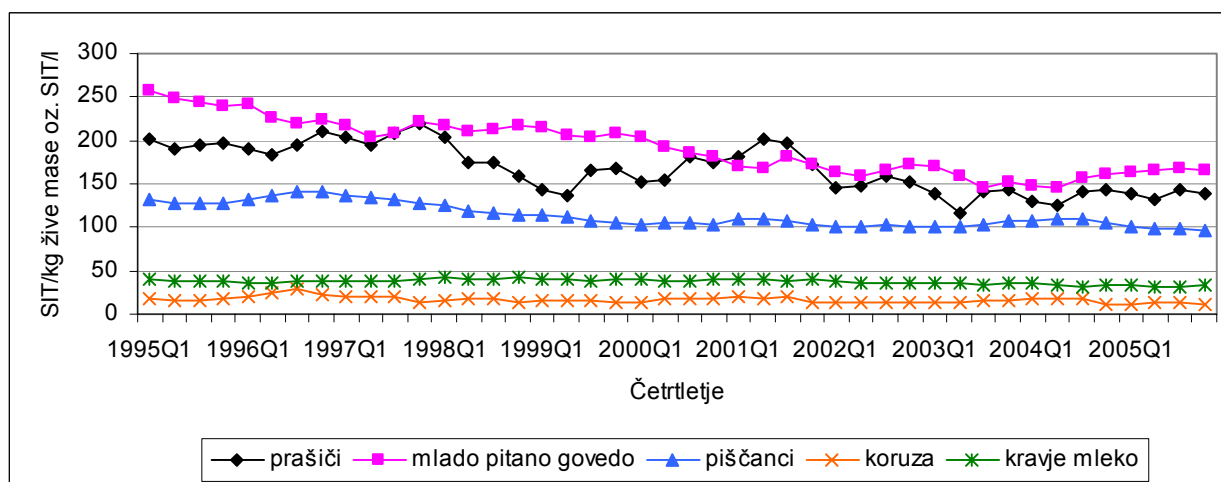
Za trg s prašiči je značilno, da se je skozi celotno opazovano obdobje realno pokritje na kilogram žive mase zmanjševalo. V obdobju med letoma 2003 in 2004 opazimo, da je realno pokritje na kilogram žive mase prašičev dosegalo izjemno nizke vrednosti, v nekaterih četrletjih teh dveh let je pokritje celo negativno. Pri proizvodnji kravjega mleka in klavnih piščancev se

kaže precej večja stabilnost pri doseženem pokritju skozi opazovano obdobje. Medtem ko je za realno pokritje pri proizvodnji kravjega mleka značilen rahel trend rasti, pa se pokritje pri proizvodnji klavnih piščancev skorajda ni spremenilo. Posebno velike spremembe so se pokazale pri doseženem pokritju pri proizvodnji klavnega mladega pitnega goveda. Tu je skozi celotno opazovano obdobje opaziti rast doseženega realnega pokritja, ki je še posebej izrazit po letu 2000.



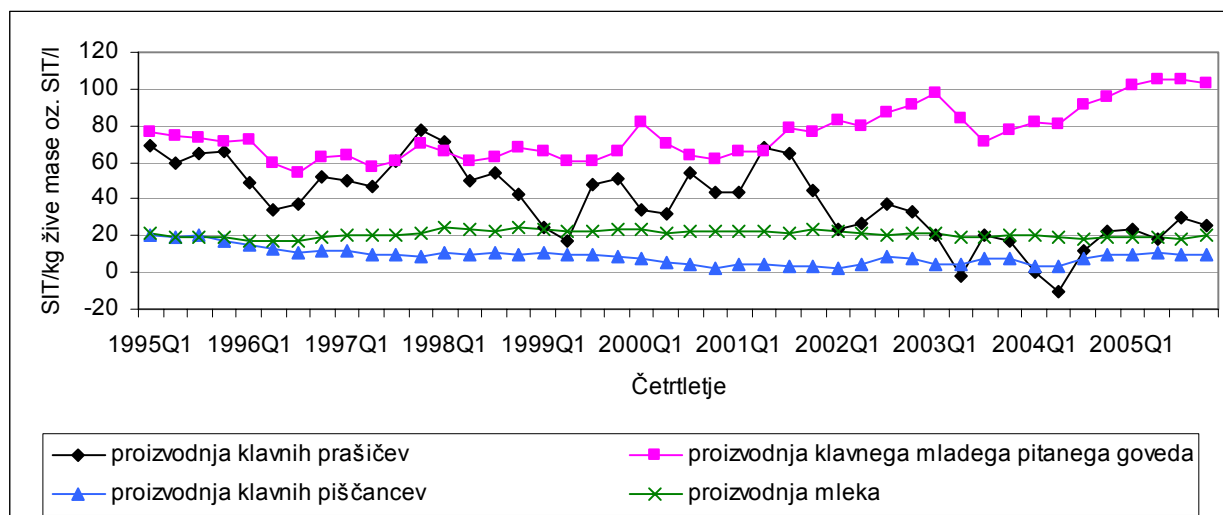
Slika 1. Količinski odkup žive mase prašičev po četrletjih (Q) v Sloveniji v obdobju 1995–2005 (Volk, 2006)

Figure 1. Quantity of purchased live weight pigs by quarters (Q) in Slovenia in the period 1995–2005 (Volk, 2006)



Slika 2. Gibanje realnih cen žive mase prašičev, žive mase mladega pitanega goveda, žive mase piščancev, kravjega mleka in kuruza, po četrletjih (Q) v Sloveniji v obdobju 1995–2005 (Volk, 2006).

Figure 2. Real price of live weight pigs, live weight young fatten cattle, live weight chicken, cow milk and corn by quarters (Q) in Slovenia in the period 1995–2005 (Volk, 2006).



Slika 3. Doseženo realno pokritje pri različnih živinorejskih panogah po četrletjih (Q) v Sloveniji v obdobju 1995–2005 (Volk, 2006).

Figure 3. Achieved gross margin of different type of cattle breeding by quarters (Q) in Slovenia in the period 1995–2005 (Volk, 2006).

Končna aplicirana modela

Po testiranju različnih vplivov in njihovih odlogov smo iz vsakega od sklopov dobili po en končni model. S tema modeloma smo ob upoštevanju statistične značilnosti pojasnili največji delež količinskega odkupa žive mase prašičev. V prvem sklopu, kjer smo količinski odkup žive mase prašičev ocenjevali na podlagi realnih cen končnih proizvodov v živinoreji, se je kot najboljši izkazal model:

$$kol_pr = pr_{t-5} + k_{t-4} + S_2 + BSE + K \quad [4]$$

kjer kol_pr predstavlja količino odkupljene žive mase prašičev, pr_{t-5} realno ceno žive mase prašičev odloženo za pet četrletji, k_{t-4} realno ceno koruze, odloženo za štiri četrletja, S_2 drugo četrletje, BSE prisotnost učinkov bolezni BSE in K prisotnost krize na trgu s prašičjim mesom.

V drugem sklopu, kjer smo količinski odkup žive mase prašičev ocenjevali na osnovi doseženega realnega pokritja pri različnih živinorejskih panogah, pa se je kot najprimernejši izkazal model:

$$kol_pr = pok_pr_{t-4} + k_{t-4} + S_2 + S_3 + K \quad [5]$$

pri čemer je kol_pr količina odkupljene žive mase prašičev, pok_pr_{t-4} doseženo realno pokritje v prašičerejski proizvodnji, odloženo za štiri četrletja, k_{t-4} realna cena koruze, odložena za štiri četrletja, S_2 drugo četrletje, S_3 tretje četrletje in K prisotnost krize na trgu s prašičjim mesom.

Vrednosti lastne cenovne elastičnosti znašajo med 0,13 in 0,36, torej so neelastične. Ob povečanju cene žive mase prašičev izpred petih četrletji se ponujena količina žive mase prašičev poveča od 0,13 % do 0,36 %. Vrednosti izpeljane lastne cenovne elastičnosti so še bistveno nižje. Ob povečanju doseženega realnega pokritja za 1 % se količina ponujene žive mase prašičev poveča le med 0,01 % in 0,05 %. Navzkrižna cenovna elastičnost glede na ceno koruze znaša v modelu 4 med $-0,17$ in $-0,23$ in v modelu 5 med $-0,02$ in $-0,07$. Ob povečanju realne cene koruze izpred štirih četrletij se torej količina ponujene žive mase prašičev zmanjša.

Izkazalo se je, da se količinski odkup statistično značilno razlikuje le v drugem četrtletju modela 4 in drugem in tretjem četrtletju modela 5. Razloge v manjšem vplivu sezone lahko iščemo v povečani kapitalski intenzivnosti in specializiranosti prašičerejske proizvodnje. Za bolj enostavno tolmačenje smo za neprave spremenljivke uporabili razlago parcialne konstantne semielastičnosti, ki sta jo predlagala Halvorsen in Palmquist (1980). Izkazalo se je, da se je v času prisotnosti učinkov krize na trgu s prašičjim mesom ponudba prašičev, namenjenih klanju, povečala kar za 10 %. Razloge za povečanje ponudbe v nasprotju s pričakovanim upadom lahko iščemo v odloženih učinkih krize na trgu s prašičjim mesom. Učinek prisotnosti bolezni BSE pri govedu pa je povečal ponujeno količino klavnih prašičev za 1 %.

Preglednica 1. Vrednost koeficientov parcialnih konstantnih semielastičnosti
Table 1. Value of the partial constant semielastic coefficients

Model	Vpliv / Influence	Odlog vpliva (št. četrtletji) Lag of influence (number of quarters)	Ocena vrednosti koeficienta parcialne elastičnosti Estimation of the semielasticity coefficient value	Delež pojasnjene variabilnosti Share of explained variability
4	Realna cena žive mase prašičev Real price of live weight pigs	5	med 0,13 in 0,36	0,7611
	Realna cena koruze Real price of maize	4	med -0,17 in -0,23	
	Drugo četrtletje 2 nd quarter		0,08	
	Kriza na trgu s prašičjim mesom Crisis on the pork market		0,10	
	Vpliv bolezni BSE Influence of BSE diseases		0,05	
5	Doseženo realno pokritje na kilogram žive mase prašičev Achieved gross margin per kilogramme live weight pigs	4	med 0,01 in 0,05	0,7742
	Realna cena koruze Real price of maize	4	med -0,02 in -0,07	
	Drugo četrtletje 2 nd quarter		-0,06	
	Tretje četrtletje 3 rd quarter		0,06	
	Kriza na trgu s prašičjim mesom Crisis on the pork market		0,10	

Predhodne raziskave, opravljene za potrebe analize elastičnosti ponudbe žive mase prašičev, potrjujejo cenovno neelastičnost ponudbe žive mase prašičev. Zanimivo primerjavo lahko naredimo z vrednostmi lastne cenovne elastičnosti, ki sta jih v svojih raziskavah ponudbe prašičev med leti 1966 in 1995 dobila Erjavec in Turk (1998). Lastno cenovno elastičnost ponudbe prašičev sta ocenila na 0,45. Razloge za zmanjšanje cenovne elastičnosti ponudbe prašičev lahko iščemo v premiku h kapitalsko intenzivnejši proizvodnji, ki po besedah Dixona in Martina (1982) zmanjša nihanja v količini proizvedene žive mase prašičev. Erjavec in Turk

(1998) opozarjata, da so nizke cenovne elastičnosti lahko posledica prisotnosti kvazi fiksnih stroškov. Drugi razlog pa gre iskati v kakovosti pridobljenih podatkov in drugačni metodi dela.

SKLEPI

Rezultati, pridobljeni za analizo ponudbe žive mase prašičev, potrjujejo pričakovano lastno cenovno neelastičnost ponudbe prašičev. Vrednosti koeficientov lastne cenovne elastičnosti so okoli 0,3. Še manjša je odzivnost glede na spremembe v ceni vložkov, pri ceni koruze znaša med $-0,1$ in $-0,2$.

Za analizirano obdobje je značilna izrazita nestabilnost na trgu s klavnimi prašiči v Sloveniji. Pomemben je vpliv učinka pojava bolezni BSE pri govedu in vpliv prisotnosti krize na trgu s prašičjim mesom. Kriza na trgu s prašičjim mesom je zaradi odloženih učinkov povzročila 10 % višjo ponudbo žive mase prašičev.

Vpliv sezone se manjša. Razloge lahko iščemo v povečani kapitalski intenzivnosti in specializaciji proizvodnje v prašičereji.

SUMMARY

The results show that our thesis, about inelasticity of price values of pig (live weight) is right. The elasticity of price values is low, about 0.3. The elasticity of input prices is even lower. The elasticity of price values for maize is between -0.1 and -0.2 .

For the analysed period a typical instability on the pigmeat market in Slovenia is expressed. The influence of cattle BSE disease on the crisis on pigmeat market is important. The pigmeat market crisis, increased the live weight pig supply for about 10 %, because of the lagged influence.

The influence of season is decreasing. The reasons for this can be sought after the increase of capital intensity and specialization of pig production.

VIRI

- Agra CEAS consulting. Economic evaluation of the pig industry restructuring scheme. Final report for DEFRA. Univ. of London, Department of agricultural sciences imperial college, 2003, 166 str.
- Coase, R.H./ Fowler, R.F. Bacon production and the pig-cycle in Great Britain. *Economica*, 2(1935)6, 142–167.
- Davis, G.C./ Capps, O./ Bessler, D.A./ Leigh, J.H./ Nichols, J.P./ Goddard, E. An econometric evaluation of the pork checkoff program. College station, Texas A&M university, Department of agricultural economics, 2001, 206 str.
- Dixon, B.L./ Martin, L.J. Forecasting U.S. pork production using a random coefficient model. *American Journal of Agricultural Economics*, 64(1982), 530–38.
- Erjavec, E./ Turk, J. Supply elasticities in Slovene agriculture. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj., Kmet. (Zooteh.)*, 70(1997), 85–98.
- Ezekiel, M. The cobweb theorem. *Quarterly Journal of Economics*, 52(1938)2, 255–280.
- Gujarati, D.N. Basic econometrics. 4th international ed. Boston, McGraw Hill, 2003, 1002 str.
- Halvorsen, R./ Palmquist, R. The interpretation of dummy variables in semilogarithmic equations. *American Economic Review*, 70(1980)3, 474–475.
- Harlow, A.A. The Hog Cycle and the Cobweb Theorem. *Journal of Farm Economics*, 42(1960)4, 842–854.
- Heien, D. An econometric model of the U.S. pork economy. *Review of Economics & Statistics*, 57(1975)3, 370–375.
- Kovač, M. »Število krmnih dni na živorojenega in odstavljenega pujska v Sloveniji za obdobje med letom 1995 in 2005« Ljubljana, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko (osebni vir, 2006).
- Martin, L./ Zwart, A.C. A spatial and temporal model of the North American pork sector for the evaluation of policy alternatives. *Canadian Journal of Agricultural Economics*, 30(1982)3, 201–208.

- Portal ISPO, informacijski servis podatkov. <http://e-uprava.gov.si/ispo/indeksi/izvozExcel.ispo?vrstaPregleda=tip4&osr=oddelki&timeIzbira2=on&odDatuma=199502&doDatuma=200512&datumZacetka=199501&indeks=indeksiCen> (3. feb. 2006).
- Sadoulet, E./ de Janvry, A. Quantitative development policy analysis. Baltimore and London, The Johns Hopkins university press, 1995, 397 str.
- USDA (United States Department of Agriculture). Foreign Agricultural Service. 1997. <http://www.fas.usda.gov/dlp2/circular/1997/97-03/pork.htm> (14. mar. 2006).
- Turk, J. The model of supply dynamics in pig production. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj., Kmet. (Zooteh.)*, 66(1995), 33–40.
- Turk, J. *Agrarna ekonomika, teorija in aplikacije*. Maribor, Univ. v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo, 1998, 176 str.
- Turk, J./ Erjavec, E./ Gambelli, D. Supply trends in Slovenian agriculture under transition to the market. *Eastern European Economics*, 37(1999)3, 6–33.
- Turk, J. *Teoretične in empirične analize v agrarni ekonomiki*. Maribor, Univ. v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo, 2001, 225 str.
- Vere, D./ Griffith, G./ Jones, R. The specification, estimation and validation of a quarterly structural econometric model of the Australian grazing industries. Adelaide, CRC for weed management systems, 2000, 53 str.
- Volk, T.S. *Uticaj agrarne politike na razvoj pojoprivrede Slovenije u periodu tranzicije i uključevanja u Europsku uniju*. Domžale, Društvo agrarnih ekonomistov Slovenije in Društvo agrarnih ekonomistov Srbije, 2004, 213 str.
- Volk, T.S. »Statistika odkupa kmetijskih pridelkov po mesecih za obdobje med januarjem 1995 in decembrom 2005 – preračun na podlagi podatkov Statističnega urada Republike Slovenije«. Ljubljana, KIS (osebni vir, 2006).

KMEČKA DRUŽINA NA PREHODU OD TRADICIONALNOSTI K POST-MODERNOSTI *

Lucija PINTERIČ ^{a)}, Majda ČERNIČ-ISTENIČ ^{b)} in Jernej VRTAČNIK ^{c)}

^{a)} Flandrova ulica 9, SI-1210 Ljubljana – Šentvid, Slovenija.

^{b)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fak., Odd. za agronomijo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, doc.dr.

^{c)} Dvorakova 13, SI-1000 Ljubljana, Slovenija.

Delo je prispelo 15. maja 2006, sprejeto 20. novembra 2006.

Received May 15, 2006, accepted November 20, 2006.

IZVLEČEK

Slovenska kmečka družina se spreminja. V določenih segmentih še ohranja svoje tradicionalne značilnosti, vendar vedno bolj prevzema tudi značilnosti moderne, mestoma celo post-moderne družine. Tudi struktura kmečkega gospodinjstva se spreminja, večinoma ga tvori le družinsko jedro. Vendar je v kmečki družini še ohranjena medgeneracijska solidarnost. Starejša generacija pomaga mlajši zlasti pri varstvu otrok. Kmečka družina ima danes manj otrok, čeprav kmečko prebivalstvo kot edina poklicna skupina še vedno ohranja svojo rodnost na ravni samoobnavljanja prebivalstva. Mladi so še vedno pripravljene skrbeti za svoje starše, toda le v mejah ohranjanja svoje zasebnosti. Predaja kmetije mladim je nezanesljiva in čas predaje pogosto nedoločen.

Ključne besede: ruralna sociologija / kmetijstvo / kmečka družina / kmečko gospodinjstvo / medgeneracijski odnosi / odnosi med spoloma / nasledstvo / Slovenija

TRANSITION OF FARM FAMILY IN SLOVENIA FROM TRADITION TO POST- MODERNITY †

ABSTRACT

Slovenian farm family is facing transformation. It is still traditional in some respects, but it also gains some modern characteristic as well as post-modern. Also the structure of farm household is changing; it is mostly gathered around by nuclear family core. Anyway farm family still preserves intergenerational solidarity. Older generation helps younger mostly by babysitting. Nowadays farm households have much less children, but the fertility level is high enough to preserve the farm population. Younger generation is still prepared to take care of the older, but at the same time they want to keep their privacy. Passing the farm to a younger generation is unreliable, and the time when a successor takes over the farm is often not defined.

Key words: rural sociology / agriculture / farm family / farm household / intergenerational relations / gender relations / succession / Slovenia

* Prispevek je del diplomske naloge (zagovor 28. oktober, 2005), mentorica doc. dr. Majda Černič-Istenič, recenzent doc. dr. Luka Juvančič.

† The article is a part of graduation thesis (justification October 28, 2005), supervisor ass. prof. Majda Černič-Istenič, Ph.D., reviewer ass. prof. Luka Juvančič, Ph.D.

UVOD

V ruralni sociologiji je kmetija opredeljena kot socialni sistem, sestavljen iz družine, gospodinjstva in proizvodnega obrata, v katerega mora biti vključena podjetniška komponenta (Kovačič, 2001; Djurfeldt, 1996; Gidakou, 1999). Kmečko gospodarstvo je tesno povezano s kmečko družino, še posebej pri družinskih kmetijah, na katerih so delovna sila družinski člani.

Kmečka gospodinjstva se postopno krčijo in omejujejo na dve generaciji, na generacijo staršev in otrok. Še v začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja so bila, kot ugotavlja Barbič (1990), med kmečkimi družinskimi gospodinjstvi še vedno prevladujoča trigeneracijska gospodinjstva, in sicer dvakrat bolj pogosto kot v mestih, kar nakazuje, da se je na podeželju daljši čas ohranjala tradicija, po kateri člani gospodinjstva v aktivni življenjski dobi skrbijo za svoje starše. Ohranjanje medgeneracijskih odnosov je izredno pomembno tudi danes, ko se srednja generacija sooča z velikimi pritiski in obveznostmi vedno hitrejšega tempa življenja in vse težjega usklajevanja delovnega in družinskega življenja. Če je starejša generacija zdrava, lahko srednjo razbremeni. Lahko pomagajo varovati otroke, negovati bolne, lahko pomagajo v gospodinjstvu in so vir ekonomske pomoči (Pentek, 1999). Zaradi postopnega rahljanja medgeneracijskih vezi, do česar prihaja tudi na podeželju, pa se med starejšimi lahko krepí bojazen, da mladi zanje ne bodo skrbeli, ko jim bodo popustile življenjske moči. Starejši mladim zato neradi predajo kmetijo v nasledstvo, vse več pa je tudi kmečkih otrok, ki ne želijo kmetije prevzeti po svojih starših (First-Dilič, 1986, cit. po Barbič, 1990).

