

Utjecaj mliječne kiseline i inokulanta na kinetiku probavljivosti škroba visoko-vlažnog zrna kukuruza

Tadić, Martin

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:603237>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**UTJECAJ MLIJEČNE KISELINE I
INOKULANTA NA KINETIKU
PROBAVLJIVOSTI ŠKROBA VISOKO-
VLAŽNOG ZRNA KUKURUZA**

DIPLOMSKI RAD

Martin Tadić

Zagreb, veljača, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:
Hranidba životinja i hrana

**UTJECAJ MLIJEČNE KISELINE I
INOKULANTA NA KINETIKU
PROBAVLJIVOSTI ŠKROBA VISOKO-
VLAŽNOG ZRNA KUKURUZA**

DIPLOMSKI RAD

Martin Tadić

Mentor: doc. dr. sc. Kristina Kljak

Zagreb, veljača, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Martin Tadić**, JMBAG 0178083760, rođen 17.08.1991. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

**UTJECAJ MLIJEČNE KISELINE I INOKULANTA NA KINETIKU
PROBAVLJIVOSTI ŠKROBA VISOKO-VLAŽNOG ZRNA KUKURUZA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Martina Tadića**, JMBAG 0178083760, naslova

UTJECAJ MLIJEČNE KISELINE I INOKULANTA NA KINETIKU

PROBAVLJIVOSTI ŠKROBA VISOKO-VLAŽNOG ZRNA KUKURUZA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. doc. dr. sc. Kristina Kljak mentor

2. prof. dr. sc. Darko Grbeša član

3. prof. dr. sc. Marina Vranić član

Zahvala

Ovime zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Kristini Kljak na strpljenju, pomoći oko izvođenja analiza i sastavljanja ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i članovima povjerenstva prof. dr. sc. Darku Grbeši i prof. dr. sc. Marini Vranić na stručnoj i tehničkoj pomoći pri sastavljanju ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem se djelatnicima laboratorija Zavoda za hranidbu životinja na ustupljenom prostoru i vremenu te pomoći pri provođenju analiza.

Sažetak

Diplomskog rada studenta Martin Tadić, naslova

UTJECAJ MLIJEČNE KISELINE I INOKULANTA NA KINETIKU PROBAVLJIVOSTI ŠKROBA VISOKO-VLAŽNOG ZRNA KUKURUZA

Silaža visoko-vlažnog zrna kukuruza postaje sve važniji oblik konzerviranja kukuruza pri čemu dodatak aditiva smanjuje rizik od neželjene fermentacije i kvarenja silaže. Nije poznato ima li dodatak aditiva utjecaja na kinetiku probavljivosti škroba, te je cilj ovog istraživanja bio ispitati kako dodatak inokulanta i mliječne kiseline tijekom siliranja visoko-vlažnog zrna utječe na brzinu probavljivosti škroba u modelu koji oponaša uvijete u želucu i tankom crijevu svinje. Hibrid Bc 462 siliran je u vakuum vrećicama tijekom 182 dana spontano (kontrola) te s dodatkom inokulata Sil-All (Dr. Peiper, Njemačka) i mliječne kiseline (0,9%). Doseg razgradnje škroba u *in vitro* modelu pratio se nakon 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 i 360 min, a kako bi se izračunala kinetika probavljivosti škroba silaže visoko-vlažnog zrna kukuruza u svim uzorcima određen je sadržaj škroba i šećera. Dodatak inokulanta i mliječne kiseline u silažu nije imalo utjecaj na sadržaj škroba i šećera u silaži. Probavljivost suhe tvari u uzorcima kretala se od 88,55% do 91,06% te se nije razlikovala između tretmana. Nakon prva dva sata inkubacije razgradilo se prosječno 90,65% škroba, a dodatak inokulanta ili mliječne kiseline nije utjecao na koeficijente probavljivosti od početka do drugog sata inkubacije. Tretman je značajno djelovao na koeficijente probavljivosti nakon tri i četiri sata inkubacije pri čemu je dodatak inokulanta rezultirao najvišim vrijednostima. Ujedno, silaže silirane s inokulantom imale su najviši udio potencijalno probavljive frakcije. Unatoč utvrđenim razlikama, tretman nije utjecao na brzinu razgradnje škroba pri čemu su dodatak inokulanta i mliječne kiseline rezultirali nižim vrijednostima u odnosu na kontrolni uzorak (1,02 vs. 1,29 1/h).