Družina se zdi nekaj samoumevnega, težko si je predstavljati človeštvo brez družine (Dyczewski, 1999). Vendar se ta spreminja tako v svoji strukturi kot partnerskem in reproduktivnem vedenju, kar se kaže v naraščanju izvenzakonskih partnerskih zvez, razvez in naraščajočem številu parov, ki se zavestno odločajo za življenje brez otrok. Omenjene spremembe močno vplivajo na medgeneracijske odnose in na odnose med spoloma. Danes lahko govorimo o novem tipu družine o t.i. »stebelni družini«. Zanj je značilno, da je po številu članov manjša kot pretekle oblike družine in da jo pretežno sestavljajo štiri generacije (Macura, 2001b). Najbolj vidne družbene posledice, h katerim pomembno prispeva spreminjanje odnosov v sodobni družini, so upadanje deleža mladih in naraščanje starejšega prebivalstva ob upadanju rodnosti in podaljševanju življenjske dobe.

Različnim oblikam družine ustrezajo tudi posebna poimenovanja:

- Nuklearna družina prokreacije: sestavljata jo dva odrasla in njuni biološki ali posvojeni otroci, ki živijo v skupnem gospodinjstvu.
- Nuklearna družina orientacije: je izvorna družina, v katero se posameznik rodi, v njej živi s starši, brati in sestrami.
- Razširjena družina: o njej govorimo takrat, ko člani nuklearne družine živijo z enim ali več bližnjimi sorodniki (starimi starši, brati, sestrami, tetami, strici in drugimi).

Človek se rodi v nuklearni družini orientacije. Kasneje si s partnerjem in otroki, bodisi biološkimi ali posvojenimi ustvari lastno družino – nuklearno družino prokreacije. Če v takšno družino člani sprejmejo še posameznike iz svoje nuklearne družine orientacije ali druge bližnje sorodnike, pa govorimo o razširjeni družini (Giddens, 2002).

Z našim preučevanjem medgeneracijskih odnosov in odnosov med spoloma smo želeli ugotoviti, kako se omenjene spremembe in trendi moderne družine kažejo v kmečki družini v Sloveniji. Opazovali in proučevali smo jih v povezavi z velikostjo, usmeritvijo (živinorejo, poljedelstvom, vinogradništvom), lastništvom kmetije, zagotovljenim nasledstvom, tipom vasi (obcestna, sklenjena, zaselek, kmetija na samem) in tipom naselja (obcestno, prevladujoče podeželsko in območje podeželskega praznjenja). Pri tem smo izhajali iz naslednje hipoteze: odnosi med generacijami in spoloma na slovenskih kmetijah so povezani z velikostjo, usmeritvijo kmetije, lastništvom kmetije, zagotovljenim nasledstvom kmetije, tipom naselja in tipom vasi.

KMEČKA DRUŽINA V PRETEKLOSTI

Kmečko gospodinjstvo v zahodni in srednji Evropi do 19. stoletja ni zajemalo le družinskih članov, ki so si bili v krvnem in priženjenem sorodstvu, temveč so bili pogosto v gospodinjstvo vključeni tudi samski posli. Proti koncu 19. stoletja so se posli, služinčad in druge pomožne delovne moči umaknili iz kroga kmečke družine. Kmečko gospodinjstvo se je številčno vse bolj krčilo. V 20. stoletju kmečko gospodinjstvo vključuje le krvno in priženjeno sorodstvo (Sieder, 1998).

Kmečko družino je načeloma vodil kmečki par. To je bilo razvidno tudi iz delitve dela na gospodarstvu. Kmet je imel nadzor nad moškimi delovnimi močmi, kmetica pa nad ženskimi. Delitev dela med spoloma, je bila odvisna od področja in gospodarskega pomena določenih opravil na kmetiji (Sieder, 1998; Dyczewski, 1999).

Čim bolj je bilo neko delovno področje v središču ekonomskega interesa, trenirano kot poklic in naravnano na trgovanje onkraj regionalnih meja, tem večji delež moških je bil vključen v taka opravila. Tesneje ko je bila neka dejavnost povezana z gospodinjstvom, tem bolj verjetno je bilo, da so ta dela opravljale ženske. Čim bolj zapletene so bile naprave in stroji, ki so jih potrebovali za delo, tem bolj pomemben je bil delež moških pri tovrstnih opravilih. Enako je veljalo za opravila, ki so zahtevala večjo uporabo moči. Čim bolj precizno je bilo neko delo, čim več spretnosti je zahtevalo in čim bolj enolično je bilo, tem bolj verjetno so ga opravljale ženske. Vendar se je od tega vzorca tudi odstopalo; ženske so se vedno znova vključevale v dela na travnikih in poljih, kjer so rahljale grude za plugom, ruvale plevel, kosile, grabile seno in pomagale pri spravilu. Prav tako pa so opravila, ki so na nekem področju veljala za tipična moška opravila, lahko v nekem drugem okolju veljala za domeno žensk (Sieder, 1998).

Še v 19. stoletju so na kmetijah veljala določena družbena pravila, ki so se izoblikovala še pred industrijskim razvojem. Eno od teh je bila obvezna poroka, ki je bila brezpogojna, če je kdo želel naslediti kmečko gospodarstvo. Kmečkega gospodinjstva si ni bilo moč predstavljati brez zakonskega para, torej kmeta in kmetice (Sieder, 1998).

Poroka na kmetiji v tistem času ni bila osebna odločitev posameznika. O poročnih načrtih je odločala zemljiška posest staršev (dediščina), dota, interes hišne in vaške skupnosti. Precej manjšo veljavo sta imeli telesna privlačnost in čustvena naklonjenost, predvsem pa nista bili odločilni. Posameznik je bil vpet v tradicijo in je moral spoštovati prenos posesti iz roda v rod. V primeru, da se posameznik ni strinjal z »razumno« odločitvijo staršev o poroki, je bil deležen odklonilnega in kaznovalnega obnašanja (sramotilnih šeg). Pritiskov pri iskanju partnerja za poroko pa ni bil deležen samo dedič, ampak tudi drugi otroci. Nenapisano pravilo je govorilo o tem, da so hčere oddajali v zakon od najstarejše do najmlajše. Doto je določil kmečki par (Sieder, 1998).

Kmečka družina je v preteklosti veljala za patriarhalno. Predvsem se je to kazalo v nezaupanju mož do svojih žena. Možje so vse do uvedbe industrijskega meznega dela imeli svoje žene »na očeh«. Ženske so opravljale dela na domu v bližini svojih soprogov in niso opravljale plačanih del, vsaj v večji meri ne. Življenjski krog žensk je bil omejen na kmečko gospodinjstvo, trg, cerkev in zbor faranov. Družinske odnose v preteklosti so zaznamovali tudi odnosi do otrok. Ti so bili pogostokrat površina, na katero so odrasli projicirali svoje težave. Kmečki otroci so bili obravnavani kot delovna sila. Že zelo kmalu so bili vključeni v svet odraslih. Čim so dosegli določeno telesno moč, so bili vključeni v delovna opravila kmetije. S stopnjevanjem storilnosti se je otrokom stopnjeval tudi njihov ugled v hiši, količina hrane in simbolični vrstni red pri mizi. S tem ni rečeno, da odnosi niso imeli nobene »emocionalne kvalitete«, ali pa da matere niso gojile nobenih čustev do svojih otrok. Starši niso svojih čustev kazali preko govora in empatije, ampak preko simbolov in ritualnih vedenjskih vzorcev. Preteklost priča o precejšnjem številu umrlih novorojenčkov, slabi oskrbi in negi otrok zaradi pomanjkanja znanja, vendar pa so starši vedno pazili, da so bili novorojenčki takoj po rojstvu

krščeni. Kljub navidezni hladnosti v odnosih za današnje oči, so bili tovrstni obredi orodje, s katerim so starši pokazali svojim otrokom naklonjenost.

KMEČKA DRUŽINA DANES

Način življenja na kmetiji danes še vedno narekuje posebno delitev dela med družinskimi člani. Opravila na kmetiji ostajajo tradicionalno deljena na tipično ženska, moška in skupinska. Černič Istenič (2002) ugotavlja, da se v gospodinjska dela večinoma vključujejo le ženske. Moški se bolj ukvarjajo s t.i. »tehničnimi« opravili v in izven hiše. Skrb za otoke in ostarele je še vedno največkrat žensko delo, medtem ko si starša igro z otroki pogosto delita. Odločanje v gospodinjstvu je pomembno za življenje v kmečkem gospodinjstvu. Černič Istenič (2002) ugotavlja, da skorajda ni področja sprejemanja odločitev, kjer bi odločal le moški ali le ženska. Odločitve v večini kmečkih gospodinjstev sprejemata mož in žena skupaj. Ker so tri generacije družine v kmečki populaciji kar trikrat bolj pogoste kot v mestih, je tudi vpliv večjega števila članov gospodinjstva na odločitve v gospodinjstvu večji.

V kmečkem gospodinjstvu pogosto živita starejši in mlajši zakonski par. Nekako samoumevno je, da mlajši par izkazuje spoštovanje starejšemu paru. Spoštovanje starejših je ena najpomembnejših vrednot v kmečkih družinah, ki se prenaša iz roda v rod. Spoštovanje starejših je prisotno že pri majhnih otrocih, še posebej je to izrazito na samotnih kmetijah (Makarovič, 1995).

Ženske, ki živijo na kmetiji, si danes pogosto poiščejo zaposlitev v nekmetijski dejavnosti. Gidakou (1999) z raziskavo na podeželju v Grčiji ugotavlja, da je zaposlitev ženskam izredno pomembna. Tudi tiste ženske, ki niso zaposlene zunaj kmetije, si na kmetijah pogostokrat najdejo svojo zaposlitev v dopolnilnih dejavnostih: kmečki turizem, pridelovanje raznih poljščin, prodajanje na tržnici in druge majhne podjetne storitve, ki so koristne v danem okolju. Te dejavnosti so ključne za zadrževanje mladih žensk na kmetijah. Do podobnih ugotovitev je prišla tudi Barbič (1994), ki je raziskovala razloge precej manjše pripravljenosti današnjih podeželskih deklet za poroko na kmetijo kot v preteklosti.

Kmečka dekleta so poroki na kmetijo dandanes manj naklonjena kot v preteklosti, ker kmečki poklic v družbi ni cenjen, zaslužek od kmetijstva je premajhen, izšolale so se za drug poklic, kmečki fantje nimajo časa za sklepanje znanstev, na deželi ni zasebnosti in ker kmetice nimajo možnosti izrabiti porodniški dopust. Kmetje danes tako težje dobijo ženo, celo tisti, z dobro opremljenih in učinkovitih kmetij (Barbič, 1994). Tudi viri drugje po svetu (Gidakou, 1999) poročajo, da dekleta negativno vrednotijo zaposlitev na kmetiji in s tem tudi življenje na kmetiji.

Pretekle generacije niso imele izkušnje z razvezami, predvsem na kmetijah ne, kar se pozna še danes (Sieder, 1998). Makarovič (1995) ugotavlja, da je statistično najmanj razvez med zakonci na kmetijah. Zatrjevanje, da med njimi vlada večje razumevanje in ljubezen bi lahko bila ohlapna in hkrati neresnična. Vzrok temu, da je ločitev manj, pa so lahko vera, otroci, mnenje sosedov in navsezadnje kmetija ter skupno opravljanje kmečkih opravil. Barbič (1993) ocenjuje, da kmetija daje članom družine ekonomsko in socialno varnost, ki je ni moč razdeliti na več delov. K ohranjanju zadovoljivih medsebojnih odnosov na kmetijah prispeva tudi pozitivno mišljenje in iskanje pozitivnih lastnosti med partnerji (Makarovič, 1995). Zakonci v urbanem okolju lažje sprejmejo razvezo kot kmetje (Barbič, 1993).

NASLEDSTVO

Prenos posestva iz starejše na mlajšo generacijo ohranja kontinuiteto obstoja in delovanja kmetije. Izpolnitev tega pogoja spodbuja razvoj in napredek kmetije. Če naslednika ni, potem

manjka temeljni motiv za nadaljnje delo in vlaganje v kmetijo in kmetija kot proizvodna enota ugasne (Barbič, 1991; Kovačič, 2001; Ilak Peršurić, 2003).

Še v 18. in 19. stoletju je dedovanje potekalo različno glede na to, ali je bilo uveljavljeno načelo nedeljivosti ali deljivosti dediščine. V nekaterih delih Evrope se niso strogo oprijemali pravil nasledstva, ampak so po temeljitem razmisleku zapustili kmetijo tistemu, ki je bil za gospodarjenje, delo in koristi staršev, ki so želeli čim dlje ostati na položaju, najbolj primeren (Sieder, 1998).

Dedovanje kmetij v Sloveniji postaja danes vse večji problem. Razloge zanj lahko iščemo v nepripravljenosti starejše generacije pravočasno predati kmetije mlajši generaciji (Barbič, 1991). Zato narašča starost naslednikov. Praviloma je naslednik še vedno moški. Podobne probleme imajo tudi drugje. Ilak Peršunrić (2003) ugotavlja, da je v Istri 75 odstotkov naslednikov moških. Več kot polovica (Barbič, 2003) moških naslednikov je starih nad trideset let in približno polovica od teh ni poročena. Okoli 40 odstotkov slovenskih kmetij nima zagotavljenega naslednika. Enak odstotek je takšnih, ki ne kažejo zanimanja za kmetijsko dejavnost. Trenutno le izkoriščajo kmetijske obrate brez kakršnegakoli vlaganja vanje. Na slovenskih kmetijah je več samskih naslednikov kot naslednic (Barbič, 1993).

Prevzem kmetije pomeni tudi spremembo razmerij med starejšo in mlajšo generacijo. Gospodarju vodenje kmetije daje moč, pravice, vrednost in s tem poslušnost družine in tistih, ki delajo na kmetiji. Gospodar ima pri predaji kmetije pomisleke in stiske. Kmetje so mnenja: »Noben ne da rad gospodarstva iz rok pred smrtjo, če izročiš posestvo, nimaš pravic, dotlej te morajo ubogati.« Makarovič (1995: 241).

MATERIAL IN METODE

Anketni vprašalnik, s katerim smo pridobili informacije, smo povzeli po raziskavi Odnosi med generacijami in spoloma (Generations and Gender Survey) (GGP, 2004). Vprašalnik je prevedla skupina raziskovalcev na Družbenomedicinskem inštitutu Znanstvenoraziskovalnega centra Slovenske akademije znanosti in umetnosti (ZRC SAZU). Za namene te naloge smo anketnemu vprašalniku dodali še vprašanja o značilnostih kmetij.

Podatke smo zbirali od januarja do marca 2005 na območju celotne Slovenije. Vprašanih je bilo 110 anketirancev, ki živijo na kmetijah (Pinterič, 2005). Vzorec anketirancev je bil spolno in starostno uravnotežen (preglednica 1).

Preglednica 1. Anketiranci po spolu in starosti
Table 1. Respondents according to gender and age

	Starostni razred / Age group					Skupaj Total
	1	2	3	4	5	
Moški / Male	11	12	10	11	10	54
Ženske / Female	11	11	13	12	9	56
Skupaj / Total	22	23	23	23	19	110

REZULTATI IN RAZPRAVA

Velikost in struktura gospodinjstva

Največ gospodinjstev v našem vzorcu šteje štiri člane. Le trije anketiranci živijo sami. Dve gospodinjstvi štejeta osem članov. Povprečno število članov kmečkega gospodinjstva v proučevanem vzorcu je 4, s standardnim odklonom 1,5 člana. Več kot polovica anketirancev živi v nuklearni družini prokreacije (slika 1). Naslednja najpogostejša oblika bivanja je nuklearna družina orientacije. Med obliko bivanja anketiranca in velikostjo kmetije, usmeritvijo kmetije, lastništvom kmetije, nasledstvom kmetije, tipom naselja in tipom vasi nismo našli statistično značilnih razlik.



1 – Živi sam / Lives alone; 2 – S partnerjem / With a partner; 3 – Nuklearna družina-prokreacije / Nuclear family of procreation; 4 – Enoroditeljska družina / Single-parent family; 5 – S partnerjem in drugimi sorodniki / With a partner and other relatives; 6 – Razširjena družina-prokreacije / Extended family; 7 – Enoroditeljska družina-razširjena / Extended single-parent family; 8 – Nuklearna družina-orientacije / Nuclear family of orientation;

Slika 1. Tipi gospodinjstev, v katerih živijo anketiranci, v deležih, %, (N=110).

Figure 1. Types of households according to respondents, in shares, %, (N=110).

Delitev dela v gospodinjstvu

Naši rezultati kažejo tipično organizacijo del v kmečkem gospodinjstvu. Pripravljanje dnevnih obrokov, pomivanje posode in pospravljanje so predvsem ženska opravila. Moška domena so bolj popravila v in izven stanovanja. Plačevanje računov, skrb za finančne zadeve, skupne družabne dejavnosti in nakup hrane so dela, ki si jih moški in ženske v našem vzorcu delijo (preglednica 2).

Statistično značilne razlike smo opazili med pomivanjem posode, pripravljanjem dnevnih obrokov, nakupovanjem hrane, sesanjem stanovanja, plačevanjem računov in spolom. Večja kot je kmetija, bolj so ta opravila porazdeljena med člani, sodelujejo pa tudi nečlani gospodinjstva. Na manjših kmetijah so s temi opravili bolj obremenjene le anketiranke oz. partnerke anketirancev (preglednica 3).

Tudi med lastništvom kmetije in plačevanjem računov obstajajo statistično značilne razlike. Za plačevanje računov najpogosteje skrbijo lastniki kmetije. Pripravljanje dnevnih obrokov in nakupovanje hrane so opravila, ki jih na kmetijah z urejenim nasledstvom pogosteje opravljajo tudi druge osebe, bodisi člani gospodinjstva bodisi nečlani. Tudi tip naselja vpliva na organizacijo dela v gospodinjstvu, statistično značilne razlike smo našli med tipom naselja in pripravljanjem obrokov. V podeželskih območjih, ki so bližje urbanim območjem, si pari bolj

pogosto delijo pripravo obrokov kot pari s podeželja. Organiziranje družabnih dejavnosti je v podeželskih krajih, bolj oddaljenih od mest, tudi bolj pogosto prepuščeno drugim članom družine kot v podeželskih krajih, bližje mestu.

Ocenjevali smo tudi zadovoljstvo z delitvijo opravil v gospodinjstvu med anketiranimi in njihovimi partnerji. Anketirance smo prosili, da ocenijo na lestvici od 0 (popolnoma nezadovoljen/a) do 10 (naravnost odličen), kako so zadovoljni z delitvijo opravil v gospodinjstvu s svojimi partnerji/kami. Pokazalo se je, da so moški bolj zadovoljni ($\bar{x} = 8,9; \delta = 1,4$) z delitvijo opravil v gospodinjstvu kot ženske ($\bar{x} = 7,0; \delta = 2,8$).

Preglednica 2. Organizacija dela v gospodinjstvu po spolu
Table 2. Work organization in farm household

Gospodinjaska opravila Household tasks		Vprašani Respondent		Oba Both		Partner Partner		Drugi Others	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Pripravljanje obrokov Cooking	Moški / Male	5	9,3	1	1,8	33	61,1	15	27,8
	Ženske / Female	50	89,3	0	0,0	0	0,0	6	10,7
Pomivanje posode Dishwashing	Moški / Male	3	5,5	4	7,4	30	55,6	17	31,5
	Ženske / Female	46	82,1	3	5,4	0	0,0	7	12,5
Nakup hrane Buying food	Moški / Male	9	16,7	15	27,8	17	31,5	13	24,0
	Ženske / Female	28	50,0	15	26,8	2	3,6	11	19,6
Pospravljanje Cleaning	Moški / Male	5	9,4	5	9,4	24	45,3	19	35,9
	Ženske / Female	42	76,4	3	5,4	1	1,8	9	16,4
Popravila Repairs	Moški / Male	42	77,8	2	3,7	2	3,7	8	14,8
	Ženske / Female	5	8,9	6	10,7	32	57,2	13	23,2
Plačevanje računov Paying bills	Moški / Male	15	27,8	20	37,0	7	13,0	12	22,2
	Ženske / Female	22	39,3	19	33,9	8	14,3	7	12,5
Družabne dejavnosti Social activities	Moški / Male	5	9,3	22	40,7	11	20,4	16	29,6
	Ženske / Female	22	39,3	23	41,1	1	1,8	10	17,8

Vprašani – anketiranec/ka / respondent; Oba – anketiranec/ka in partner/ka / both; Drug – druga oseba / others;

Zakonski stan in število otrok

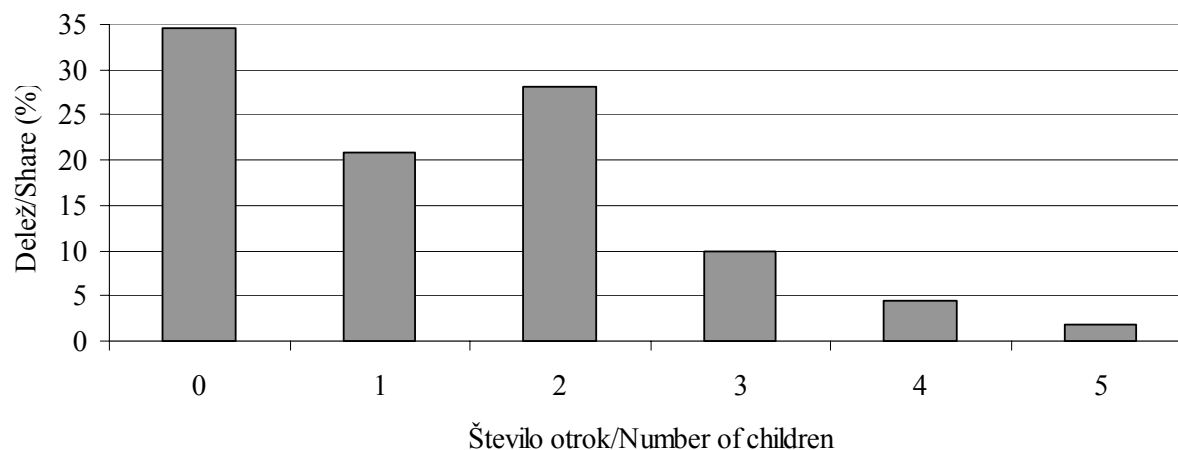
V proučevani populaciji je 67 odstotkov anketirancev poročenih. Neporočenih je 20 odstotkov, ostali nimajo partnerja/ke.

Število otrok v kmečkih gospodinjstvih v zajetem vzorcu se giblje od nič do pet otrok. Kar 35 odstotkov anketirancev nima otrok. Med tistimi, ki imajo otroke, jih ima največ dva otroke (slika 2). V povprečju imajo gospodinjstva v našem vzorcu 1,3 otroka (standardni odklon 1,3). Posvojenih otrok ali otrok v reji v proučevanem vzorcu nismo našli.

Preglednica 3. Vrednosti χ^2 in statistična značilnost (p-vrednosti)Table 3. Values of χ^2 and statistical significance

	Spol Gender	Velikost kmetije Farm size	Lastništvo kmetije Farm ownership	Urejeno nasledstvo Assured succession	Tip kraja Type of locality
Pomivanje posode Dishwashing	74,6 **	8,5 *		8,7 *	8,2 *
Pripravljanje dnevnih obrokov Cooking		10,2 *		11,8 **	
Nakupovanje hrane Buying food	21,7 **	10,3 *		13,7 *	
Pospravljanje Cleaning	54,3 **	10,2 *			
Popravila Repairs	58,7 **				
Organiziranje druž. dejavnosti Social activities	20,4 **				7,6 *
Plačevanje računov Paying bills		8,7 *	15,4 *	12,9 **	

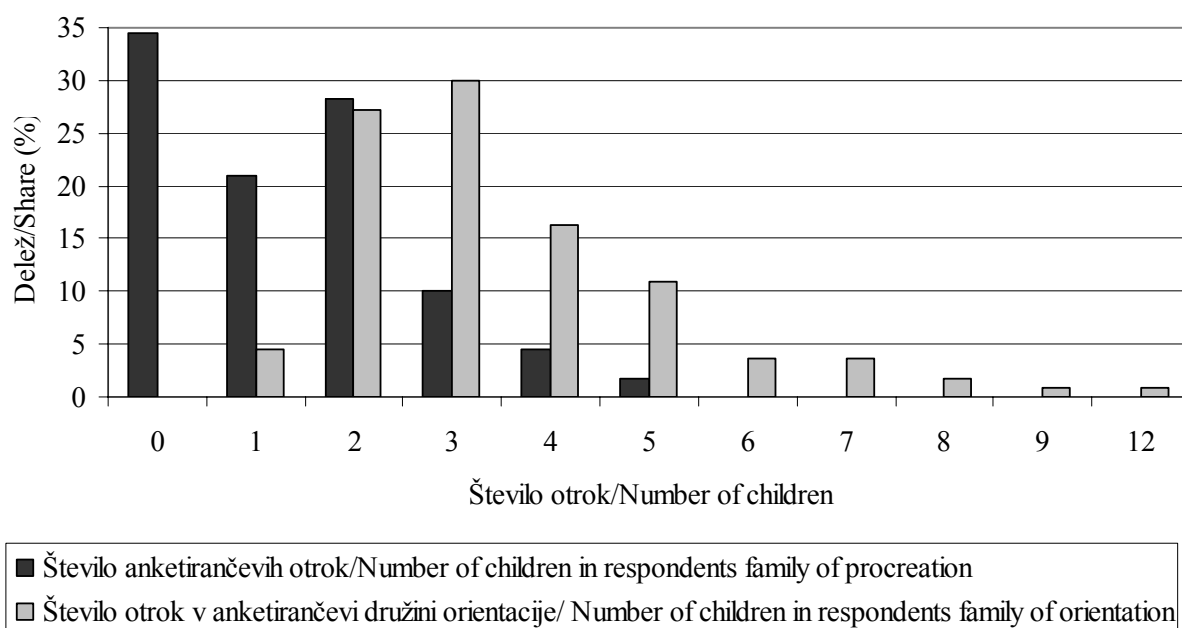
* – $p < 0,05$ (statistično značilne razlike/statistical significance); **- $p < 0,01$ (visoko statistično značilne razlike/high statistical significance)



Slika 2. Število otrok v kmečkem gospodinjstvu, izraženo v deležih, %, (N=110).

Figure 2. Number of children in farm household, in share, %, (N=110).

V izvornih družinah naših anketirancev so bili najpogosteje trije (15 odstotkov) ali dva (14 odstotkov) otroka (slika 3). Ekstremno število otrok, ki smo jih zasledili v izvornih družinah naših anketirancev, je bilo dvanajst. Na tak ekstrem v anketirančevih družinah prokreacije nismo našli, največje družine imajo po pet otrok.



Slika 3. Število otrok v anketirančevi nuklearni družini orientacije in število anketirančevih lastnih otrok, izraženo v deležih, %, (N=110).

Figure 3. Number of children in respondent's family of orientation and the number of children in respondent's family of procreation, in share, %, (N=110).

Delitev opravil pri preskrbi za otroke

Naše anketirance smo spraševali, kdo v njihovem gospodinjstvu oblači otroke in skrbi, da so primerno oblečeni. Večinoma je to skrb žensk, v manjši meri se teh opravil lotevajo tudi moški. Otroke ponavadi pospremito spat ženske in prav tako ostanejo doma, če so otroci bolni. V igro z otroki se moški bolj vključujejo, vendar so še vedno ženske tiste, ki se bolj posvečajo otrokom tudi pri igri. Prevozi otrok v vrtce in šole so približno enako porazdeljeni med moškimi in ženskami. Statistično značilnih razlik med delitvijo opravil za otroke in usmeritvijo kmetije, velikostjo kmetije, dejavnostjo, lastništvom kmetije zagotovljenim nasledstvom, tipom naselja in tipom vasi nismo našli.

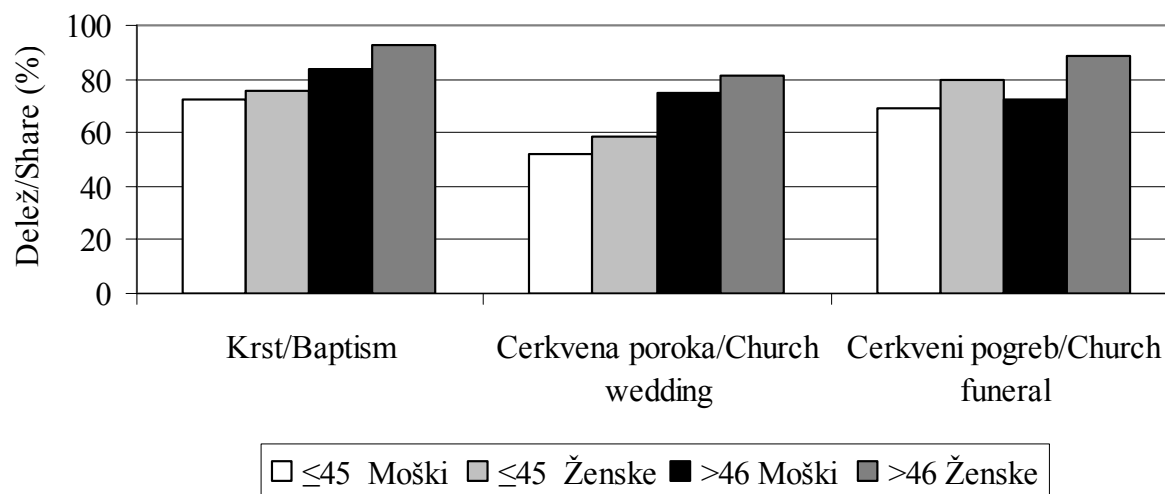
Moški so na splošno bolj zadovoljni ($\bar{x} = 8,3; \delta = 2,4$) z delitvijo opravil povezanih z otroki s partnerko, kot so ženske ($\bar{x} = 7,3; \delta = 2,9$). Kar 33 odstotkov moških in enak delež žensk pa je popolnoma zadovoljnih. Povprečna ocena zadovoljstva z delitvijo opravil je 7,8 (standardni odklon 2,7).

Urejeno redno varstvo za otroke ima le 36 odstotkov anketirancev. Na osnovi tega lahko ugotovimo, da imajo pri varstvu otrok še vedno veliko vlogo stari starši.

Vrednote, usmeritve in stališča

Edina veroizpoved, za katero so se anketiranci (95 odstotkov) v proučevanem vzorcu opredelili, je bila rimokatoliška. Za ateiste so se opredelili 4 odstotki vprašanih. Tistih, ki so verniki, vendar ne pripadajo nobeni veroizpovedi, je 2 odstotka. Polovica vernikov se tedensko udeležuje verskih obredov. Približno četrtnina jih obiskuje verske obrede mesečno, ostali pa le nekajkrat na leto. Pri tem so bili izvzeti obiski obredov ob porokah, pogrebih in krstih.

Strinjanje anketirancev s trditvami, da je za otroka pomembno, da je sprejet v primeren verski obred (krst, obhajilo, birma); da majo pari, ki se poročijo na matičnem uradu, tudi cerkveno poroko in da ima pogreb tudi verski obred, prikazuje slika 4.



Slika 4. Strinjanje anketirancev s krstom, cerkveno poroko in pogrebom po spolu in starosti, izraženo v deležih, %, (N=52).

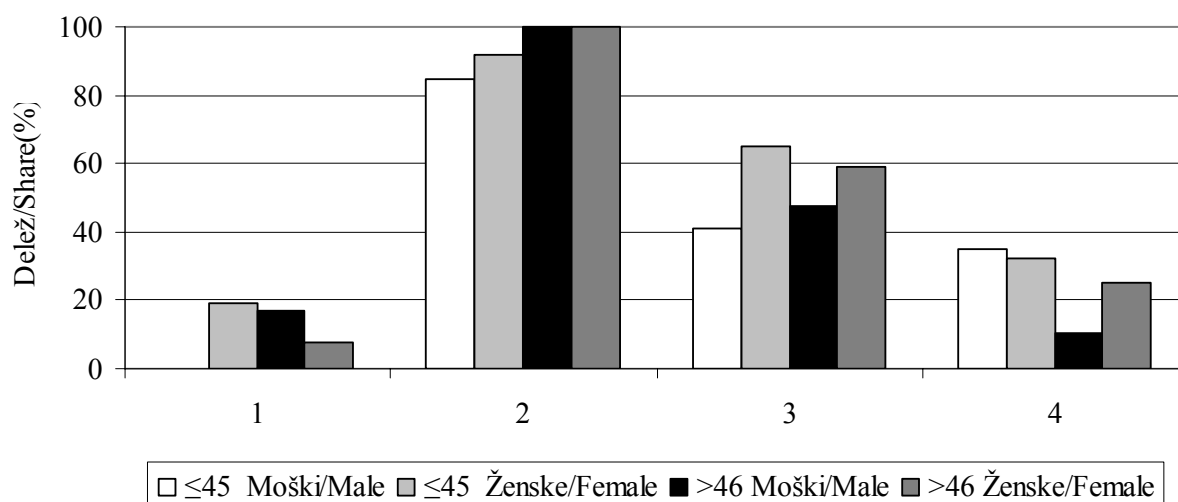
Figure 4. The respondent's agreement with baptism, church wedding and church funeral, in share, %, (N=52).

Kljub temu da je vernih skoraj 95 odstotkov anketirancev, cerkvena poroka zanje niti ni zelo pomembna. Le 66 odstotkov jih meni, da je cerkvena poroka pomembna. S tem se najbolj strinjajo ženske, starejše od 46 let. Kar 14 odstotkov anketirancev jih celo meni, da to sploh ni pomembno, najbolj pogosto moški, mlajši od 45 let. Glede na to je moč sklepati, da je zakon kot vrednota, ki je včasih bila na kmetih neizogibna »nuja« in edino prav, precej izgubila na svoji veljavi. Pri vprašanjih o otrocih in smrti so bili odgovori anketirancev bolj čustveni. Tako se jih je kar 81 odstotkov izreklo, da je za otroka pomemben krst in da sodeluje pri drugih verskih obredih. Ob tem najbolj izstopajo ženske, stare nad 46 let.

Ugotovili smo tudi, da vprašanim, ki živijo v zaselkih in na samotnih kmetijah, cerkvena poroka pomeni več kot tistim, ki živijo v sklenjenih in občestnih vaseh. Ugotovili smo tudi, da se anketiranci, ki živijo v zaselkih in na samotnih kmetijah, pogosteje strinjajo s trditvijo, da mora pogreb imeti cerkveni obred, kot tisti anketiranci, ki živijo v sklenjenih in občestnih vaseh.

Vrednotenje partnerske zveze in družine

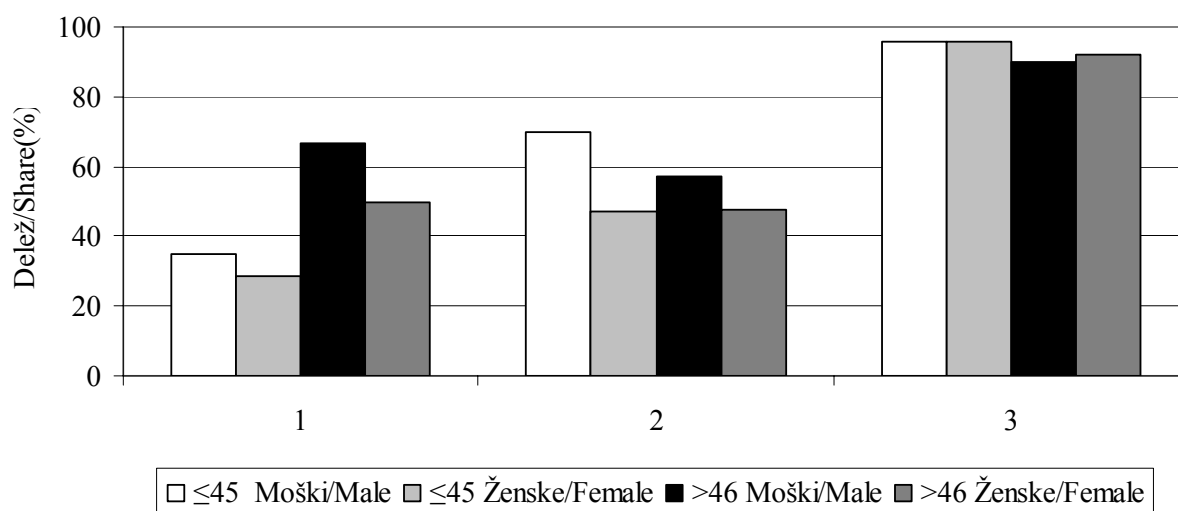
Zakonska zveza za večino vprašanih (81 odstotkov) ni zastarela institucija. Obenem pa jih 59 odstotkov meni, da naj se par, ki v zvezi ni srečen, loči, čeprav ima otroke. Stališče anketirancev do zakonske zveze ni jasno opredeljeno. Nekateri menijo, da je zakonska zveza doživljenjska, medtem ko se drugi zavzemajo za to, da naj se par, ki ni srečen, loči. Hkrati jih približno polovica pravi, da neporočen par lahko živi skupaj.



1 – Zakonska zveza je zastarela / Marriage is outdated; 2 – Otrok potrebuje oba starša / Child needs both parents; 3 – Ženska je lahko sama starš otroku / Woman can be a single parent; 4 – Istospolni in heterospolni pari bi morali imeti enake pravice / Homo and hetero sexual couples should have equal rights;

Slika 5. Mnenje anketirancev o zakonski zvezi, starševstvu in istospolnem partnerstvu po spolu in starosti, izraženo v deležih, %, (N = 45).

Figure 5. Attitudes of the respondents towards marriage, role of parents and homosexual partnership, in share, %, (N = 45).



1 – Otroci bi morali delo prilagoditi potrebam staršev / Children should adapt their labour to the needs of their parents; 2 – Ko starši obnemorejo bi se morali preseliti k svojim otrokom / When parents become disabled, then should move to their children; 3 – Predšolski otroci trpijo, če njihova mati dela / Pre school children suffer, if their mother works;

Slika 6. Strinjanje s trditvami o odnosih med starši in otroki po spolu in starosti v deležih, %, (N=45).

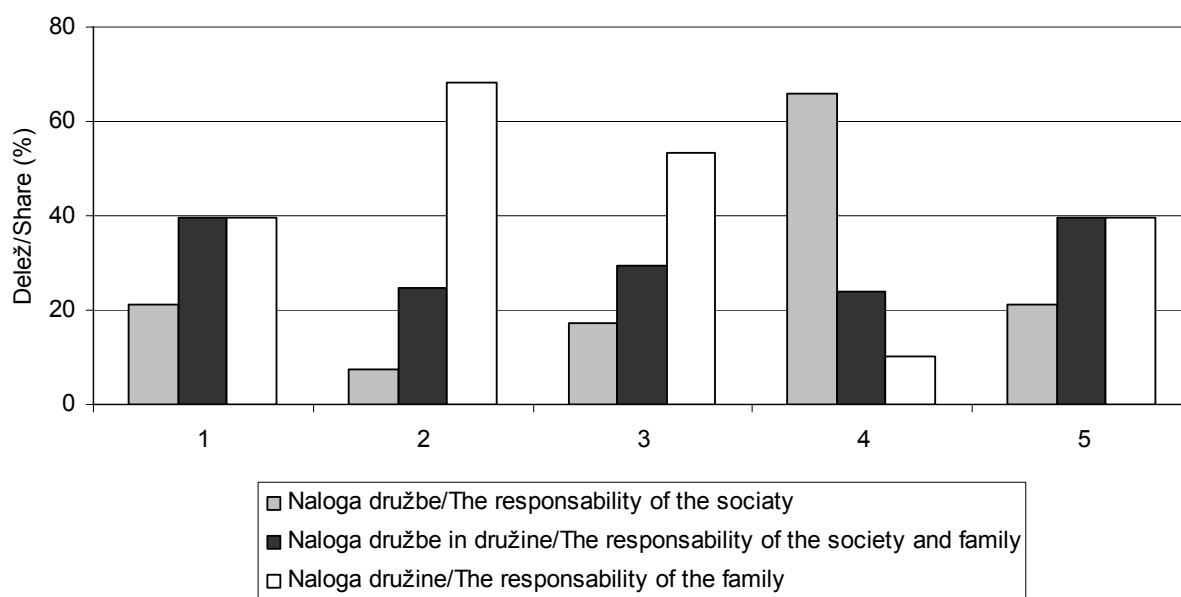
Figure 6. Respondents agreement regarding the relationship between parents and children, in shares, %, (N=45).

Anketiranci so naklonjeni medsebojni pomoči staršem, vnukom in otrokom. Dajanje in prejemanje pomoči je sprejemljivo za približno tri četrtine anketirancev, dokler dajanje pomoči

ne posega preveč v njihovo življenje. Le 31 odstotkov anketirancev bi jih bilo pripravljenih delo in življenje prilagoditi svojim staršem. Med njimi prevladujejo moški, starejši od 46 let. Med najmanj naklonjeni pa prevladujejo mlajši od 45 let, posebej ženske. Z mnenjem, da bi morali odrasli otroci na svoj dom sprejeti svoje ostarele starše, se strinja 41 odstotkov vprašanih. Med njimi so najpogosteje moški, mlajši od 45 let. S trditvijo, da je skrb za dom in družino prav tako izpolnjujoča kot zaposlitev, se strinjajo skoraj vsi vprašani. Izjema je le nekaj moških, starejših od 46 let. S trditvijo, da otroci pogosto trpijo, če je njihova mati zaposlena, se strinja kar 82 odstotkov vprašanih, predvsem moški in ženske, mlajši od 45 let (slika 6).

Stališča do solidarnostne vloge družbe in države

Zanimalo nas je, kaj anketiranci menijo o tem, kdo je odgovoren skrbeti za ostarele ljudi, urediti varstvo otrok po šoli, skrbeti za varstvo predšolskih otrok, denarno pomagati ostarelim in staršem z otroki.



1 – Skrb za ostarele, ki potrebujejo nego na svojem domu / Care for elders who need nursing in their homes; 2 – Skrb za predšolske otroke / Care for pre-school children; 3 – Varstvo za otroke po šoli / Care for children after class; 4 – Denarna podpora starejšim, ki živijo pod eksistenčnim minimumom / Financial support for elderly people, who live under existential minimum; 5 – Denarna podpora mlajšim z otroki, ki živijo pod eksistenčnim minimumom / Financial support for younger people with children, who live under existential minimum;

Slika 7. Mnenja anketirancev o tem, ali je za ostarele, otroke in denarne podpore odgovorna družba, družina ali obe, v deležih, %, (N=110).