Ključne riječi: visoko-vlažno zrno kukuruza, inokulant, mliječna kiselina, kinetika probavljivosti škroba

Summary

Of the master's thesis—student **Martin Tadić**, entitled

EFFECT OF LACTIC ACID AND INOCULANT ON STARCH DIGESTIBILITY KINETICS OF HIGH-MOISTURE MAIZE

High-moisture grain silage is becoming increasingly important form of maize storage whereas additive addition is reducing the risk of undesirable fermentation and spoiling. It is not known whether additive addition affects digestibility kinetics of high-moisture corn, and this study aimed to explore the effect of inoculant and lactic acid during ensiling on starch digestibility rate in a model mimicking stomach and small intestine of the pig. Hybrid Bc 462 was ensiled in vacuum bags for 182 days spontaneously (control) and supplemented with Sil-All inoculant (Dr. Peiper, Germany) and lactic acid (0.9%). The extent of starch degradation in the *in vitro* model was determined after 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 and 360 min. Starch and sugar contents were determined in all samples to calculate the starch digestibility kinetics. The addition of inoculant and lactic acid in high-moisture maize did not affect starch content and sugar in the silage. Dry matter digestibility of the samples ranged from 88.55% to 91.06% and did not differ between treatments. After the first two hours of incubation, on average 90.65% of starch was digested, and inoculant or lactic acid addition did not affect digestibility coefficients from the beginning to the second hour of incubation. The treatment had a significant effect on digestibility coefficients after three and four hours of incubation, and silages with inoculant addition had the highest values. At the same time, silage ensiled with inoculant had the highest proportion of potentially digestible fraction. Despite determined differences, treatment did not affect starch digestibility rate, and addition of inoculant and lactic acid resulted in numerically lower values compared to the control sample (1.02 vs. 1.29 l/h).

Keywords: high-moisture maize grain, inoculant, lactic acid, starch digestibility kinetics

Sadržaj

1. Uvod	3
1.1. Hipoteze i cilj rada	4
2. Pregled literature	5
2.1. Kukuruz	5
2.1.1. Porijeklo kukuruza	5
2.1.2. Sistematika kukuruza	5
2.1.3. Uvjeti proizvodnje kukuruza	6
2.1.4. Proizvodnja zrna kukuruza	7
2.1.5. Namjena kukuruza	11
2.1.6. Građa zrna kukuruza	11
2.1.7. Škrob u zrnu kukuruza	8
2.2. Probavljivost škroba	9
2.3. Kinetika probavljivosti škroba	10
2.4. Siliranje	11
2.4.1. Prva faza	11
2.4.2. Druga faza – stvaranje octene kiseline	12
2.4.3. Treća faza – mliječnokisela	12
2.4.4. Četvrta faza	13
2.4.5. Peta faza	13
2.5. Silaža visoko-vlažnog zrna kukuruza	13
3. Materijali i metode	15
3.1. Agrotehnika pokusa	15
3.2. Priprema uzoraka silaže visoko-vlažnog zrna kukuruza	17
3.3. Kemijske analize	19
3.3.1. Određivanje sadržaja vlage	19
3.3.2. Određivanje sadržaja škroba	19
3.3.3. Određivanje sadržaja šećera	20
3.4. <i>In vitro</i> probavljivost škroba	21
3.4.1. Određivanje <i>in vitro</i> probavljivosti	21