Figure 7. Attitudes of the respondents towards the responsibilities of the state, the family and both family and the state for care of elderly, younger generation and children, in share, %, (N=110).

Da je skrb za ostarele, ki potrebujejo nego in varstvo na svojem domu, naloga družine, meni 39 odstotkov vprašanih (slika 7). Enak delež anketirancev tudi meni, da je to tako naloga družbe kot družine. Preostali so dodelili to nalogo družbi. S trditvijo, da so predšolski otroci naloga družine, se strinja kar 68 odstotkov vprašanih. Tudi glede varstva po šoli jih več kot polovica meni, da je to naloga družine. Glede denarne podpore starejšim ljudem, ki živijo pod eksistenčnim minimumom, 66 odstotkov anketirancev meni, da je to naloga družbe. Za mlajše

ljudi z otroki, ki živijo pod eksistenčnim minimumom, naj po mnenju anketirancev poskrbi družina (39 odstotkov) ali pa družina in družba (39 odstotkov).

Preglednica 4. Nasledstvo na kmetiji
Table 4. Succession of farm

Nasledstvo Succession	N	%
Gospodar je še mlad in še ne razmišljajo o nasledniku The land lord is still young and does not think about a successor	30	27,3
Kmetija ima naslednika, ki še ni dopolnil 15 let The farm has a successor, he / she is not 15 years old yet	7	6,4
Kmetija ima naslednika, ki dela samo na kmetiji The farm has a successor, who works only on the farm	8	7,3
Kmetija ima naslednika, ki dela na kmetiji in opušča zaposlitev The farm has a successor, who works on the farm and is giving up the employment	1	0,9
Kmetija ima naslednika, ki dela na kmetiji in je zaposlen The farm has a successor, who works on the farm and also has a second employment	45	40,9
Kmetija ima naslednika, ne živi na kmetiji, po prevzemu se vrača The farm has a successor, who does not live on the farm, he / she is coming back when he/she can take over the farm	5	4,5
Kmetija nima naslednika, ima pa dediča, ki ne namerava kmetovati The farm does not have a successor, but it has a heir who will not be a farmer	8	7,3
Kmetija nima niti naslednika niti dediča The farm reither has a successor not a heir	1	0,9
Ostalo Other	5	4,5
Skupaj Total	110	100,0

Naslednik na kmetiji

Obetavnih naslednikov, ki bodo z veliko verjetnostjo nadaljevali s kmetovanjem na domači kmetiji, je le 8 odstotkov. Velik je delež tistih, ki še ne razmišljajo o predaji kmetije, kar 27 odstotkov (preglednica 4). Kar 8 odstotkov kmetovalcev nima naslednika ali pa ima dediča, vendar ta ne namerava kmetovati. Najbolj zastopana kategorija kmetij z naslednikom, ki dela na kmetiji in je zaposlen ter bo po prevzemu kmetije obdržal zaposlitev, je (41 odstotkov). Kot je razvidno, velik delež kmetij v proučevani populaciji kombinira kmetijsko in nekmetijska dejavnost. Zagotovljeno nasledstvo kmetije je povezano z velikostjo kmetije. Večje kmetije imajo pogosteje urejeno nasledstvo ($\chi^2 = 8,4; p < 0,01$). Zagotovljeno nasledstvo je povezano

tudi z usmeritvijo kmetije ($\chi^2 = 3,9; p < 0,05$). Na živinorejskih kmetijah imajo v večjem deležu (70 odstotkov) urejeno vprašanje nasledstva kot na kmetijah, ki se ukvarjajo s katero drugo dejavnostjo. Nasledstvo kmetije je povezano tudi s spolom ($\chi^2 = 5,9; p < 0,05$). Več moških kot žensk ocenjuje, da je vprašanje nasledstva na njihovi kmetiji urejeno.

Za obstoj kmetije ni pomembno le, da ima naslednika in da ta namerava kmetovati. Zelo pomembna je tudi pravočasna predaja kmetije mlajši generaciji. V našem vzorcu kar 45 odstotkov anketirancev še ne ve, kdaj bodo predali kmetijo nasledniku (preglednica 5). Predvsem zato, ker imajo še majhne otroke.

Preglednica 5. Predaja kmetije nasledniku ali dediču
Table 5. Passing the farm to a successor

Predaja kmetije nasledniku Passing the farm to a successor	N	%
Po smrti sedanjega gospodarja After the death of the owner	29	26,4
Po pridobitvi(kmečke) pokojnine za gospodarja After earning the farm pension	2	1,8
Po končanem šolanju After finished school	5	4,5
Po poroki naslednika After the marriage of the successor	5	4,5
Še ni določeno kdaj It has not been defined yet	49	44,5
Brez odgovora No answer	20	18,2
Skupaj Total	110	100,0

Med predajo kmetije in velikostjo kmetije, usmeritvijo, lastništvom, zagotovljenim nasledstvom in tipom naselja nismo našli statistično značilnih razlik. Razlike pa smo našli med predajo kmetije nasledniku in tipom vasi ($\chi^2 = 6,3; p < 0,05$), namreč v zaselkih in na samotnih kmetijah imajo v večjem deležu določeno, kdaj bo naslednik prevzel kmetijo. V sklenjenih in obcestnih vaseh pa je večji delež tistih, ki še ne vedo, kdaj bo naslednik prevzel kmetijo.

SKLEPI

Medgeneracijski odnosi in odnosi med spoloma so povezani z velikostjo, usmeritvijo, lastništvom kmetije, zagotovljenim nasledstvom, tipom vasi in tipom naselja. Te povezave se kažejo v medsebojnem sodelovanju generacij v gospodinjstvu, pomoči starejšim in varstvu otrok. Anketiranci so naklonjeni medsebojni pomoči (staršem, vnukom, otrokom), dokler ta dejanja preveč ne posegajo v njihovo zasebnost. Na večjih kmetijah se gospodinjstva opravila porazdeljujejo med generacijami. Tudi nasledstvo je na večjih kmetijah pogosteje urejeno kot na manjših kmetijah.

Tradicionalnost kmetij se ohranja pri delitvi dela v kmečkem gospodinjstvu, ki se še vedno deli na tipično moška in ženska opravila. Gospodinjstva opravila veljajo še danes za tipično

ženska. V mlajši generaciji se moški še vedno v manjšini vključujejo v različna dela, povezana z otroki. Starejša generacija pomaga mlajši pri varstvu otrok.

Naši rezultati kažejo, da je v kmečki družini zakon kot vrednota nekoliko izgubil na pomenu, vsaj pri mlajši generaciji. Stališča o verskih obredih so povezana s tipom vasi, velikostjo kmetije in njeno usmeritvijo. Cerkevna poroka, krst in cerkveni pogreb so vrednote, ki jim dajejo največji poudarek starejše generacije žensk.

Spreminjanje odnosov v kmečki družini v smeri večjega poudarjanja medsebojnega partnerstva in neodvisnosti od starejše generacije, ob še vedno prisotni medsebojni solidarnosti, lahko vrednotimo kot potencial vzdržljivosti kmečke populacije in znak njene sposobnosti prilagajati se izzivom sodobnega časa. Namreč, v prihodnosti bodo perspektivne lahko le tiste kmečke družine, ki bodo uspele medsebojna razmerja urejati partnersko in solidarno, in si na ta način zagotoviti tudi naslednika ali naslednico. Vztrajanje pri tradicionalnih patriarhalnih vzorcih, ki omejujejo potencialne in individualne težnje posameznikov in posameznic, kot nakazujejo naši rezultati, močno zmanjšujejo, s tem pa tudi ovirajo delovanje kmetijske dejavnosti kot take.

SUMMARY

Generation and gender relations interact with the size of the farm, its orientation, and ownership of the farm, heritage of the farm, type of village and type of locality. These connections are reflected in the intergenerational cooperation in the household, babysitting and taking care of the elders. Respondents are prepared to help the elders, grandchildren, and children as long as it doesn't intervene in their private life. On bigger farms the household work is intergenerational divided and the question of succession is most frequently solved. The question of succession is also frequently resolved on cattle farms and lonely farms as well.

On the farm, work is still traditionally divided on men's work, woman's work and group occupations. Household occupations are still typical woman's work. Our result showed that male members of younger generations are more and more involved in the care for children. As we expected, older generation usually helps younger generations, mostly as babysitters.

Based on the results we assume that marriage, as a value, has lost its meaning, at least when the younger generation is concerned, which slowly takes over the characteristic of modern family or post-modern family. The attitude towards religion is mostly influenced by the type of village, size and orientation of the farm. The church wedding, baptism and church funeral are values that are most important to women above age 46 years old.

Changing relations within farm families in the sense of emphasising mutual partnership and independence from older generation, with still present mutual solidarity, can be valued as a potential persistence of farm population and the characteristic of farm family ability to adjust to the challenges of the modern world. Actually, in the future the perspective farm families can be only those who will succeed in solving mutual relationships in harmony and can assure a successor. According to our results, persistence in traditional patriarchal patterns, that limit potentials and individual tendencies, strongly reduces and also hinders agricultural activity.

VIRI

- Barbič, A. Kmetov vsakdan. Položaj in prihodnost družinskih kmetij na slovenskem. Ljubljana, Cankarjeva založba, 1990, 349 str.
- Barbič, A. Prihodnost slovenskega podeželja. Prostor, prebivalci, gospodarske dejavnosti. Novo mesto, Dolenjska založba, 1991, 266 str.
- Barbič, A. (Samo) obnavljanje kmečkega sloja v Sloveniji. *Sodobno kmetijstvo*, 26(1993)5, 209–217, 26(1993)6, 258–266.

- Černič Istenič, M. Predlog nacionalnega načrta za vključevanje žensk v razvoj podeželja. Ljubljana, Biotehniška fak., Odd. za agronomijo, 2002, 20 str.
- Djurfeldt, G. Defining and operationalizing family farming from sociological perspective. *Sociologia Ruralis*, 36(1996)3, 140–351.
- Dyczewski, L. The family in a transforming society. Lublin. The learned society of the Catholic University of Lublin, 1999, 241 str.
- GGP (Generations and gender programe). Population activities unit. 2004. UNECE United Nations Economic Commission for Europe. http://www.unece.org/ead/pau/pau/pau_framepau.htm (23. maj. 2005).
- Gidakou, I. Young women's attitudes towards agriculture and women's new roles in the Greek countryside: A first approach. *Journal of Rural Studies*, 15(1999)2, 147–158.
- Giddens, A./ Birdsall, K. *Sociology*. 4th edition. Oxford, Blackwell Publishing Company, 2002, 428 str.
- Ilak Peršurič, A.S.. Sociodemografsska reprodukcija obiteljskih gospodarstava Istarske županije. V: *Sociologija sela*. Institut za društvena istraživanja u Zagrebu, 41(2003)159/160, 47–66.
- Kovačič, M. Podjetniške in sociološke značilnosti kmetij v Sloveniji. V: *Učinki reforme slovenske kmetijske politike* (ur.: Erjavec, E./ Juvančič, L.). Domžale, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, 2001, 209–221.
- Macura, M. *Generations and Gender Programme: A Study of the Dynamics of Families and Family Relationships*. Advancing knowledge for policy-making in low-fertility, ageing societies. Geneva, United Nations, Economic Commission for Europe, 2001, 11 str.
- Makarovič, M. Družinsko življenje v luči slovenskega narodopisja. V: *Družina*, Zbornik predavanj in razprav na osrednjih strokovnih prireditvah v Sloveniji v letu družine, Ljubljana, 1994-10-25/26 (ur.: Ramovš, J.). Ljubljana, Inštitut Antona Trstenjaka za psihologijo, logoterapijo in antropohigieno, 1995, 221–261.
- Pentek, M. Stereotipi o značilnostih starejše populacije. *Zdravstveno varstvo*, 38(1999)1–2, 1–4.
- Pinterič, L. Medgeneracijski odnosi in odnosi med spoloma na slovenskih kmetijah. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, 2005, 63 str.
- Sieder, R. *Socialna zgodovina družine*. Ljubljana, Založba ZRC, 1998, 384 str.

NOVA SPOZNANJA O KRMNI VREDNOSTI KRMIL IZ OGRŠČICE IN NJIHOVA UPORABA PRI KRMLJENJU DOMAČIH ŽIVALI

Heinz JEROCH^{a)} in Janez SALOBIR^{b)}

^{a)} Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Ernährungswissenschaften, D-06099 Halle (Saale), prof., dr. dr. h.c., e-pošta: heinzjeroch@hotmail.com.

^{b)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, prof., dr., e-pošta: janez.salobir@bfro.uni-lj.si.

Delo je prispelo 19. oktobra 2006, sprejeto 20. novembra 2006.

Received October 19, 2006, accepted November 20, 2006.

IZVLEČEK

V prispevku je podan pregled krmne vrednosti in uporabe stranskih proizvodov predelave ogrščičnega semena, kot so ogrščične tropine in pogače, v prehrani domačih živali. Podana so spoznanja o vsebnosti in delovanju nekaterih prehransko-fiziološko pomembnih, predvsem antinutritivnih snoveh, ki jih najdemo v ogrščičnem semenu in njegovih stranskih proizvodih, predvsem snovi celične stene, glukozinolati, sinapin in fitinska kislina. Navedeni so podatki o pridelavi ogrščičnih tropin in pogač, o vplivih na njuno kakovost, o hranilni in krmni vrednosti ter uporabi za krmljenje goved, prašičev in perutnine.

Ključne besede: prehrana živali / prežvekovalci / prašiči / perutnina / krma / ogrščične tropine / ogrščične pogače

PRESENT KNOWLEDGE OF FEEDING VALUE AND USE OF RAPESEED BY PRODUCTS IN ANIMAL NUTRITION

ABSTRACT

A review about the feeding value and use of by products of rapeseed oil production as rapeseed meal and rapeseed press cake in the animal nutrition is reviewed. The facts about content and effects of some nutritionally and physiologically important substances like glucosinolates, cell wall components, sinapin and phytic acid are presented. The way of production, the effects on the quality, the nutritive value, the feeding value and the use of rapeseed meal and rapeseed press cake in the nutrition of ruminants, pigs and poultry are discussed.

Key words: animal nutrition / ruminants / pigs / poultry / feed / rapeseed meal / rapeseed press cake

UVOD

Žlahtnitelji ogrščice so v zadnjih desetletjih dosegli odlične rezultate. Z drastičnim zmanjšanjem vsebnosti škodljive eruka kisline v ogrščičnem olju na manj kot 1 % je nastalo za prerano ljudi zelo kakovostno rastlinsko olje. To olje vsebuje poleg velikega deleža oleinske kisline tudi pomemben delež prehransko-fiziološko pomembnih esencialnih maščobnih kislin (MK) linolne (n-6 oz. omega-6) in α -linolenske (n-3 oz. omega-3) pri zelo ugodno ozkem razmerju (2 : 1) med linolno in α -linolensko kislino. Po novih prehranskih priporočilih (D-A-Ch, 2000) naj bi bilo razmerje med omega-6 in omega-3 MK v skupnih zaužitih maščobah vseh starostnih skupin od starosti štirih let naprej do starostnikov vključno z nosečimi in doječimi materami 5:1. V povprečni prehrani je v naših razmerah razmerje precej širše. Redno uživanje

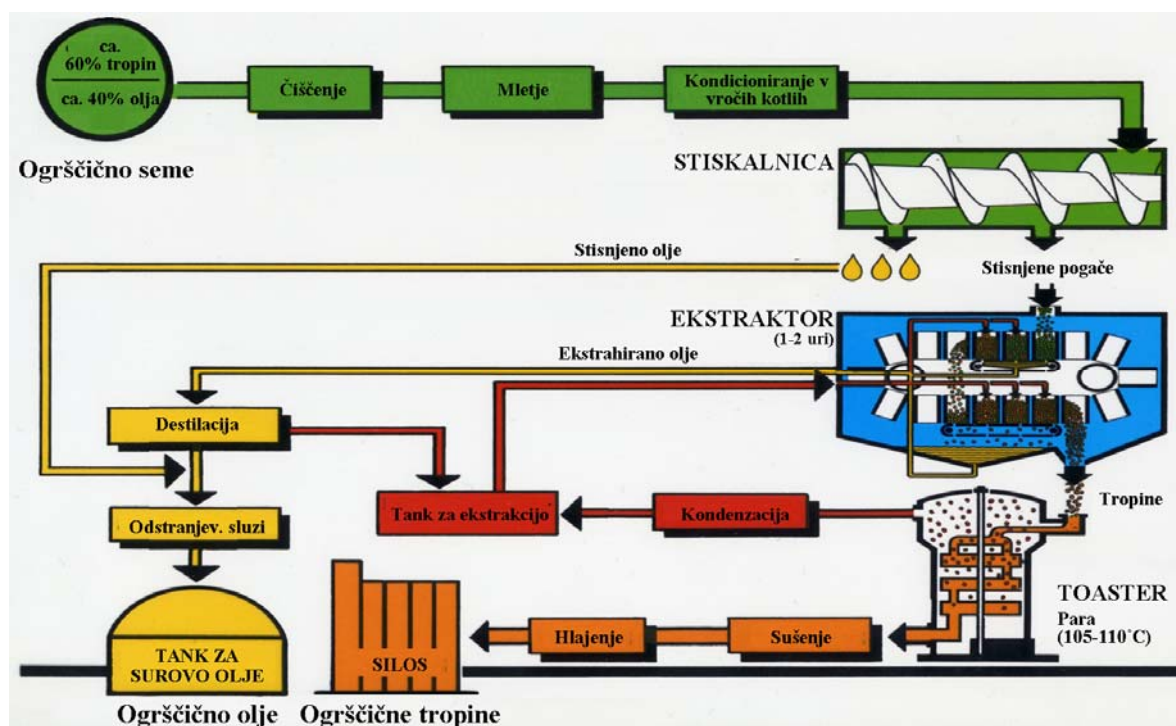
repičnega olja omogoča doseči omenjeno razmerje. Z zmanjšanjem vsebnosti glukozinolatov v ogršičnem semenu so tudi stranski produkti proizvodnje ogršičnega olja (ogršične pogače, ogršični ekspeler, ogršične tropine) postali boljša beljakovinska krmila za neprežvekovalce. Medtem, ko je v konvencionalnih sortah vsebnost glukozinolatov večja od 100 μmol na g semena, vsebujejo nove sorte (označene tudi kot sorte z dvojno ničlo) manj kot 25 μmol na g semena (EU-normativ). Pri sortah ogršičice z dvojno ničlo (00-sorte) pomeni prva ničla brez eruka kisline, druga ničla pa manj kot omenjenih 25 μmol glukozinolatov na g semena.

Kakovostno žlahtnjenje si je pri ogršičici postavilo nove cilje, kako izboljšati krmno vrednost stranskih proizvodov predvsem za neprežvekovalce. K temu sodi nadaljnje zmanjšanje vsebnosti koncentracije glukozinolatov in zmanjšanje deleža semenske luščine (s tem manj vlaknine v ostankih predelave).

V nadaljevanju bomo podali predvsem nova spoznanja o sestavi in krmni vrednosti stranskih proizvodov proizvodnje ogršičnega olja, o vplivih na zagotavljanje kakovosti stranskih proizvodov in podatke o uporabi teh krmil za krmljenje prežvekovalcev, prašičev in perutnine.

STRANSKI PROIZVODI PREDELAVE OGRŠIČNEGA SEMENA IN VSEBNOST NEKATERIH POMEMBNIH SNOVI

Pri proizvodnji olja iz ogršičnega semena se lahko uporabljajo različni postopki. Za doseganje velike izkoristljivosti pridobivanja olja uporabljajo v modernih mlinih za olje prednostno na sliki 1 predstavljen postopek. Večina olja se iz semena odstrani v drugem koraku. Kot stranski proizvod nastanejo z maščobami revne ogršične tropine (OgTr). Za krmno vrednost OgTr je zelo pomemben postopek toastiranja, med katerim pride do pomembne razgradnje glukozinolatov in izboljšanja kakovosti beljakovin OgTr za prežvekovalce. Visoka temperatura med postopkom toastiranja izboljša obstojnost beljakovin v vampu. Zaradi tega se v vampu razgradi manj beljakovin in pride relativno več nerazgrajenih beljakovin v tanko črevo.

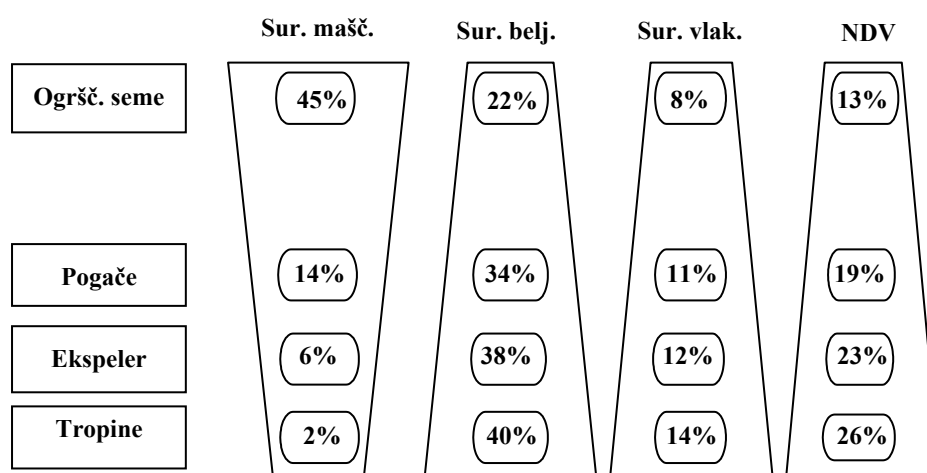


Slika 1. Shema pridelave olja iz ogršičnega semena (Verband Deutscher Ölmühlen).
Figure 1. Scheme of rapeseed oil production (Verband Deutscher Ölmühlen).

Za pridobivanje ogrščičnega olja se lahko uporablja tudi stiskanje. Pri tem je treba ločiti med vročim in hladnim stiskanjem. Hladno stiskanje pride v poštev predvsem pri manjši proizvodnji, kjer se ogrščično olje ne pridobiva za prehranske namene, ampak predvsem za biodizel. Pri tem nastanejo ogrščične pogače (OgPog), ki so z maščobami bogat stranski proizvod (8–20 % surovih maščob – odvisno od intenzivnosti stiskanja). Pri tem postopku proizvodnje olja praktično ne pride do razgradnje glukozinolatov in tudi lastnosti beljakovin ogrščice se ne spremenijo.

V nekaterih modernih stiskalnicah olja uporabljajo dvakratno stiskanje z vsakokratno uporabo kondicioniranja (vroče stiskanje). Kot stranski proizvod nastane ekspeler (OgEks). Vsebnost olja v OgEks je nekje med OgTr in OgPog (slika 2).

Med proizvodnjo olja se spreminja vsebnost hranil v stranskih proizvodih glede na izhodiščni material (ogrščično seme) (slika 2). Medtem, ko se vsebnost maščob v odvisnosti od proizvodnega procesa v različnem obsegu zmanjšuje, se vsebnost ostalih hranil povečuje. Tudi vsebnost antinutritivnih snovi je v stranskih proizvodih večja kot v ogrščičnem semenu, saj jih olje ne vsebuje. Vsebnost hranil, predstavljena na sliki 2, predstavlja srednje vrednosti. Medtem, ko so OgTr predvsem beljakovinsko krmilo, je za OgEks in še bolj za OgPog pomembna tudi vsebnost preostalih maščob.



Slika 2. Spreminjanje vsebnosti hranil med predelavo olja iz ogrščičnega semena (primerjava ogrščičnega semena z ostanki proizvodnje olja) (Jeroch in sod., 1999).

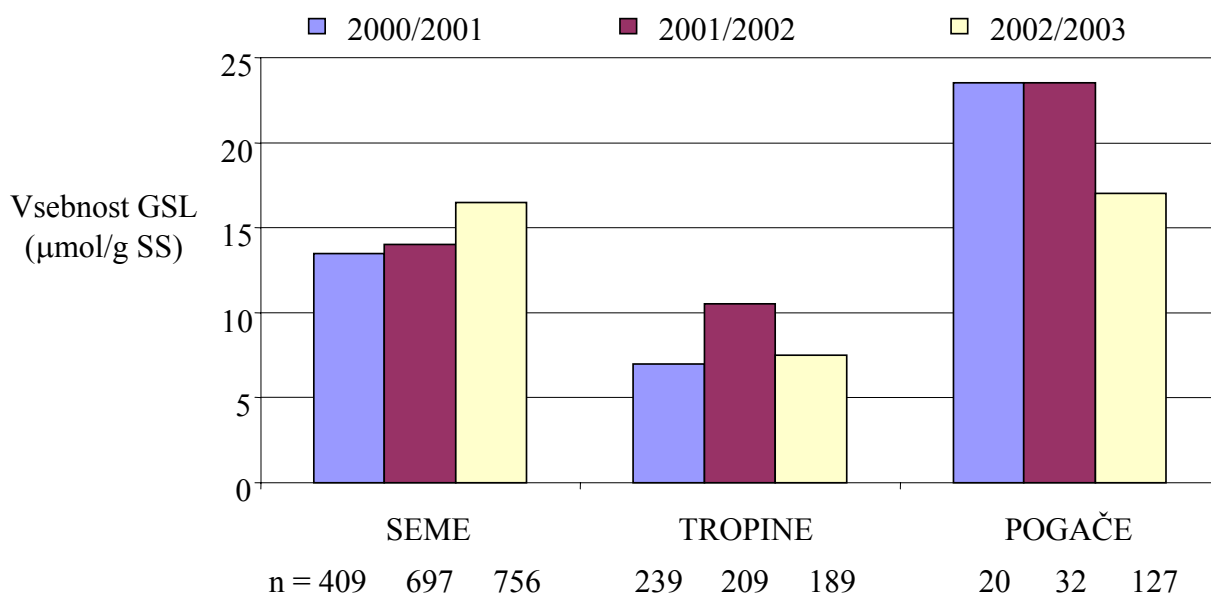
Figure 2. The modification of nutrient composition in by products during the rapeseed oil production (Jeroch *et al.*, 1999).

Ogrščično seme in pri proizvodnji olja nastali stranski proizvodi vsebujejo poleg dragocenih hranil tudi sekundarne snovi, tudi snovi, ki zmanjšujejo vrednost krme (preglednica 1), saj v določenih količinah v obroku lahko delujejo antinutritivno. Pri tem imajo v prehrani neprežvekovalcev največji pomen po postopku predelave preostali glukozinolati. Podatki o vsebnosti glukozinolatov v ogrščičnem semenu, OgTr in OgPog daje večletna nemška raziskava (slika 3). Kakor smo že omenili, toastiranje (slika 1) pomembno zmanjša vsebnost glukozinolatov. Zato je vsebnost glukozinolatov v OgTr manjša kot v ogrščičnem semenu. Prav nasprotno pa se vsebnost glukozinolatov v OgPog glede na ogrščično seme poveča, saj so glukozinolati prisotni v brezmasnem delu semena in pri proizvodnji OgPog ne pride do zmanjšanja njihove aktivnosti.

Preglednica 1. Snovi v ogrščičnem semenu, ki zmanjšujejo njeno krmno vrednost in imajo antinutritivne lastnosti (Jeroch in sod., 2001)

Table 1. The antinutritive substances and the substances that reduce the feeding value of rapeseed (Jeroch *et al.*, 2001)

Snov – skupina snovi	Vsebnost	Delovanje
Snovi celične stene – prehranska vlaknina	145–200 g kg ⁻¹ SS	Zmanjšanje prebavljivosti snovi v celici
(Oligosaharidi)	20–30 g kg ⁻¹ SS	Možne motnje prebavnih procesov zaradi povečane tvorbe plinov
Glukozinolati	5–5 µmol g ⁻¹ SS	Golšavost in negativen vpliv na zauživanje krme in proizvodnost
Sinapin	40–90 g kg ⁻¹ SS	Vonj in okus jajc po ribah zaradi nezmožnosti razgradnega produkta trimetilamina pri nesnicah, ki nosijo jajca z rjavo lupino
Fitinska kislina	37–48 v SS	Vezava makro in mikro elementov, zato slabša izkoristljivost
(Tanini)	20–30 g kg ⁻¹ SS	Zaviranje delovanja proteolitičnih encimov, zato zmanjšanje prebavljivosti surovih beljakovin in aminokislin



Slika 3. Vsebnost glukozinolatov (GSL) v ogrščičnem semenu, tropinah in pogačah (Schumann, 2004).

Figure 3. The glucosinolates (GSL) concentration in rapeseed, rapeseed meal and rapeseed press cake (Schumann, 2004).

Pri krmljenju nesnic je pomembna vsebnost sinapina. Iz te snovi nastane pri mikrobni razgradnji v prebavilih nesnic trimetilamin (TMA), ki se absorbira in se v presnovnih procesih razgradi s pomočjo trimetilaminoksidaze. Nesnice, ki nosijo jajca z rjavo lupino pa pogosto nimajo sposobnosti za tvorbo tega encima. Zato se trimetilamin ne razgradi, ampak se nalaga v jajcih, kar privede do tega, da imajo jajca vonj in okus po ribah. Tudi pri nesnicah jajc z belo lupino so pri velikih količinah TMA ugotovili spremembe vonja in okusa jajc (Jeroch in sod., 2001). Žlahntitelji ogrščice se tem problemom zaenkrat še niso posvetili, čeprav obstajajo med sortami opazne razlike v vsebnosti sinapina (Matthäus in Schumann, 2002). Pri kombinaciji kemične in hidrotermične obdelave krmil iz ogrščice se sinapin večinoma razgradi (Lucht, 1998). S tem je omogočeno tudi krmljenje nesnicam jajc z rjavo lupino.

Vežanost fosforja in drugih snovi v kompleksu fitinske kisline je tako kot v drugih rastlinskih krmilih vzrok za slabo prebavljivost. Z dodajanjem mikrobne fitaze krmnim mešanicam za monogastrične živali pride do razgradnje fitinskega kompleksa, kar omogoča tudi pri ogrščici boljše izkoriščanje organsko vezanih makro (fosfor, kalcij, magnezij) in mikro mineralov (cink, železo).

Koncentracija oligosaharidov in taninov pri sedaj priporočenih količinah v krmnih mešanicah za prašiče in perutnino ne predstavljata problema. Zato sta obe snovi v preglednici 1 navedeni v oklepaju.

Zaradi nezanemarljivo velikega deleža luščin (15–22 %, za primerjavo: sojine tropine 6–8 %; Kracht in sod., 1998, Kracht in sod., 2004) in zaradi njihove kemijske sestave (velika vsebnost lignina) je energijska vrednost stranskih proizvodov ogrščičnega semena manjša. Prav zaradi tega je pri prašičih in perutnini manjša tudi prebavljivost aminokislin. Delež luščin je odvisen od sorte. Semena z rumeno luščino imajo manjši delež luščin kot tiste s temno luščino. Obstajajo tudi tehnične rešitve za zmanjšanje deleža celične stene (t.j. vsebnosti vlaknine) v OgTr in OgPog. V Nemčiji razvit postopek temelji na luščenju semena pred predelavo (Kracht in sod., 1998). To ugodno vpliva na hranilno vrednost in na možnost uporabe (preglednica 2). Medtem ko se delež vlaknine zmanjša, se poveča delež ostalih hranil (npr. surovih beljakovin, aminokislin).

Preglednica 2. Vpliv deleža luščin na vsebnost surove vlaknine, presnovne energije (prašiči) in na precekalno prebavljivost lizina v OgPog in OgTr (Kracht in sod., 2004)

Table 2. The effect of hull on the raw fiber and metabolic energy (pigs) content and on the ileal digestibility of lysine in rapeseed press cake and meal (Kracht *et al.*, 2004)

	Vsebnost surovih beljakovin, g kg ⁻¹ SS	Prebavljivost organske snovi, %	Presnovna energija (MJ kg ⁻¹ SS)	Precekalna prebavljivost lizina, %
OgPog iz:				
– neoluščenega semena	102	74	13,41 (100)	75
– luščenega semena	61	84	15,53 (115)	86
OgTr iz:				
– neoluščenega semena	117	69	11,37 (100)	81
– luščenega semena	72	79	12,97 (114)	84

VPLIV SKLADIŠČENJA NA KRMNO VREDNOST STRANSKIH PROIZVODOV

Med procesom predelave zaradi razbitja celične stene in zmanjšanja vsebnosti vitamina E z odstranjenim oljem lahko pride kvalitativnih sprememb preostalega olja v ogrščičnem ekspelerju

in ogrščičnih pogačah. To pomeni, da lahko pride do senzoričnega in oksidativnega kvarjenja maščob. To negativno vpliva na zauživanje krme, oksidacijski produkti pa lahko zmanjšajo proizvodnost in poslabšajo zdravstveno stanje živali, pa tudi kakovost živalskih proizvodov. Trajanje skladiščenja in temperatura skladiščenja sta pomembna promotorja spremembe kakovosti maščob, ki jih je mogoče ovrednotiti preko treh klasičnih parametrov: jodno število, kislinsko število in peroksidno število (preglednica 3). Visoka temperatura skladiščenja močno poveča negativne spremembe. Pri temperaturi okoli 15 °C sprememb v prvih osmih tednih skoraj ni mogoče zaslediti. Sklep iz te in drugih raziskav je: z maščobami bogate stranske proizvode predelave ogrščičnega semena je potrebno skladiščiti v hladnih prostorih in jih čim prej pokrmiti.

Preglednica 3. Sprememba kazalcev kakovosti maščob med skladiščenjem pri ogrščičnih pogačah (Namestkova in sod., 2005)

Table 3. The modification of some parameters of fat quality during storage in rapeseed press cake (Namestkova *et al.*, 2005)

Čas skladiščenja, tedni	Jodno število		Kislinsko število		Peroksidno število	
	15 °C	24 °C	15 °C	24 °C	15 °C	24 °C
2	91	91	3,1	3,1	4,1	4,3
4	89	89	3,1	3,2	4,3	4,5
6	88	88	3,4	3,6	4,4	4,8
8	87	88	3,8	4,2	4,8	5,1
10	84	87	3,9	4,6	5,1	6,3
12	82	84	4,2	5,7	5,4	7,6
14	78	76	4,8	6,2	6,2	9,1
16	77	74	5,0	6,7	7,1	10,5
18	75	70	6,6	8,6	7,4	11,7
20	74	65	7,2	9,9	8,6	12,6
22	74	63	8,8	11,1	9,1	13,9
24	73	60	9,5	14,5	10,6	16,1

UPORABA OGTR IN OGPOG PRI KRMLJENJU

Stranski proizvodi predelave ogrščičnega semena so dragocena krmila, ki pomembno prispevajo k oskrbi z beljakovinami (aminokislinami) in energijo (še posebej z energijo bogate pogače). Delež v krmnih mešanica oz. obrokih je odvisen predvsem od vrste živali in usmeritve proizvodnje. V Nemčiji se OgTr in OgPog trenutno uporabljajo predvsem pri krmljenju goveda.

Uporaba OgTr in OgPog pri krmljenju goveda

Za oceno kakovosti so pomembni predvsem naslednji parametri:

- vsebnost energije (presnovna energija, neto energija laktacije) na katero vpliva predvsem vsebnost vlaknine in maščob,
- vsebnost maščob (OgPog) in maščobnokislinska sestava (OgPog),
- razgradljivost beljakovin v vampu in delež v vampu nerazgradljivih surovih beljakovin.

Ker se glukozinolati v vampu razgradijo, ta skupina snovi za prežvekovalce kot antinutritivna snov nima pomena. Tudi druge antinutritivne snovi, kot sta fitinska kislina in sinapin se pod vplivom mikrobnih encimov v vampu razgradijo. Za uporabo OgTr pri krmljenju visokoproduktivnih krav je zelo pomembno, da sodi to krmilo v skupino krmil, ki imajo največji delež beljakovin, stabilnih v vampu (preglednica 4). OgTr so glede na ta pomembni kriterij kakovosti beljakovin umeščene na enako raven kot sojine tropine. Zaradi omejene mikrobne

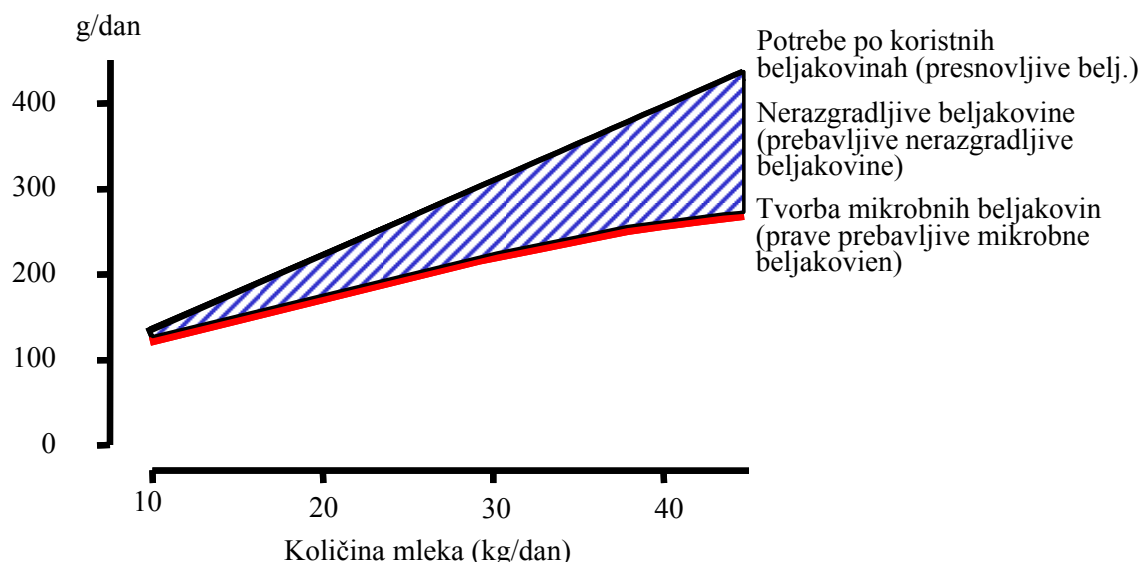
sinteze beljakovin v predželodcih prežvekovalcev je za mlečne krave z visoko proizvodnostjo delež prebavljivih nerazgradljivih beljakovin za oskrbo z beljakovinami zelo pomemben. Potrebe po koristnih beljakovinah (presnovljivih beljakovinah), to je količina pravih prebavljivih beljakovin, ki je v tankem črevesu na voljo za prebavo, so lahko pokrite le, če se določen del beljakovin krme v vampu ne prebavi (slika 4).

Preglednica 4. Razgradljivost surovih beljakovin v vampu (%) v različnih krmilih (GfE, 1995; Südekum in sod., 2001)

Table 4. Ruminal raw protein degradability (%) of different feedstuffs (GfE, 1995; Südekum *et al.*, 2001)

65	75	85
Suha zelena krma Sojine tropine Ogrščične tropine	Koruzna silaža Ogrščične pogače	Travna silaža Grah Pšenica

V zadnjih letih so v Nemčiji opravili več raziskav z visoko produktivnimi kravami s ciljem delne ali popolne zamenjave sojinih tropin (SoTr) z ogrščičnimi tropinami. Kot primer so v preglednici 5 predstavljeni rezultati ene od raziskav, v kateri so primerjali ogrščične in sojine tropine kot edino beljakovinsko krmilo. Rezultati kažejo, da so ogrščične tropine lahko v obroku edino beljakovinsko krmilo. Pri tem je treba upoštevati, da imajo ogrščične tropine v primerjavi s sojinimi tropinami manjšo vsebnost neto energije za laktacijo (NEL) oz. presnovne energije (ME) (SoTr: 8,63 MJ NEL in 13,75 MJ ME kg⁻¹ suhe snovi, OgTr: 7,31 MJ NEL in 11,99 MJ ME kg⁻¹ suhe snovi (Jeroch in sod., 1999)). V vseh ostalih raziskavah pri enako visoki mlečnosti prav tako niso ugotovili razlik v proizvodnosti pri živalih, ki so kot beljakovinsko krmilo dobile sojine ali ogrščične tropine (Spiekers in Südekum, 2004). Tudi pri pitanju bikov je mogoče sojine tropine popolnoma nadomestiti z ogrščičnimi tropinami (preglednica 6).



Slika 4. Povezava med potrebami krave po koristnih (presnovljivih) beljakovinah in tvorbo mikrobnih beljakovin v odvisnosti od mlečnosti (RodehutsCORD in Kluth, 2001).

Figure 4. The relationship between metabolisable protein requirements and microbial protein synthesis in connection to milk yield (RodehutsCORD and Kluth, 2001).

Preglednica 5. Rezultati raziskave z visoko produktivnimi kravami s popolno zamenjavo sojinih tropin z ogrščičnimi tropinami v obroku (Kluth in sod., 2003)

Table 5. The exchange of rapeseed meal for soybean meal in high yielding cows (Kluth *et al.*, 2003)

	Sojine tropine kot beljakovinsko krmilo	Ogrščične tropine kot beljakovinsko krmilo
Količina mleka, kg/kravo/dan	40,0	40,5
Vsebnost maščob v mleku, %	3,79	3,85
Vsebnost beljakovin v mleku, %	3,34	3,34
Mlečnost korigirana na vsebnost energije, kg/kravo/dan	38,8	39,6
Sečnina v mleku, mg/kg	265	247

Povprečna mlečnost v predhodnih laktacijah: 10 400 kg mleka s 3,88 % maščob in 3,48 % beljakovin
 Osnovna krma: koruzna silaža, ovela travna silaža, silirani koruzni storži, pivske tropine
 Krmna mešanica: ječmen in sojine tropine oz. ogrščične tropine, mineralno krmilo z vitamini

Uporaba ogrščičnih pogač v prehrani goved je odvisna v prvi vrsti od vsebnosti maščob, saj naj vsebnost maščob v suhi snovi obroka ne bi bila večja od 5 %. Višja vsebnost nenasičenih maščob vpliva negativno na mikrofloro v vampu in pri tem še posebej na razgradnjo ogljikovih hidratov celične stene. Z vključevanjem ogrščičnih pogač v obrok se maščobnokislinska sestava mlečnih maščob spremeni v korist nenasičenih maščobnih kislin. Zaradi tega postane maščobnokislinska sestava masla prehransko fiziološko ustrežnejša, saj vsebuje predvsem več oleinske in manj palmitinske kisline, poleg tega pa se izboljša njegova mazavost. Te prednosti krmljenja ogrščičnih pogač pri kravah molznicah se v nekaterih predelih Nemčije uporabljajo za izboljšanje kakovosti masla (Schöne in sod., 2000). Nova priporočila za krmljenje OgTr in OgPog pri prežvekovalcih podaja preglednica 7.