3.4.2. Probavljivost suhe tvari	22
3.4.3. Brzina probavljivosti škroba	22
3.5. Statistička obrada podataka	23
4. Rezultati i rasprava	24
4.1. Škrob i šećer	24
4.2. Probavljivost suhe tvari	25
4.3. Kinetika <i>in vitro</i> probavljivosti škroba.....	26
4.4. Brzina i potencijalna probavljivost frakcija škroba.....	27
5. Zaključak.....	29
6. Popis literature.....	30

1. Uvod

Kukuruz je jedna od najrasprostranjenijih ratarskih kultura u Svijetu i uzgaja se na više od 185 milijuna hektara (FAO, 2016). Koristi se kao hrana za ljude i životinje te kao izvor energije u proizvodnji etanola i bioplina. Škrob iz žitarica je glavni izvor energije za visoko proizvodne domaće životinje. Kukuruz sadrži najviše škroba među žitaricama (60-65%), a on je i najvažniji izvor energije za perad, svinje, visoko mliječne krave te junad u tovu. Odrasle monogastrične životinje najviše energije dobivaju iz glukoze oslobođene razgradnjom škroba u crijevima, a preživači iz hlapivih masnih kiselina stvorenih fermentacijom škroba u predželucima.

Zbog sve bržeg razvoja i novih saznanja u hranidbi životinja, kinetika, odnosno brzina probavljivosti škroba dobiva sve više na značenju. Brzina razgradnje škroba nekog krmiva ima veliki utjecaj na pravilan rast i razvoj životinje, njezino zdravlje, koje se u konačnici očituje u finansijskim rezultatima animalne proizvodnje. Kinetika probavljivosti škroba može biti pod utjecajem fizikalnih i kemijskih svojstava krmiva, ali i same životinje, te načina pripreme hrane odnosno krmiva (Wilfart i sur., 2008).

Postoje dvije metode istraživanja kinetike probavljivosti škroba – *in vivo* i *in vitro*. *In vivo* metoda provodi se na životinjama u realnim uvjetima, skupa je, zahtjevna i ograničen je broj istraživanja, a sam postupak je dugotrajan. *In vitro* metoda provodi se u laboratorijskim uvjetima oponašajući proces probave u životinji korištenjem komercijalno dostupnih enzima. Metoda se temelji na probavi škroba u *in vitro* uvjetima koji oponašaju želudac i tanko crijevo te se mjeri otpuštanje glukoze u različitim vremenima inkubacije. Ova metoda znatno je pristupačnija i jednostavnija za provedbu, s mnogo većim brojem dobivenih rezultata u kraćem vremenskom periodu koji u točnosti mnogo ne zaostaju za onima dobivenim *in vivo* metodom. Najčešće korištena klasifikacija škroba temelji se na kinetici *in vitro* probavljivosti prema Englyst i sur.(1992).

Zbog velike važnosti kukuruza u hranidbi domaćih životinja vrlo važno nam je njegovo skladištenje i čuvanje kroz čitavu godinu. Kukuruz se može čuvati kao suho zrno ili klip, silirano zrno i silirana prekrupa kukuruza.

Visoko-vlažna silaža prekrupe kukuruza praktičan je i ekonomski prihvatljiv način čuvanja kukuruza kroz godinu. Korištenjem dodataka za siliranje i inokulanta za silažu ubrzava se proces same fermentacije, veća je kontrola nad tim procesom pa je samim time manja mogućnost pogreške u fermentaciji odnosno kvarenja silaže u silosu. Silaža kojoj su dodani dodaci i inokulanti može se dulje vrijeme čuvati, a stabilnija je prilikom otvaranja silosa i njenog korištenja u hranidbi životinja. Poznato je da siliranje povećava probavljivost škroba zrna kukuruza no nedovoljno je podataka kako utječe na kinetiku probavljivosti škroba, posebice korištenjem različitih dodataka tijekom siliranja.