Preglednica 6. Primerjava sojinih in ogrščičnih tropin kot beljakovinskega krmila pri krmljenju bikov (Spann in Stark, 2001)

Table 6. The comparison of soybean meal and rapeseed meal as protein feeds in fattening bulls (Spann and Stark, 2001)

	SoTr	SoTr/OgTr	OgTr
Zauživanje krme, kg suhe snovi na dan *			
– beljakovinsko krmilo	0,9	0,5/0,5	1,1
– koruzno zrnje	1,6	1,7	1,5
– koruzna silaža	5,5	5,9	5,7
Skupno zauživanje suhe snovi krme, kg/žival/dan **	8,4	8,8	8,6
Dnevni prirast, g/žival	1340	1390	1340

* Območje žive mase: 210–660 kg

** Vključno s slamo in mineralnim krmilom

Preglednica 7. Priporočila za krmljenje OgTr in OgPog prežvekovalcem (Schöne in sod., 2002, Spiekers in Südekum, 2004)

Table 7. The recommended upper limit for rapeseed meal and rapeseed press cake inclusion in ruminant nutrition (Schöne *et al.*, 2002, Spiekers and Südekum, 2004)

	Zgornja meja, % SS obroka		Zgornja meja, g/žival/dan	
	OgTr	OgPog	OgTr	OgPog
Teleta	5	5	50–100	50–100
Krave molznice	15	10	2000–3500	1500–2500
Goveji pitanci	15	10	900–1800	600–1200
Plemenske ovce	10	10	100–200	100–200

Uporaba OgTr in OgPog pri krmljenju prašičev in perutnine

Za oceno kakovosti OgTr in OgPog so pomembni predvsem naslednji parametri:

- vsebnost surovih beljakovin,
- aminokislinska sestava surovih beljakovin,
- prebavljivost aminokislin in vsebnost prebavljivih aminokislin,
- vsebnost maščob in maščobnokislinska sestava (OgPog),
- vsebnost presnovne energije,
- vsebnost glukozinolatov in sinapina (nesnice).

Preglednica 8. Vsebnost skupnega lizina (bruto) in prebavljivega lizina pri prašičih v nekaterih žitih in beljakovinskih krmilih (Jeroch in sod., 1999; GfE, 2005)

Table 8. The total and digestible lysine concentration in some grains and in protein feedstuffs (Jeroch in sod., 1999; GfE, 2005)

	Skupni lizin g kg ⁻¹ SS		Prebavljivost lizina %		Prebavljivi lizin g kg ⁻¹ SS	
	Tritikala	4,8	(100)	84	(100)	4,0
Ječmen	4,3	(90)	73	(83)	3,1	(80)
Pšenica	3,9	(88)	88	(105)	3,4	(86)
Sojine tropine	31,2	(100)	87	(100)	27,1	(100)
Ogrščične tropine	22,2	(71)	73	(84)	16,2	(60)
Grah	17,0	(54)	84	(97)	14,2	(52)
Sončnične tropine	13,5	(43)	77	(89)	10,4	(38)

Opozoriti je potrebno predvsem na dva parametra:

- V primerjavi s sojinimi tropinami (SoTr), ki so trenutno glavno beljakovinsko krmilo v krmnih mešanica za prašiče in perutnino, je prebavljivost aminokislin (AK) pri OgTr in OgPog manjša. Za ponazoritev je v preglednici 8 predstavljena prebavljivost lizina v žitih

in beljakovinskih krmilih. Pomemben vzrok za manjšo prebavljivost aminokislin v OgTr in OgPog v primerjavi s SoTr je večja vsebnost vlaknine (snovi celične stene). Z luščenjem ogrščičnega semena pred proizvodnjo olja, ki privede do opaznega zmanjšanja vsebnosti vlaknine v OgTr in OgPog (preglednica 2), se izboljša prebavljivost aminokislin obeh krmil iz ogrščice in doseže raven v SoTr (preglednica 8). Pri sestavljanju krmnih mešanic oz. obrokov z OgTr in OgPog je zato potrebno upoštevati manjšo prebavljivost aminokislin.

- Drug pomemben parameter je vsebnost glukozinolatov, ki bo v poglavju o krmljenju prašičev še posebej obravnavana.

Krmljenje prašičev

Čeprav se je vsebnost glukozinolatov v ogrščičnem semenu zaradi žlahtnjenja znatno zmanjšala, je njihova sedanja vsebnost v OgTr in OgPog za obseg vključevanja v krmne mešanice še vedno pomembna. Glede na raziskave, ki sta jih ovrednotila Schöne in Weiß (2004), prenesejo pitanci največ 2 mmola glukozinolatov na kg popolne krmne mešanice. Pri večjih koncentracijah glukozinolatov pride do zmanjšanja zauživanja krme in posledično do počasnejše rasti. Ob tem pride do povečanja ščitnice, kar je jasen dokaz, da glukozinolati motijo delovanje ščitnice. V preglednici 9 so prikazani rezultati pitovnega poskusa, kjer je bila omenjena mejna vrednost za glukozinolate prekoračena. Podobna mejna vrednot za vsebnost glukozinolatov velja tudi za plemenske svinje. Pri pujskih pa je negativen učinek na rast mogoče zaznati že pri manjših vrednostih. Da bi preprečili negativen vpliv glukozinolatov na maso in delovanje ščitnice je načelno potrebno pri krmljenju OgTr in OgPog povečati oskrbo z jodom. Pri pitancih je potrebna količina joda med 0,2 do 0,3 mg na kg popolne krmne mešanice, pri plemenskih svinjah pa 1 mg na kg popolne krmne mešanice. Te vrednosti predstavljajo dvakratno običajno priporočeno količino joda.

Preglednica 9. Vpliv vsebnosti glukozinolatov v krmi za prašiče pitance na zauživanje krme, prirast in izkoriščanje krme (Tischendorf in sod., 1998)

Table 9. The effect of glucosinolates on feed intake, weight gain and feed conversion in fattening pigs (Tischendorf *et al.*, 1998)

Ogrščične pogače, % v mešanici	0	7,5	15
Glukozinolati, mmol/kg krme	0	1,6	3,2
Zauživanje krme, kg/žival/dan	2,39 (100)	2,34 (98)	2,26 (95)
Prirast, g/žival/dan	779 (100)	786 (101)	718 (92)
Izkoriščanje krme, kg/kg	3,08	2,99	3,17

Na podlagi rezultatov mnogih krmilnih poskusov v zadnjih dvajsetih letih, še posebej nemških, so v preglednici 10 predstavljena priporočila za maksimalen delež v krmnih mešanicah. Priporočila upoštevajo nihanja v vsebnosti glukozinolatov v OgTr in OgPog. Pri OgPog je potrebno upoštevati tudi vsebnost maščob. Da bi lahko izključili negativen vpliv na kakovost (konzistenca) maščob zaklanih prašičev, vsebnost ogrščičnega olja v krmnih mešanicah za pitance ne sme preseči 3 %. Pri tem deležu v krmno mešanico ne smemo dodajati drugih rastlinskih olj.

Preglednica 10. Priporočila za maksimalen delež (%) ogrščičnih tropin (OgTr) in ogrščičnih pogač (OgPog) v popolnih krmnih mešanica za prašiče

Table 10. The recommended upper limit for rapeseed meal and rapeseed press cake inclusion in pig nutrition

	LFFFS (2005)		Schöne in sod.(2002), Schöne in Weiß (2004)	
	OgTr	OgPog	OgTr	OgPog
Pujski	0	0	0	0
Pitovni prašiči:				
– začetno pitanje	8	5	10	7
– končno pitanje	8	5	10	5
Plemenske svinje:				
– breje	4	4	5	5
– doječe	3	3	5	5

Navedene priporočene vrednosti so se v praksi izkazale kot dobre. Pri pujskih zaradi že omenjene velike občutljivosti na glukozinolate uporaba OgTr in OgPog ni priporočljiva. Primere krmnih mešanic za pitance podaja preglednica 11.

Preglednica 11. Primer krmnih mešanic za pitance z ogrščičnimi tropinami

Table 11. An example of feed mixtures with rapeseed meal for fattening pigs

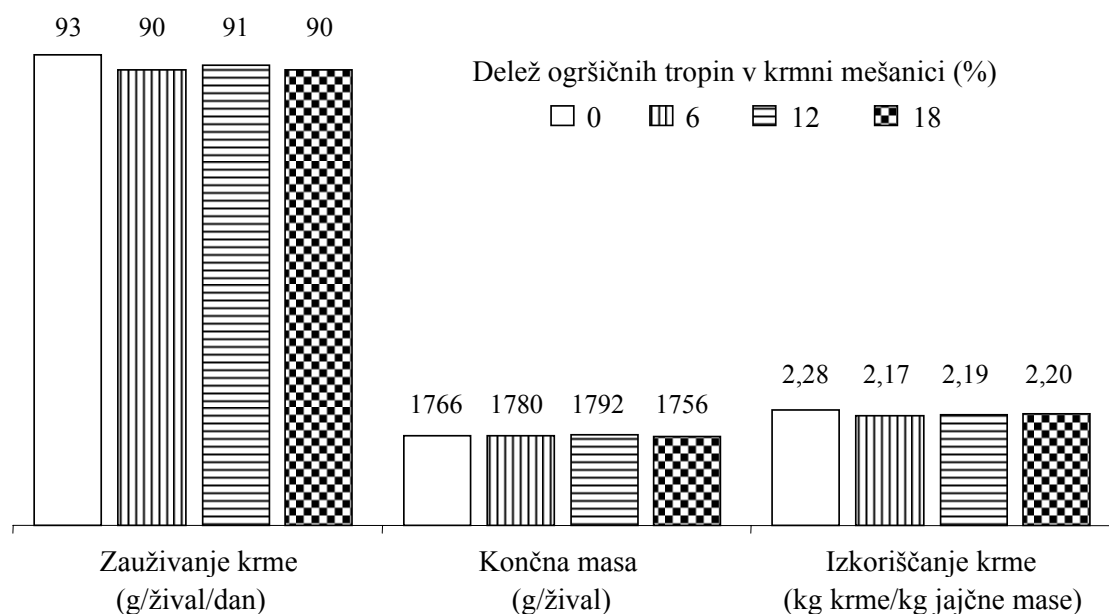
	Začetno pitanje (30–70 kg TM)	Končno pitanje (70–115 kg TM)
Ječmen, %	35,50	43,19
Pšenica, %	39,70	39,50
Ogrščične tropine, %	10,00	10,00
Sojine tropine, %	10,00	3,00
Ogrščično olje, %	2,00	2,00
L-lizin-HCl, %	0,30	0,31
Mineralno krmilo z jodom, %	2,50	2,00

Krmljenje perutnine

Vsebnost glukozinolatov omejuje uporabo OgTr in OgPog tudi v krmnih mešanica za perutnino. Poleg tega obeh krmil zaradi že omenjene vsebnosti sinapina ne smemo uporabljati pri krmljenju nesnic jajc z rjavo lupino. To ne velja le v primeru, če se sinapin s pomočjo kombinirane kemično-hidrotermične obdelave razgradi.

Priporočila za največjo priporočljivo vsebnost OgTr in OgPog v krmnih mešanica za perutnino so predstavljena v preglednici 12. Tudi ta priporočila so podana na osnovi številnih raziskav. Kot primer so v preglednici 13 in na sliki 5 predstavljeni rezultati raziskave na nesnicah in rastočih piščancih. OgTr z zelo majhno vsebnostjo glukozinolatov (nova sorta z

glukozinolati revne jare ogrščice v Kanadi) ne kažejo negativnega vpliva na proizvodnost nesnic jajc z belo lupino celo pri 20 % deležu v popolni krmni mešanici. Nasprotno pa je pri uporabi 20 % OgTr z normalno vsebnostjo glukozinolatov opaziti nekoliko povečan pogin (poškodbe jeter). Kot prikazuje slika 5 pri rastočih piščancih tudi pri 18 % OgTr v krmni mešanici ni opaziti negativnih posledic.



Slika 5. Rezultati raziskave z ogršičnimi tropinami pri pitanju rastočih piščancev (Schlöffel in sod., 1993).

Figure 5. The results of an experiment with rapeseed meal in broilers (Schlöffel *et al.*, 1993).

Zaradi zahtev po energijsko bogatih krmnih mešanicah ogršične pogače boljše zadovoljijo to zahtevo. Vymola in sod. (1995) so z vključevanjem 5, 10 oz. 15 % ogršičnih pogač v krmno mešanico za rastoče piščance v primerjavi s kontrolno skupino brez OgPog dosegli boljše rezultate. Na podlagi teh raziskav ocenjujejo, da je mejna vsebnost glukozinolatov 4 mmol na kilogram popolne krmne mešanice. Tudi rezultati, dobljeni pri počasneje rastočih piščancih francoske provenience T 451 N label kažejo, da 15 % ogršičnih pogač v krmni mešanici nima negativnega vpliva na pitovne lastnosti in klavno kakovost (Peter in Dänicke, 2003).

Preglednica 12. Priporočila za maksimalen delež (%) ogršičnih tropin (OgTr) in ogršičnih pogač (OgPog) v popolnih krmnih mešanicah za perutnino

Table 12. The recommended upper limit for rapeseed meal and rapeseed press cake inclusion in poultry nutrition

	Jeroch in Dänicke (2006)		Kirchgeßner (2004)
	OgTr	OgPog	OgTr
Nesnice *	10	10	15
Rastoči piščanci	15	15	15
Pitovni purani	5	5	ni podatka

* – pri nesnicah jajc z rjavo lupino 0 %

Preglednica 13: Vpliv ogrščičnih tropin z zelo majhno vsebnostjo in normalno vsebnostjo glukozinolatov na proizvodnost nesnic (Campbell in sod., 1999)

Table 13. The effect of rapeseed meal with low and normal glucosinolates content on productivity of layers (Campbell *et al.*, 1999)

Vsebnost glukozinolatov, mmol/kg	1,8			10–15	
	0	10	20	10	20
Delež ogrščičnih tropin, %	0	10	20	10	20
Zauživanje krme, g/žival/dan	102	101	99	100	100
Nesnost, %	90	89	90,5	91	89
Izkoriščanje krme, kg/kg jajčne mase	1,95	1,91	1,87	1,88	1,89
Izgube, %	0	0,8	0	1,2	3

Primere krmnih mešanic z ogrščičnimi tropinami za nesnice jajc z belo lupino podaja preglednica 14.

Preglednica 14. Primeri krmnih mešanic z ogrščičnimi tropinami za nesnice jajc z belo lupino.

Table 14. An example of feed mixtures with rapeseed meal for white shell egg layers.

	Primer		
	1	2	3
Koruza		12,00	30,48
Pšenica	45,43	37,00	27,00
Ječmen	20,00	11,93	
Sojine tropine	8,20	7,50	11,00
Sončnične tropine		2,00	
Koruzni lepek			4,36
Ogrščične tropine	10,00	10,00	10,00
Lucernina moka			3,00
Mesno-kostna moka ¹	3,00	5,00	
Rastlinsko olje	2,00	4,00	5,00 (mešanica olj)
Loj ¹	1,45		
Mineralno krmilo	8,39	10,57 ²	9,17 ²
Premiks	1,53		

¹Uporaba v EU prepovedana

²z dodanimi mikro minerali in vitamini

ZAKLJUČKI

a. Krmljenje prežvekovalcev

- Beljakovine OgTr nimajo slabše kakovosti kot beljakovine soje. Sojine tropine je mogoče tudi pri zelo veliki mlečnosti zamenjati z OgTr (potrebna je energijska izravnava).

- Vključevanje ogrščičnih pogač je zaradi omejitve glede skupne vsebnosti maščob v obroku v prvi vrsti odvisno od vsebnosti maščob v posamezni šarži.
- Olje v ogrščičnih pogačah lahko spremeni maščobnokislinsko sestavo mlečnih maščob (več oleinske, manj dolgoverižnih nasičenih maščobnih kislin), kar ima za posledico boljšo prehransko vrednost mleka in mlečnih izdelkov ter dobro mazavost masla.

b. Krmljenje prašičev

- Vključevanje OgTr je v prvi vrsti odvisno od vsebnosti glukozinolatov. Ta je odvisna od njihove vsebnosti v semenu in od tehnologije predelave.
- Vsebnost preostalih maščob (olja) v ogrščičnih pogačah zelo variira. Zato je uporaba pogač zelo odvisna ne le od vsebnosti glukozinolatov, ampak tudi od vsebnosti preostalih maščob (olja).
- V primerjavi s sojinimi tropinami je prebavljivost aminokislin manjša. To je potrebno upoštevati pri pripravi receptur.

c. Krmljenje perutnine

- Tudi pri perutnini je vsebnost glukozinolatov najpomembnejši parameter pri vključevanju.
- Pri nesnicah jajc z rjavo lupino se, zaradi negativnih vplivov trimetilamina (nastane iz sinapina) na senzorične lastnosti, ne sme krmiti nobenih krmil iz ogrščice.
- Tako kot pri prašičih je pri pripravi receptur potrebno upoštevati prebavljivost aminokislin.

d. Žlahtnjenje rastlin

- Vsebnost glukozinolatov bi bilo potrebno še bolj zmanjšati. Pri jari ogrščici (Kanada) obstajajo že sedaj sorte z zelo majhno vsebnostjo.
- Relativno velik delež luščin in opazna vsebnost lignina v vlakninski frakciji ogrščičnih luščin vplivajo na prebavljivost in energijsko vrednost. Sorte z majhnim deležem luščin so zato z vidika krmne vrednosti proizvodov predelave ogrščičnega semena boljše. Z novimi sortami z rumenimi luščinami je mogoče zadovoljiti tej zahtevi.
- Zaradi prevlade nesnic konzumnih jajc z rjavo lupino si žlahtnitelji želijo opaznega zmanjšanja vsebnosti sinapina.

VIRI

- Campbell, L. D./ Slominski, B. A./ Falk, K. C./ Wang, Y. Low glucosinolate canola in laying hen diets. V: Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, 1999-19-26/29. Canberra, Australia, 1999, 276.
- D-A-Ch. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Umschau Braus GmbH, Verlagsgesellschaft Frankfurt am Main, 2000, 240 str.
- GfE (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie), Ausschuß für Bedarfsnormen. Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere. Nr. 6 Masttiere. Frankfurt am Main, DLG-Verlags-GmbH, 1995, 92 str.
- GfE (Gesellschaft für Ernährungsphysiologie). Standardised precaecal digestibility of amino acids in feedstuffs for pigs – methods and concepts. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology, DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt am Main, 2005, 185–205.
- Jeroch, H./ Kracht, W./ Danicke, S. Feeding value of rape products and its improvement for broilers and laying hens. European Journal of Lipid Science and Technology, 103(2001), 7–11.
- Jeroch, H./ Drochner, W./ Simon, O. Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., 1999, 510 str.