1.1. Hipoteze i cilj rada

Hipoteza provedenog istraživanja je da će dodatak inokulanta i mliječne kiseline u masu za siliranje imati utjecaj na kinetiku *in vitro* ilealne probavljivosti škroba visoko-vlažnog zrna kukuruza u modelu koji oponaša probavni sustav želuca i tankog crijeva.

Koristeći model svinje, cilj ovog istraživanja je odrediti utjecaj dodataka za siliranje na kinetiku *in vitro* ilealne probavljivosti škroba silaže visoko-vlažnog zrna kukuruza. Dodaci silaži koji će se ispitivati su mliječna kiselina (0,9%-tna otopina) i komercijalni inokulant Bio-Sil (Dr. Pieper, Njemačka) u usporedbi sa spontanim siliranjem.

2. Pregled literature

2.1. Kukuruz

2.1.1. Porijeklo kukuruza

Kukuruz je ratarska kultura porijeklom iz Središnje Amerike, s područja današnjeg Meksika koji je pradomovina ove biljke. Na području Središnje Amerike živjeli su drevni narodi Asteci, Maje i Inke koji su zaslužni za njegovo kultiviranje i širenje prvo u područje Južne Amerike, a kasnije i u Sjevernu Ameriku. Najzaslužniji za širenje kukuruza van američkog kontinenta bio je istraživač Christopher Columbo koji je otkrićem Amerike 1492. godine omogućio da se ova biljka prvo donese u Španjolsku iz koje se dalje proširila po čitavoj Europi i svijetu. Kukuruz je na Balkan došao u drugoj polovici 16. st. te je iz Dalmacije u sjeverne krajeve Hrvatske dopremljen 1572. godine gdje se i danas uspješno uzgaja.

Danas se kukuruz uzgaja u cijelome svijetu, a njegova raznolika mogućnost upotrebe i sposobnost uzgoja na lošijim tlima i u ekstremnijim klimatskim uvjetima čini ga trećom svjetskom kulturom odmah poslije pšenice i riže (Jurišić, 2008). Kukuruz, zajedno s pšenicom i rižom, glavno je oružje u borbi protiv gladi u nerazvijenim zemljama diljem svijeta.

2.1.2. Sistematika kukuruza

Selekcija i oplemenjivanje kukuruza doveli su do stvaranja visoko rodnih hibrida koji su izrazito otporni na ekstremne vremenske uvjete, a u novije vrijeme i na pojedine štetnike. Sve ovo povećava važnost i značaj kukuruza za čovječanstvo. 1920-ih godina u SAD-u su počela istraživanja i korištenja hibridnih kukuruza, a već 1930-ih seljaci su ga prihvatili i počeli koristiti. 1947. godine, Palaveršić je utemeljio program selekcije linijskih hibrida kukuruza u Republici Hrvatskoj. Tijekom svojega rada stvorio je 60-ak linija hibrida kukuruza. Svojim hibridima je uspio potisnuti američke, a najpoznatiji je Bc 590 (Palaveršić, 1963).

Kukuruz (*Zea mays* L.) je biljka koja zbog svoje velike rasprostranjenosti i raznolikosti ima jako velik broj kultiviranih sorta, koje se značajno razlikuju pa je sama klasifikacija bila složen i dugotrajan posao. Prvi koji je detaljnije izvršio istraživanja velikog broja kultiviranih sorti (skoro 800) kukuruza i na osnovu toga predložio njihovu klasifikaciju bio je američki znanstvenik Sturtevant. Kasnije je klasifikaciju dopunio Kulešov, a Žukovski ove grupe smatra posebnim podvrstama (Jurišić, 2008).

Klasifikacija kukuruza:

1. zuban(*Zeamays indentata* Sturt.)
2. tvrdunac(*Zeamays* L. *indurata* Sturt.)
3. šećerac(*Zeamays* L. *saccharata* Sturt.)
4. kokičar(*Zeamays* L. *evarta* Sturt.)
5. mekunac(*Zeamays* L. *amylacea* Sturt.)
6. voštanac(*Zeamays* L. *ceratina* Kulesk)
7. pljevičar(*Zeamays* L. *tunicata* Sturt.)
8. poluzuban(*Zeamays* L. *semindentata* Kulesk)
9. škrobni šećerac(*Zeamays* L. *amyllosaccharata* Sturt.)

U Hrvatskoj se najviše uzgajaju podvrste zuban, tvrdunac i poluzuban. Zuban i poluzuban se zbog većeg prinosa zrna uglavnom koriste u hranidbi domaćih životinja i industrijskoj proizvodnji. Tvrdunac daje manji prinos, ali je zrno kvalitetnije s većim udjelom proteina pa se većinom koristi u prehrani ljudi.

Zuban: zrna ove grupe kukuruza u zreloom stanju karakteriziraju se udubljenjem u kruni zrna pa svojim izgledom podsjećaju na konjski zub. Ovo udubljenje nastaje uslijed gubitka vode iz brašnastog i caklavog endosperma tijekom sazrijevanja. Boja zrna najčešće je žuta ili bijela, ali može biti i crvenkasta. Masa 1000 zrna kreće se između 270 i 450 g.

Tvrdunac: zrna ove grupe kukuruza su tvrda, okruglo-ovalnog oblika i sjajna. Endosperm tvrdunaca je caklav i brašnast, ali za razliku od zubana, caklavi endosperm zauzima veći dio zrna i nalazi se po periferiji zrna. Brašnasti endosperm nalazi se u sredini zrna. Boja zrna tvrdunca je različita i može biti žuta, bijela, ljubičasta, narančasta ili crvena. Masa 1000 zrna je između 115 i 300 g.

Poluzuban se od zubana razlikuje manje izraženim udubljenjem na vrhu zrna i većim sadržajem caklavog endosperma (Jurišić, 2008).

Hibridi kukuruza mogu imati različito dugu vegetaciju pa ih se svrstava u vegetacijske grupe FAO 100, FAO 200, FAO 300, FAO 400, FAO 500, FAO 600, FAO 700, FAO 800, FAO 900 i FAO 1000. Vegetacijska grupa 100 ima najkraću vegetaciju koja traje od 70 do 90 dana. Svaka daljnja grupa ima dulju vegetaciju za 5 do 10 dana. U suvremenoj proizvodnji kukuruza izmjena sortimenata hibrida jako je brza tako da su pojedini hibridi u široj proizvodnji od 5 do 6 godina. Svi domaći instituti u kojima se stvaraju hibridi svake godine izdaju nove kataloge u kojima se nalazi opis njihovih hibrida.

2.1.3. Uvjeti proizvodnje kukuruza

Za uspješnu proizvodnju kukuruza potrebni su povoljni agroekološki uvjeti, pravilna agrotehnika i kvalitetan sortiment. Od uvjeta koji se moraju osigurati biljci kukuruza tijekom njezinog rasta najznačajniji su zahtjevi prema tlu, vodi, temperaturi i svjetlosti. Na sam prinos kukuruza značajno utječe agrotehnika (plodored, obrada i priprema tla za sjetvu, gnojidba te zaštita od bolesti, štetnika i korova), nedostatak oborina i visoke temperature, izbor hibrida i kvaliteta sjemena kao i prisutnost štetnika i polijeganje.

2.1.4. Proizvodnja zrna kukuruza

Svjetska proizvodnja kukuruza iznosi 1 021 616 583 tona. Najveći proizvođač u svijetu je SAD s proizvedenih 361 milijuna tona kukuruza, a slijede ih Kina (215 milijuna tona) i Brazil (80 milijuna tona). Proizvodnja kukuruza u Hrvatskoj je 2014. godine iznosila 2 046 966 tona, te se vidi polagani porast proizvodnje kukuruza nakon 2012. godine. U Hrvatskoj je kukuruz najvažnija ratarska kultura, za proizvodnju zrna i silaže cijele biljke, a slijedi ga šećerna repa (FAO, 2016).