- Jeroch, H./ Seskeviciene, J./ Mikulioniene, S. Futterwertbeeinflussende Inhaltsstoffe in Rapssamen und Nebenprodukten der Rapsverarbeitung. Erster Litauisch-Deutscher Rapstag-Tagungsbeiträge, Kaunas, Litauische Landwirtschaftliche Universität, 2001, 20–23.
- Jeroch, H./ Dänicke, S. Faustzahlen zur Geflügelfütterung. V: Geflügeljahrbuch 2006. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., 2006, 143–176.
- Kluth, H./ Engelhard, T./ Rodehutschord, M. Zum Ersatz von Sojaextraktionsschrot durch Rapsextraktionsschrot in der Fütterung der Hochleistungskuh. Heft 20, Öl- und Proteinpflanzen – Oil 2002, UFOP-Schriften, 2003, 173–179.
- Kracht, W./ Jeroch, H./ Keller, T./ Matzke, W./ Dänicke, S./ Kluge, H./ Keller, K./ Böttcher, W./ Hennig, U./ Schumann, W./ Matthäus, B./ Köhler, T./ Deicke H. D. Futterwert von Extraktionsschrot aus geschälter Rapssaat für Mastschweine, Ferkel, Broiler und Legehennen. UFOP-Schriften 10, 1998, 9–74.
- Kracht, W./ Dänicke, S./ Kluge, H./ Keller, K./ Matzke, W./ Hennig, U./ Schumann, W. Effect of dehulling of rapeseed on feed value and nutrient digestibility of rape products in pigs. Arch. Anim. Nutr., 58(2004), 389–404.
- LFFFS (Landesarbeitskreis Futter und Fütterung im Freistaat Sachsen). Futtermittelspezifische Restriktionen – Rinder, Schafe, Ziegen, Pferde, Kaninchen, Schweine, Geflügel. 2. Auflage, stark erweitert und überarbeitet, Thieme Druck Belgern, 2005.
- Lucht, H. W. Reduction of glucosinolates and sinapine in rapeseed by technical treatment: Description of the technical procedure and effectiveness evaluation. V: Proc. of the third international workshop on “Antinutritional factors in legume seed and rapeseeds”. EAAP Public. No. 93, Wageningen Press, 1998, 433–435.
- Matthäus, B./ Schumann, W. Untersuchungen zu Gehalten an nutritiven und antinutritiven Substanzen in Raps in Abhängigkeit von Anbaujahr und Sorte. Heft 20 Öl- und Faserpflanzen, UFOP-Schriften, 2002, 67–72.
- Namestkova, P./ Cermak, B./ Lad, F./ Mikolajczak, J./ Jeroch, H. The influence of storage on the nutrient content and the fat quality parameters of rape cake. V: Tagungsbeiträge 3. Litauisch-Deutscher Öl- und Proteinpflanzentag, 2005-05-26. Litauen, Kaunas-Akademija, 2005, 95–97.
- Peter, W./ Dänicke, S. Untersuchungen zum Rapskucheneinsatz in der Fütterung langsam wachsender „Label“, Broiler. Arch. Geflügelk., 67(2003), 253–260.
- Rodehutschord, M./ Kluth, H. Rapsprodukte als Futtermittel für Wiederkäuer. V: Erster Litauisch-Deutscher Rapstag-Tagungsbeiträge, 2001-05-28. Kaunas, Mai Litauische Landwirtschaftliche Universität, 2001, 24–29.
- Schumann, W. Glucosinolatgehalte in Rapsextraktionsschrot und Rapskuchen. V: 8. Tagung Schweine- und Geflügelnahrung, Halle-Wittenberg, Martin-Luther-Universität, Landwirtschaftliche Fakultät, Institut für Ernährungswissenschaften, 2004-11-23/25, Lutherstadt Wittenberg, 2004, 96–98.
- Spann, B./ Stark, G. Sojaschrot durch Rapsschrot ersetzen? Veredlungs-Produktion, 2(2001), 38–40.
- Spiekers, H./ Südekum, K. H. Einsatz von 00-Rapsextraktionsschrot beim Wiederkäuer. UFOP-Praxisinformation. Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen, 2004: www.ufop.de (30. avgust 2006).
- Schlöffel, J./ Jeroch, H./ Seffner, W./ Jahreis, G. Getoastetes Rapsextraktionsschrot im Broilermastfutter. Arch. Anim. Nutr., 45(1993), 79–87.
- Schöne, F./ Hummert, K./ Hartung, H./ Meixner, B./ Kirchheim, U./ Kinast, C./ Greiling, A./ Bretschuh, G. Qualitätskette zur Erzeugung eines ernährungsphysiologisch hochwertigen Milchfettes und der entsprechenden Butter. Züchtungskunde, 72(2000), 359–370.
- Schöne, F./ Kirchheim, H./ Lüdke, H./ Richter, G./ Graf, T. Standpunkt zur Verwertung von Rapskuchen in der Thüringer Landwirtschaft. Jena/Deutschland, Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, 2002.
- Schöne, F./ Weiß, J. Rapsextraktionsschrot und Rapskuchen in der Schweinefütterung. UFOP-Praxisinformation. Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen, 2004: www.ufop.de (30. avgust 2006).
- Südekum, K. H./ Nibbe, D./ Steingass, H./ Spiekers, H./ Lebzien, P. Untersuchungen zum Umfang und zur Geschwindigkeit des ruminalen Abbaus von Raps- und Sojaextraktionsschroten. 113. VDLUFA-Kongreß Berlin, 2001, 115.
- Tischendorf, F./ Kirchheim, U./ Leiterer, M./ Schöne, F. Beurteilung von Rapskuchen im Experiment mit wachsenden Schweinen. Proc. Soc. Nutr. Physiol., 7(1998), 44.
- Verband Deutscher Ölmühlen. Unterrichtsmaterial, Schwerpunkt OO-Raps.
- Vymola, J./ Kodes, A./ Obadalek, J. Repkove vylicky ve vykrmu brojlerovych kurat. Zivocisna vyroba 40(1995), 407–409.

THE EFFECT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID ON THE GROWTH OF WEANED PIGLETS

Miran KASTELIC^{a)} and Drago KOMPAN^{b)}

^{a)} Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Zootechnical Dept, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenia, Ph.D.

^{b)} Same address as ^{a)}, Ph.D., Ass. Prof.

Received October 04, 2006, accepted December 01, 2006.

Delo je prišlo 04. oktobra 2006, sprejeto 01. decembra 2006.

ABSTRACT

The effect of conjugated linoleic acid (CLA) on growth parameters of sixteen piglets, divided into two groups was studied. The experiment started when the piglets were 29 days old. Prior the age of 39 days animals were fed restrictively on the same amount of feed, independent of the weight of animal. During the next period of the experiment, between ages of 40 and 75 days, the animals were fed individually, with 1.8 times of maintenance energy. Animals were weighed every week. The experimental group was fed extra with supplement of 1.5% of 80% CLA. The same amount of sunflower oil was used in the control group. During the last period of the experiment, between ages of 76 and 123 days, animals were fed *ad libitum* with feed without any CLA or sunflower supplement. CLA decreased average feed consumption and weight of the animals. All observed differences were found in the third or last period of the experiment, after the administration of CLA or sunflower oil was finished.

Key words: pigs / weaned piglets / growth / animal nutrition / feed / feed additives / conjugated linoleic acid / CLA

UČINEK KONJUGIRANE LINOLENSKE KISLINE NA RAST OSTAVLJENIH PUJSKOV

IZVLEČEK

Proučevali smo učinek konjugirane linolenske kisline (CLA) na rast šestnajstih pujskov, razdeljenih v dve skupini. Poskus se je začel pri starosti 29 dni. Do 39. dne starosti so bili pujski krmljeni restriktivno z enako količino krme neodvisno od telesne teže. V naslednjem obdobju poskusa od 40 do 75 dne starosti so pujski dobivali krmo, ki je imela 1,8 kratno individualno določeno vzdrževalno energijo. Težo živali smo ugotavljali vsak teden. Poskusna skupina je dobivala dodatno 1.5 % CLA s 80 % čistostjo. Živali kontrolne skupine so dodatno dobivale enako količino sončničnega olja. V zadnjem ali tretjem obdobju poskusa med 76 in 123 dnevi starosti smo živali krmili po volji s krmo brez dodatka CLA ali sončničnega olja. Dodatek CLA je zmanjšal povprečno težo in porabo krme. Vse razlike med skupinama so nastale šele v tretjem obdobju poskusa, ko živali niso več dobivale CLA ali sončničnega olja.

Ključne besede: prašiči / odstavljeni pujski / rast / prehrana živali / krma / krmni dodatki / konjugirana linolenska kislina / CLA

INTRODUCTON

CLA or conjugated linoleic acid is a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid. It is a product of the fermentation in rumen and known as a rumen acid. Because of moderate or low rate of fermentation in alimentary tract of monogastric animals, low

concentrations or undetectable levels of CLA are found in its products i.e. in meat and milk of monogastric animals. The natural source of CLA in human nutrition is meat (body tissue) and milk of ruminants.

Many different effects of CLA on human or animal organisms were found. CLA caused fat deposition in many experiments. Lower fat deposition was found in groups fed with CLA in pigs (Ostrowska *et al.*, 1999, Thiel-Cooper *et al.*, 2001), hamsters (Bouthegeouard *et al.*, 2002), rabbits (Corino *et al.*, 2002), mice (Terpstra *et al.*, 2002), rats (Azain *et al.* 2002) and in the experiment of Poulos *et al.* (2001) in female but not in male rats.

The effect on body growth is not so clear. Wiegard *et al.* (2002) found higher growth rate and better feed conversion ratio in pigs. The experiment on rats showed no effect on growth rate (Azain *et al.* 2002). Bee (2000) fed pregnant and milking sows and piglets after weaning with supplement of CLA in experimental and linoleic acid in the control group up to the age of 70 days. Piglets, which suckled milk enriched with CLA grew faster in the first period to weaning than the control group. In the period after weaning the supplement of CLA in piglets feed didn't have such a positive effect on daily gain and feed conversion ratio. In long term experiment between 40 kg and 100 kg in the first group and 40 kg and 130 kg in the second group, Lauridsen *et al.* (2005) found tendency for increased daily gain and better feed conversion in two groups, fed with supplement of 0.5% CLA comparing to the control group with supplement of sunflower oil. In the experiment with added CLA and nutritive antibiotic neither CLA alone nor CLA in combination with nutritive antibiotics affected the gain of pigs (Weber *et al.*, 2001). In this study, the unclear correlations between CLA supplement in feed and growth performances (daily gain, daily feed consumption and feed conversion ratio) were studied. Due to unclear results and limited number of growth experiments done in pigs and other domestic animals, we decided to investigate the effect of CLA on growth of weaned piglets in our experiment.

MATERIAL AND METHODS

Sixteen piglets of Slovenian Landrace breed from the same litter were introduced in the experiment. Animals were full sibs. Half of them were male castrates and the other half were females. Because of such a large litter, ten animals stayed in mother litter together with other brothers and sisters, but the other six were moved to other litters. They were weaned at the age of nineteen days. On the weaning day they were weighed and housed in individual cages. Animals were divided into experimental and control group. Each group of eight animals consisted of four females and four male castrates. The design of the experiment is shown in Table 1.

Ten days after weaning the animals were fed *ad libitum* on prestarter (feed 1) with 13.5 MJ ME, 18% CP and 12.5 g Lysine per kg of feed. In the next period (age between 28 and 75 days), the animals were fed on the same feed, but on different regimes. At the age of 29 days, animals were weighed and average body weight was calculated. The average maintenance energy for animals according to DLG (Energie- und Nährstoffbedarf ..., 1987) was calculated:

$$MaE = (754 - 5.9BM + 0.025BM^2)BM^{0.75} [kJ/day]$$

where:

MaE = maintenance energy in kJ/day,

BM = body mass in kg.

Animals were fed on 1.8 times of maintenance energy. The same level of feed for all animals in experiment decreased individual differences in body mass. In the next period of the experiment at the age between 40 and 75 days, animals were fed on 1.8 times of maintenance energy on individual basis. Animals were weighed every week and maintenance energy was

calculated on individual basis. The experimental group of animals was fed with 1.2% supplement of pure CLA on feed basis. Because the purity of CLA was only 80%, the supplement was 1.5% on feed basis. The control group was fed on supplement of 1.5% of sunflower oil. In the last period of experiment at the age between 76 and 123 days animals were kept individually and fed on the same feed (feed 2) *ad libitum* without any supplement. Feed 2 contained 12.8 MJ ME, 16.5% CP and 10.11 g Lysine per kg of feed. Like the previous period, animals were weighed in regular time periods.

Table 1. The design of the experiment
Preglednica 1. Načrt poskusa

Age starost	Age interval starostni interval		Feed krma
0		Birth/rojstvo	
19	age 0 to 19 days/ starost od 0 do 19 dni	weaning to indiv. pen, weighing odstav. individ. boks, tehtanje	
28	age 19 to 28 days/ starost od 19 do 28 dni	weighing / tehtanje	feed 1 <i>ad libitum</i> krma 1 po volji
39	age 29 to 39 days/ starost od 12 do 39 dni	weighing / tehtanje	feed 1 group restricted krma 1 skupinsko omejeno
47		weighing / tehtanje	
54	age 40 to 75 days/ starost od 40 do 75 dni	weighing / tehtanje	feed 1 individual restricted + supplement
61		weighing / tehtanje	
68		weighing / tehtanje	krma 1 individualno omejeno + dodatek
75		weighing / tehtanje	
92		individual 2, weighing / tehtanje	
99	age 76 to 123 days/ starost od 76 do 123 dni	weighing / tehtanje	
106		weighing / tehtanje	feed 2 <i>ad libitum</i> / krma 2 po volji
113		weighing / tehtanje	
123		weighing / tehtanje, end of experiment, konec poskusa	

The 1.8 times of maintenance energy was chosen because of experiences from some other experiments. That quantity of feed was eaten without feed waste by all animals in experiments of Rezar *et al.* (2003) and Pajk *et al.* (2006). The same growth rate proportional to body mass is expected at each animal.

The observed data were evaluated with two statistical models:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + W_{ij} + A_{ik} + e_{ijkl} \quad \text{model 1}$$

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + W_{ij} + S_k + e_{ijkl} \quad \text{model 2}$$

where Y_{ijkl} is an observed independent variable, μ is an average value of model, T_i is the treatment group – CLA and control group, W_{ij} is treatment day within treatment, S_k is the sex of animal (female, castrated male), A_{ik} is the effect of animal within group and e_{ijk} is the rest for t -th measurement of k -th sex j -th measurement and i -th treatment. Statistical evaluations were done with SAS/STAT procedure of SAS 8.02.

RESULTS AND DISCUSSION

Results of analysis of variance according to the models 1 and 2 are shown in Table 2. All studied traits were statistically significantly explained in both models, but the proportion of explained variance differed depending on the model. The trait weight of animals was explained in both models with very high coefficient of determination (R^2). It was 0.9940 in model 1 and 0.9869 in model 2. The experiment was done in the period of intensive growth and the weight of animals increased ten times. The weight of animals was not influenced only by age. The effect of treatment with CLA / control on body weight was statistically significant in both models. Body weight of animals was influenced also by sex in model 2 and by animal within treatment in model 1.

Comparing the weight of animals, the daily gain was much less explained with the two models. The coefficient of determination was 0.7944 in model 1 and 0.7791 in model 2. It can be concluded that both models explained daily gain with the same power, especially because model 1 used 13 degrees of freedom more for minor increase of coefficient of determination (0.0153). Differences in daily gain in the whole experimental period were not found. The largest part of variance was explained with individual differences inside treatment (model 1) or with age of animals within treatment (model 2).

Both models poorly explained feed conversion ratio. In model 1, the coefficient of determination was 0.4412 and in model 2 it was only 0.3940. The pattern of significance was the same as in the previous trait, but the coefficient of determination in model 1 was much larger than in model 2.

In the Table 3, the LSMs for the effect treatment are presented. Weight of animals was significantly larger in the control group than in the CLA group. Other traits (daily gain and feed conversion ratio) were not significantly different. Some trends for larger daily gain and feed conversion ratio in control group were found. During the whole period, no advantages of CLA supplement in feed were found.

In the Table 4 LSMs for traits weight, daily gain and feed conversion ratio in both models are presented. This effect is significant only in model 2, but the LSMs show the same pattern. At the beginning of the experiment animals of CLA group were larger than the control group, but the difference was not significant. Differences in daily gain were not prior the age of 68 days. In the last or fifth week of experimental period between 68 and 75 days of age, the fastest growth of CLA group was found. At the end of the period the animals from CLA group were heavier than the control group (28.08 vs. 26.29 kg), but the difference was not significant. Animals were fed restrictively and better feed conversion ratio was found in CLA group. The difference was not significant.

In the last period of experiment, after administration of CLA, the control group started to grow faster than CLA group. In that period all animals were fed *ad libitum*. In periods between ages 76 to 92, 73 to 99, 100 to 106, 107 to 113 and 114 to 123 days, the control group ate 0.88, 1.45, 1.64, 1.84, 2.31, 2.49 kg feed daily comparing to the control group, where the daily feed consumption was 0.87, 1.155, 2.13, 2.25, 2.57 and 2.58 kg. Daily feed consumption was, except in the period between 76 and 92 days, much larger in the control group. The consequence of larger feed consumption was faster growth in almost all periods of the last experimental period. At the last weighing at the age of 123 days, the control group was by 3.5 kg heavier. Larger daily gain of the control group decreased feed conversion ratio, but differences between groups were not statistically significant.

Table 2. Results of analysis of variance according to models 1 and 2
 Preglednica 2. Rezultati analize variance po modelih 1 in 2

	Model					Treatment Tretman		Age (Treatment) Starost (Tretman)		Animal (treatment) Žival (tretman)	
	df model df model	df error df ostaneč	F ratio F količ.	P	R ²	df	P	df	P	df	P
Model 1											
Weight / teža	37	145	644.98	<.0001	0.9940	1	0.0030	14	<0.0001	22	<0.0001
Daily gain /dnevni prirast	37	145	14.14	<.0001	0.7944	1	0.8367	14	0.6588	22	<0.0001
Feed conversion ratio / konverzija krme	33	116	2.78	<.0001	0.4412	1	0.6885	14	0.7680	18	<0.0001
	Model					Treatment Tretman		Age (Treatment) Starost(Tretman)		Sex Spol	
Model 2	df model df model	df error df ostaneč	F ratio F količ.	P	R ²	df	P	df	P	df	P
Weight / teža	24	158	497.71	<0.0001	0.9869	1	0.0060	22	<0.0001	1	0.0110
Daily gain /dnevni prirast	24	158	23.22	<0.0001	0.7791	1	0.7199	22	<0.0001	1	0.4619
Feed conversion ratio / konverzija krme	20	129	4.19	<0.0001	0.3940	1	0.6708	18	<0.0001	1	0.8741

Table 3. LSM values and statistical significance for weight, daily gain and feed conversion ratio for effect treatment according to models 1 and 2

Preglednica 3. LSM vrednosti in statistična verjetnost za težo, dnevni prirast in konverzijo krme za vpliv tretmana po modelih 1 in 2

	CLA	Control Kontrola	P
Model 1			
Weight / teža	31.54	32.29	0.0030
Daily gain /dnevni prirast	0.582	0.587	0.8367
Feed conversion ratio / konverzija krme	2.11	2.16	0.6885
Model 2			
Weight / teža	31.51	32.47	0.0060
Daily gain /dnevni prirast	0.580	0.589	0.7199
Feed conversion ratio / konverzija krme	2.13	2.18	0.6708

Table 4. LSM values and statistical significance for weight, daily gain, and daily feed consumption and feed conversion ratio for effect age within treatment in models 1 and 2 respectively

Preglednica 4. LSM vrednosti in statistična verjetnost za težo, dnevni prirast, dnevno konzumacijo in konverzijo krme za vpliv starost znotraj tretmama po modelih 1 in 2

	Age starost	Weight / teža			Daily gain Dnevni prirast			Feed conversion ratio Konverzija krme		
		CLA	control kontrola	P	CLA	control kontrola	P	CLA	control kontrola	P
		CLA	kontrola	P	CLA	kontrola	P	CLA	kontrola	P
Model 1										
3	28	7.77	7.35	0.6091	0.099	0.101	0.9834			
4	39	11.51	11.03	0.5676	0.340	0.335	0.9546			
5	47	14.13	13.13	0.2310	0.328	0.263	0.4140	1.76	2.15	0.3072
6	54	16.77	16.06	0.3900	0.378	0.418	0.6135	1.74	1.50	0.5412
7	61	20.47	19.06	0.0906	0.529	0.429	0.2134	1.38	1.78	0.3097
8	68	23.38	23.00	0.6518	0.415	0.563	0.0650	2.78	1.41	0.0006
9	75	28.08	26.29	0.0329	0.672	0.470	0.0125	1.41	2.08	0.0857
10	92	39.31	41.46	0.0140	0.746	0.973	0.0069	2.05	1.58	0.2410
11	99	44.94	48.67	<0.0001	0.804	1.028	0.0077	2.38	2.12	0.5306
12	106	49.40	53.60	<0.0001	0.692	0.701	0.9140	2.69	2.96	0.5326
13	113	56.90	59.24	0.0097	1.079	0.803	0.0016	2.12	3.37	0.0035
14	123	65.83	68.63	0.0032	0.901	0.957	0.5323	2.80	2.67	0.7641
Model 2										
3	28	7.77	7.35	0.7164	0.099	0.101	0.9832			
4	39	11.51	11.03	0.6848	0.340	0.335	0.9543			
5	47	14.13	13.13	0.3943	0.328	0.263	0.4106	1.76	2.15	0.3009
6	54	16.77	16.06	0.5413	0.378	0.418	0.6109	1.74	1.50	0.5360
7	61	20.47	19.06	0.2283	0.529	0.429	0.2100	1.38	1.78	0.3035
8	68	23.38	23.00	0.7486	0.415	0.563	0.0630	2.78	1.41	0.0005
9	75	28.08	26.29	0.1281	0.672	0.470	0.0118	1.41	2.08	0.0816
10	92	39.31	41.85	0.0375	0.746	0.977	0.0053	2.05	1.61	0.2634
11	99	44.94	49.06	0.0008	0.804	1.032	0.0060	2.38	2.15	0.5743
12	106	49.28	53.99	0.0002	0.685	0.705	0.8098	2.74	2.99	0.5568
13	113	56.78	59.64	0.0234	1.073	0.807	0.0021	2.17	3.40	0.0032
14	123	65.71	69.23	0.0074	0.894	0.961	0.4473	2.85	2.72	0.7517

Faster growth of treated animals as in the last period of second or experimental period between ages 69 and 75 days was found also in experiments of Wiegard *et al.* (2002), Lauridsen *et al.* (2005) and Bee (2000). No effect on growth would not be a surprise, because in experiment on rats (Azain *et al.*, 2002) and on pigs (Weber *et al.*, 2001) no effect of CLA on growth rate was found. Due to of different periods of treatment and different ages, the exact comparisons are not possible. CLA can influence growth of animals at different ages or in different conditions in different ways. Larger daily feed consumption and consequently faster growth of the control group in "post treatment" period cannot be explained with the results from this experiment.