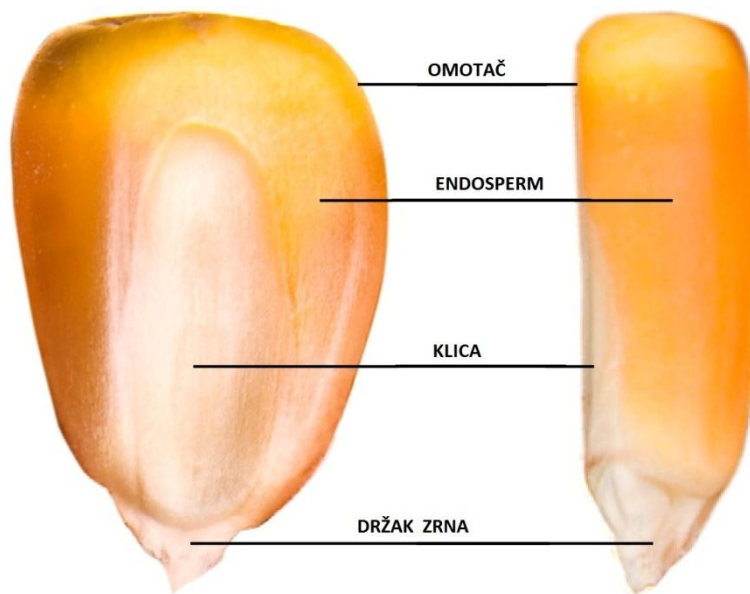
2.1.5. Namjena kukuruza

Kukuruz je jedna od najiskoristivijih ratarskih kultura. Gotovo svaki dio biljke kukuruza ima neku namjenu od samog zrna, cijele stabljike s klipom ili bez njega, klipa sa zrnom, oklaska pa sve do ostataka stabljike. U ratarskoj proizvodnji kukuruz ima važnu ulogu u plodoredu te kultivaciji zemlje koja nije dugo obrađivana. Preko 500 različitih industrijskih prerađevina proizvodi se od kukuruza. Kukuruz se koristi kao hrana za ljude i životinje, u proizvodnji bioetanolu i bioplina te toplinske energije, u proizvodnji viskija, proizvodnji ulja i vlakana, u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, u proizvodnji škroba i šećera, u proizvodnji ljepila, plastike i papira. Gotovo da i nema prehrambenih proizvoda koji ne sadrže kukuruz u nekom obliku.

2.1.6. Građa zrna kukuruza

Zrno kukuruza izgrađeno je od četiri osnovna dijela endosperma, klice, omotača i drške zrna (slika 1.). Svaki dio zrna bogat je hranjivim tvarima koje su bitne za ljude i životinje koje ga konzumiraju. Endosperm je bogat škrobom i proteinima, klica je bogata uljem i mineralima, a omotač vlaknima.

Endosperm se sastoji od dugih stanica u kojima su zapakirane granule škroba omotane proteinskom matricom. Zrno kukuruza sastoji se od različitih udjela caklavog i brašnog endosperma te njihov omjer određuje fizikalna i kemijska svojstva hibrida. Brašnasti endosperm se nalazi u unutrašnjosti zrna i obavija klicu. Caklavi endosperm smješten je ispod košuljice i sličan je rožini, a sastoji se od škroba, proteina i ulja. Klica se nalazi iznad drška i skladište je hranjiva i hormona za embrio, bogata je uljem. Vanjski tanki omotač ili košuljica sjemena kukuruza štiti unutrašnjost zrna od mehaničkih i bioloških oštećenja (Grbeša, 2008).