SUMMARY

The supplement of CLA in feed affected body growth and body composition in many studies. In this study, the effect of CLA on body weight, daily gain and daily feed consumption and feed conversion in three periods was studied. In the first or adapting period animals were fed on regular starter feed. In the second or experimental period a 1.5% of supplement of mixture of fatty acids with 80% of CLA was added to feed (experimental group). The control group was fed on extra dosage of 1.5% sunflower oil added to feed. This part of experiment started at the age of 40 days. The experimental period was 35 days long. In the third experimental period animals were fed on regular feed without any supplement. The period started at the age of 75 days and lasted for 48 days to the age of 123 days. At the beginning of the second period, after administration of CLA started, no effect on studied variables was found. At the age of 75 days, after 5 weeks of supplementation of CLA, a positive effect on growth rate and body weight was found. In the third period of experiment at the age between 75 and 123 days, faster growth of the control group which was never fed on CLA was found. The fast growth of the control group was a consequence of increased daily feed consumption and not a result of better feed utilization. Feed conversion ratio and daily gain were influenced more by individual differences between animals (model 1) or sex of the animals (model 2) than by the treatment with CLA.

SKLEPI

V mnogih raziskavah so ugotovili učinek konjugirane linolenske kisline (CLA) na rast in sestavo telesa. V tej raziskavi smo proučevali učinek CLA na telesno težo, dnevni prirast, dnevno konzumacijo in konverzijo krme v treh obdobjih. V prvem obdobju ali obdobju prilagajanja smo krmili živali z navadnim starterjem. V drugem, poskusnem obdobju so dobivali prašiči poskusne skupine krmo z dodatkom 1,5 % mešanice maščobnih kislin z 80 % CLA. Kontrolna skupina je dobivala 1,5 % sončničnega olja. Ta del poskusa se je začel pri starosti 40 dni. Trajal je 35 dni. Tretje obdobje poskusa se je začelo pri starosti 75 dni in je trajalo 48 dni do starosti 123 dni. Na začetku drugega obdobja poskusa, po začetku dodajanja CLA, nismo odkrili nobenega učinka te snovi. Pri starosti 75 dni po petih tednih dodajanja CLA smo opazili pozitiven učinek na hitrost rasti in težo živali. V tretjem obdobju poskusa, pri starosti od 75 do 123 dni, je rasla hitreje kontrolna skupina. Tej skupini nismo nikoli dodajali CLA. Hitrejša rast te skupine je bila posledica večje konzumacije ne pa boljšega izkoriščanja krme. Na izkoriščanje krme so bolj vplivale individualne razlike med živalmi (model 1) ali spol (model 2) kot pa dodajanje CLA.

REFERENCES

- Azain, M.J./ Hausman, D.B./ Sisk, M.B./ Flatt, W.P./ Jewell, D.E. Dietary conjugated linoleic acid reduces adipose tissue cell size rather than cell number. *J. Nutr.*, 130(2000), 1548–1554.
- Bee, G. Dietary conjugated linoleic acid consumption during pregnancy and lactation influences growth and tissue composition of weaned pigs. *J. Nutr.*, 130(2000), 2981–2989.
- Bouthegouard, J.C./ Even, P./ Gripois, D./ Tiffon, B./ Blouquit M.F./ Roseau, S./ Lutton, C./ Tome, D./ Martin, J.C. A CLA mixture prevents body triglyceride accumulation without affecting energy expenditure in Syrian hamsters. *J. Nutr.*, 132(2002), 2682–2689.
- Corino, C./ Mourot, J./ Magni, S./ Pastorelli, G./ Rosi, F. Influence of dietary conjugated linoleic acid on growth, meat quality, lipogenesis, plasma leptin and physiological variables of lipid metabolism in rabbits. *J. Anim. Sci.*, 80(2002), 1020–1028.
- Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere. Nr. 4 Schweine. Frankfurt am Main, DLG-Verlag, 1987, 158 p.

- Lauridsen, C./ Mu, H./ Henckel, P. Influence of dietary conjugated linoleic acid (CLA) and age at slaughtering on performance, slaughter- and meat quality, lipoproteins, and tissue deposition of CLA in barrows. *Meat Sci.*, 69(2005), 393–399.
- Ostrowska, E./ Muralitharam, M./ Cross, R.F./ Bauman, D.E./ Dunshea, F.R. Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. *J. Nutr.*, 129(1999), 2037–2042.
- Pajk, T./ Rezar, V./ Levart, A./ Salobir, J. Efficiency of apples, strawberries and tomatoes for reduction of oxidative stress in pigs as a model for humans. *Nutr.*, 22(2006), 376–384.
- Poulos, S.P./ Sisk, M./ Hausman, D.B./ Azain, M.J./ Hausman, G.J. Pre- and postnatal dietary conjugated linoleic acid alters adipose development, body weight gain and body composition in Sprague-Dawley rats. *J. Nutr.*, 131(2001), 2722–2731.
- Rezar, V./ Marinšek-Logar, R./ Ješe Janežič V./ Pajk, T./ Salobir, K./ Orešnik, A., /Salobir, J. Wheat bran and oat bran effectively reduce oxidative stress induced by high-fat diets in pigs. *Ann. Nutr. Met.*, 47(2003)1, 78–84.
- Terpstra, A.H.M./ Beynen, A.C./ Everts, H./ Kocsis, S./ Katan, M.B./ Zock, P.L. The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy loss in the excreta. *J. Nutr.*, 132(2002), 940–945.
- Thiel-Cooper, R.L./ Parrish, F.C./ Sparks, J.C./ Wiegard, B.R./ Ewan, R.C. Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.*, 79(2001), 1821–1828.
- Weber, T.E./ Schinckel, A.P./ Hauseknecht, K.L./ Richert, B.T. Evaluation of conjugated linoleic acid and dietary antibiotics as growth promotion in weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 79(2001), 2542–549.
- Wiegard, B.R./ Sparks, J.C./ Parrish, F.C./ Zimmerman, D.R. Duration of feeding conjugated linoleic acid influences growth performance, carcass traits, and meat quality of finishing barrows. *J. Anim. Sci.*, 80(2002), 637–643.

Acta agriculturae Slovenica

Letnik 88

Ljubljana, december 2006

Številka 2

SUBJECT INDEX BY AGROVOC DESCRIPTORS

PREDMETNO KAZALO PO DESKRIPTORJIH AGROVOC

Tomaž BARTOL ^{a)}

^{a)} Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Agronomy Dept., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, Assoc.Prof., Ph.D., M.Sc., e-mail: tomaz.bartol@bf.uni-lj.si.

amino acids	83–89	growth	133–141
anaerobiosis	75–81	horses	83–89
animal feeding	133–141	hydrogenation	75–81
animal husbandry	91–100	inheritance (economics)	101–116
animal production	91–100	linoleic acid	75–81, 133–141
bacteria	75–81	meat production	91–100
casein	83–89	microbial ecology	65–73
coagulation	83–89	microbiology	65–73, 75–81
econometric models	91–100	milk	83–89
elasticity	91–100	molecular genetics	65–73
families	101–116	nucleotide sequence	83–89
farm structure	101–116	nutritive value	117–131
farms	101–116	oilseed cakes	117–131
feed consumption	133–141	piglets	133–141
feed intake	133–141	polymorphism	65–73, 83–89
genetic variation	83–89	pork	91–100

poultry	117–131	ruminants	117–131
proximate composition	117–131	sex	101–116
quality	117–131	social values	101–116
rapeseed meal	117–131	supply	91–100
rflp	65–73	swine	91–100, 117–131, 133–141
rumen	75–81	weight	133–141

Acta agriculturae Slovenica

Letnik 88

Ljubljana, december 2006

Številka 2

SUBJECT INDEX BY AGRIS CATEGORY CODES

VSEBINSKO KAZALO PO PREDMETNIH KATEGORIJAH AGRIS

Nataša SIARD^{a)}

^{a)} Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Zootechnical Dept., Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenia, Ph.D., M.Sc.,
e-mail: natasa.siard@bfro.uni-lj.si.

Rural sociology – E50: 101–116

Consumer economics – E73: 91–100

Animal feeding – L02: 133–140

Animal genetics and breeding – L10: 83–89

Animal physiology – Nutrition – L51: 75–81

Feed composition – Q54: 117–131

Acta agriculturae Slovenica

Letnik 88

Ljubljana, december 2006

Številka 2

ABECEDNO KAZALO AVTORJEV

AUTHOR'S INDEX

Št. No.	Avtor Author	Stran primarnega prispevka Page of the primary source
1.	BARTOL Tomaž	141–142
2.	ČEPELJNIK Tadej	75–81
3.	ČERNIČ-ISTENIČ Majda	101–116
4.	DEVILLARD Estelle	75–81
5.	DOVČ Peter	83–89
6.	ERJAVEC Emil	91–100
7.	HOBOR Sebastijan	83–89
8.	JENKO Janez	91–100
9.	JEROCH Heinz	117–131
10.	KASTELIC Miran	133–140
11.	KOMPAN Drago	133–140
12.	KUNEJ Tanja	83–89
13.	LENASI Tina	83–89
14.	PINTERIČ Lucija	101–116
15.	SALOBIR Janez	117–131
16.	SIARD Nataša	143
17.	STRES Blaž	65–73
18.	VRTAČNIK Jernej	101–116

NAVODILA AVTORJEM

Prispevki

Sprejemamo izvirne znanstvene članke, predhodne objave in raziskovalne notice s področja zootehnike (genetika, mikrobiologija, imunologija, prehrana, fiziologija, ekologija, etologija, mlekarstvo, ekonomika, živalska proizvodnja in predelava živalskih proizvodov, tehnologija in dokumentalistika) v slovenskem in angleškem jeziku, znanstveno pregledne članke samo po poprejšnjem dogovoru. Objavljamo tudi prispevke, podane na simpozijih, ki niso bili v celoti objavljeni v zborniku simpozija. Če je prispevek del diplomskega, magistrskega ali doktorskega dela, navedemo to in tudi mentorja na dnu prve strani. Navedbe morajo biti v slovenskem in angleškem jeziku.

Pri prispevkih v slovenskem jeziku morajo biti preglednice, grafikoni, slike in priloge dvojezični, povsod je slovenščina na prvem mestu. Naslovi grafikonov in slik so pod njimi. Slike in grafikoni so v besedilu. Priloženi morajo biti tudi jasno označeni izvorniki slik (fotografije ali ločene grafične datoteke). Na avtorjevo željo jih vračamo. Grafikoni morajo biti črno-beli, brez rastrov. Dovoljeni so vzorci v črno-beli kombinaciji. Latinske izraze pišemo ležeče. V slovenščini uporabljamo decimalno vejico, v angleščini decimalno piko. Prispevki v angleščini morajo imeti povzetek v slovenščini in obratno.

Prispevki naj bodo strnjeni, kratki, največ 12 strani. Uporabljamo Microsoft Word 97 ali novejšo verzijo (Windows); pisava v besedilu in preglednicah je Times New Roman, velikost črk 12, v obsežnih preglednicah je lahko 10, pisava v grafikonih in slikah je Ariel, velikost črk najmanj 9, pisava za primerjave nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij je Courier; zunanji rob 2,0 cm, notranji 2,5 cm, zgoraj živa *pagina* v eni vrstici, velikost črk 10 z avtorjem oz. avtorji in naslovom prispevka, zaključenim s piko. Če je naslov daljši, ga smiselno okrajšamo. Primera: Štuhec, I. in Siard, N. Obnašanje prašičev. Stibilj, V. in sod. Določitev maščobno-kislinske sestave ... vzorcev mleka v Sloveniji.

Prva stran

Na prvi strani prispevka na desni strani označimo vrsto prispevka v slovenščini in angleščini, sledi naslov prispevka, pod njim avtorji. Ime avtorjev navedemo v polni obliki (ime in priimek). Vsak avtor naj bo označen z indeksom, ki ga navedemo takoj pod avtorji, in vsebuje polni naslov ustanove ter znanstveni in akademski naslov; vse v jeziku prispevka. Navedemo sedež ustanove, kjer avtor dela. Če je raziskava opravljena drugje, avtor navede tudi sedež te inštitucije. Na željo avtorjev bomo navedli naslov elektronske pošte.

Pod naslovi avtorjev je datum prispetja in datum sprejetja prispevka, ki ostaneta odprta. Sledi razumljiv in poveden izvleček z do 250 besedami. Vsebuje namen in metode dela, rezultate, razpravo in sklepe. Sledijo ključne besede.

Izvlečku v jeziku objave sledi naslov in izvleček s ključnimi besedami v drugem jeziku.

Predlogo za pomoč pri oblikovanju prve strani prispevka najdejo avtorji na domači strani: <http://aas.bfro.uni-lj.si/predloga-aas.dot>.

Viri

V besedilu navajamo v oklepaju avtorja in leto objave: (priimek, leto). Če sta avtorja dva, pišemo: (priimek in priimek, leto), če je avtorjev več, pišemo: (priimek in sod., leto). Sekundarni vir označimo z »navedeno v« ali »cv.«. Seznam virov je na koncu prispevka, neoštevilčen in v abecednem redu. Vire istega avtorja, objavljene v istem letu, razvrstimo kronološko z a, b, c. Primer: 1997a. Navajanje literature naj bo popolno: pri revijah letnik, leto, številka, strani; pri

knjigah kraj, založba, leto, strani. Za naslove revij je dovoljena uradna okrajšava, za okrajšanimi besedami naj bodo vedno pike. Navedbo zaključimo s piko. Nekaj primerov:

Fraser, A.F./ Broom, D.M. Farm animal behaviour and welfare. London, Bailliere Tindall, 1990, 437 str.

Hvelplund, T. Protein evaluation of treated straws. V: Evaluation of straws in ruminant feeding (ur.: Chenost, M./ Reiniger, A.). London, Elsevier Applied Science, 1989, 66–74.

Stekar, J.M.A. Vsebnost makro elementov v slovenski mrvi. V: Posvetovanje o prehrani domačih živali »Zdravčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 1997-10-27/28. Murska Sobota, Živinorejsko-veterinarski zavod za Pomurje, 1997, 105–117.

Stekar, J.M.A./ Golob, A./ Stibilj, V./ Koman Rajšp, M. Sestava in hranilna vrednost voluminozne krme v letu 1990. Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljubl., Kmet. Živin., 58(1991), 149–155.

Stekar, J.M.A./ Pen, A. Sadržaj natriuma, cinka i mangana u stočnoj hrani sa travnatih površina. Agrohemija, 21(1980)1–2, 7–15.

Oddaja

Avtorji prispevke oddajo v dveh izvodih, enega z dvojnimi razmikom med vrsticami in največ 35 vrstic na strani, in na disketi. Priložijo tudi izjavo s podpisami vseh avtorjev, da avtorske pravice v celoti odstopajo reviji.

Prispevke recenziramo in lektoriramo. Praviloma pošljemo mnenje prvemu avtorju, po želji lahko tudi drugače. Če urednik ali recenzenti predlagajo spremembe oz. izboljšave, vrne avtor popravljeno besedilo v 10 dneh v dveh izvodih, enega z dvojnimi razmikom. Ko prvi avtor vnese še lektorjeve pripombe, odda popravljeno besedilo v enem izvodu in na disketi ter vrne izvod z lektorjevimi popravki.

Prispevke sprejemamo vse leto.

NOTES FOR AUTHORS

Papers

We publish original scientific papers, preliminary communications and research statements on the subject of zootechny (genetics, microbiology, immunology, nutrition, physiology, ecology, ethology, dairy science, economics, animal production, technology and information science) in Slovenian and English languages while scientific reviews are published only upon agreement. Reports presented on conferences that were not published entirely in the conference reports can be published. If the paper is a part of diploma thesis, master of science thesis or dissertation, it should be indicated at the bottom of the front page as well as the name of mentor. All notes should be written in Slovenian and English language.

Papers in Slovenian language should have tables, graphs, figures and appendices in both languages, Slovenian language being the first. Titles of graphs and figures are below them. Figures and graphs are part of the text. Clearly marked original figures should be added (photographs or separate graphic files); they can be returned upon request. Latin expressions are written in italics. Decimal coma is used in Slovenian and decimal point in English. Papers in English should contain abstract in Slovenian and *vice versa*.

The papers should be condensed, short and should not exceed 12 pages. Microsoft Word 97 or later version (Windows) should be used, fonts Times New Roman, size 12 in text and tables (in large tables size 10 is allowed), Ariel for graphs and figures (letter size at least 9) and Courier for nucleic- and amino acid sequence alignments should be used; right margin 2.0 cm, left margin 2.5 cm; *pagina viva* in one line, size 10, author(s) and abbreviated title of the paper ending with a full stop. Examples: Štuhec, I. and Siard, N. Pig Behaviour. Stibilj, V. *et al.* Determination of fatty acids composition ... milk samples in Slovenia.

First page

The type of the paper should be indicated on the first page on the right side in Slovenian and English language following by title of the paper and authors. Full names of authors are used (first name and surname). Each name of the author should have been added an index, which is put immediately after the author(s), and contains address of the institution and academic degree of the author, in the language of the paper. The address of the institution in which the author works is indicated. If the research was realised elsewhere, the author should name the headquarters of the institution. E-mail is optional.

Under the address of the authors some space for dates of arrival and acceptance for publishing should be left. A comprehensive and explicit abstract up to 250 words follows indicating the objective and methods of work, results, discussion and conclusions. Key words follow the abstract.

The abstract in the language of the paper is followed by the title, abstract and key words in another language.

Help instructions for first page design can be found on home page:
<http://aas.bfro.uni-lj.si/template-aas.dot>.

References

References should be indicated in the text by giving author's name, with the year of publication in parentheses, e.g. (surname, year). If authors are two, the following form is used: (surname and surname, year). If authors are several, we use (surname *et al.*, year). Secondary literary sources should be quoted in the form "cited in". The references should be listed at the

end of the paper in the alphabetical order and not numbered. If several papers by the same author and from the year are cited, a, b, c, etc. should be put after the year of the publication: e.g. 1997a. The following form of citation is used: for journals volume, year, number, page; for books place of publication, publisher, year, pages. For journals official abbreviated forms can be used. A full stop should be put after the abbreviated words. Each reference is also closed by a full stop. Examples:

- Fliegerová, K./ Pažoutová, S./ Hodrová, B. Molecular genotyping of rumen fungi based on RFLP analysis. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljubl., Kmet. Zooteh.*, 72(1998), 95–98.
- Fraser, A.F./ Broom, D.M. *Farm animal behaviour and welfare*. London, Bailliere Tindall, 1990, 437 p.
- Hvelplund, T. Protein evaluation of treated straws. In: *Evaluation of straws in ruminant feeding* (Eds.: Chenost, M./ Reiniger, A.). London, Elsevier Applied Science, 1989, 66–74.
- Ristič, M./ Klein, F.W. Schlachtkoerperwert von Broilern verschiedener Herkunft. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt fuer Fleischforschung, Kulmbach*, 101(1988), 8045–8051.
- Stekar, J.M.A. Silage effluent and water pollution. In: *6th International Symposium "Animal Sciences Days"*, Portorož, 1998-09-16/18, Slovenia. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljubl., Kmet. Supl.*, 30(1998), 321–325.

Delivery

Papers should be delivered in two hard copies, one with double-spacing and not more than 35 lines per page and on a floppy disc. A statement signed by all authors transfers copyrights on the published article to the Journal.

Papers are reviewed and edited. First author receives a review. If reviewers suggest some corrections, the author should forward them in 10 days and in two copies, one of them with double space. After the first author considers the editor's notes, the corrected paper should be sent in one copy and on a floppy disc.

Papers are accepted all year.

Acta agriculturae Slovenica

Issued by	Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana., Slovenia.
Editor-in-Chief	Prof. Peter DOVČ, Ph.D.
Technical Editor	Jože STOPAR
Editor Board	Prof. Tajana ČERNY, Ph.D. (Zagreb), Academician Prof. Remzi BAKALLI, Ph.D., (Athens, ZDA), Prof. Zdenko PUHAN, Ph.D. (Zürich), Michel BONNEAU, Ph.D. (Saint Gilles), Prof. Dr.h.c. Franz PIRCHNER, Ph.D. (Innsbruck), Prof. Jasna M.A. STEKAR, Ph.D. (Ljubljana), Drago BABNIK, Ph.D. (Ljubljana), Prof. Jernej TURK, Ph.D. (Maribor), Assoc.Prof. Dejan ŠKORJANC, Ph.D. (Maribor), Ass.Prof. Slavica GOLC TEGER, Ph.D. (Ljubljana), Assoc.Prof. Milena KOVAČ, Ph.D. (Ljubljana)
Proof Reading	Vanda ŠUŠTERŠIČ
Printed by	ROTOSI d.o.o., Tomačevo 19, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, in 450 copies
Address of Editor	Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenia, Tel.: +386 1 7217 800, Telefaks: +386 1 7241 005
E-mail	peter.dovc@bfro.uni-lj.si
Home page	http://aas.bf.uni-lj.si/index-en.htm
Annual subscription	6 000 SIT (25,04 EUR)*, for foreign countries 30 EUR
Individual issue	4 000 SIT (16,69 EUR)*, for foreign countries 20 EUR
Account holder	UL, Biotechnical Faculty, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia
Bank	BANKA SLOVENIJE, Slovenska 35, SI-1505 Ljubljana, Slovenia
Account number	01100-6030707410; reference 40-521-200341
IBAN	SI56011006030707410
SWIFT Code	BSLJSI2x
Subsides by	Slovenian Research Agency
Res. Reports are regularly indexed and abstracted by	AGRIS, CAB Abstracts, COBISS and FSTA
Indexing, Classification and Networking	International: Slovene National AGRIS Center National: INDOC of zootechnics
Please, address exchange publication to	Central Library of the Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana, P.O. Box 2995, Slovenia
Copyright	© 2006 University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department

* The calculation of price in Euro was based on the exchange rate 1,00 EUR = 239,640 SIT.