Slika 1. Građa zrna kukuruza
(prilagođena slika: <http://freshoffthecob.com/>)

Caklavi endosperm sadrži više proteina zeina, amiloze (23,20%), šećera, karotenoida, te sitnije granule škroba od brašnog endosperma. Međutim, caklavi endosperm sadrži nešto manje škroba od brašnog endosperma. Količina caklavog endosperma u korelaciji je sa sadržajem ukupnih proteina, odnosno zeina i obrnuto razmjerna koncentraciji glutelina. Točnije, udjel zeina povezan je sa caklavošću zrna. Prema nekim autorima, zubane karakterizira sadržaj zeina do 7,6% u škrobu, a tvrdunce sadržaj veći od 8,8% u škrobu. Brašnasti endosperm je mekan i rahao, a nalazi se u unutrašnjosti zrna i obavija klicu. Krupne i okrugle granule brašnog endosperma obavijene su tankom proteinskom ovojnicom i okružene zračnim džepovima. Sastoji se od više od 90% škroba te malo proteina i ulja. Brašnasti endosperm skloniji je lomu, njegova je hektolitarska težina manja, sadrži manje proteina i ulja ali više škroba od rožnatog endosperma (Grbeša, 2016).

2.1.7. Škrob u zrnju kukuruza

Kukuruz je zbog visokog udjela škroba (60-70%) glavni izvor energije za većinu domaćih životinja, zbog čega se ubraja u energetska krmiva. Koristi se u hranidbi preživača (tovnih i mliječnih goveda, ovaca i koza) gdje u obliku koncentrata nadopunjuje voluminozni dio obroka. Kod monogastričnih životinja svinja i peradi glavni je izvor energije koju životinje koriste za proizvodnju jaja i mesa. Najčešće se koristi u krmnim smjesama zajedno s proteinskim krmivima.

Škrob se sastoji od dvaju polimera vrlo različitog stupnja razgranatosti. U pravilu, normalan kukuruz sadrži 25% škroba u formi amiloze a 75%u formi amilopektina pa porast jedne smanjuje udjel druge forme škroba. Sadržaj amiloze i amilopektina (65-71%) dosta varira (19-35%), ovisno o hibridu, uvjetima rasta i stadiju zrelosti zrna. Ravna i zbijena molekula amiloze povezana s lipidima i drugim škrobovima ograničava probavljivost pa je ona odgovorna za količinu sporoprobavljivog i neprobavljivog (rezistentnog) škroba. Nasuprot tome, amilopektin je razgranata molekula škroba, veće površine, pa se potpunije i lakše probavlja enzimima životinja i mikrobima probavila. Nadalje, škroba u formi amilopektina više je u manjim granulama i nižeg stupnja kristalizacije ili A-tipa kristalizacije, što amilopektin dodatno čini više i brže probavljivim u crijevima i razgradivim u buragu. Nasuprot tome, amiloza sadrži više krupnijih i B-tipa ili C-tipa kristalizacije pa je s time povezana manja probavljivost (Grbeša, 2016).

2.2. Probavljivost škroba

Glavni izvor energije u hrani intenzivno hranjenih svinja je škrob iz zrna kukuruza, a kako bi iskoristivost škroba, a samim time i ekonomičnost proizvodnje bila što veća ključna je njegova probavljivost. Probavljivost pokazuje koliki udio od pojedene količine škroba se u probavnom traktu apsorbira u organizam životinje. Wilfart i sur. (2007) probavljivost definiraju kao skupinu kriterija koji kvantificiraju udio unosa nutrijenata koji su probavljeni u probavnom sustavu životinje. Drugim riječima, probavljivost je stupanj iskorištenja hrane tijekom prolaska kroz probavni sustav. Može se izraziti koeficijentom (0-1) ili postotkom (0-100%) od ukupno konzumirane hrane.

Pod utjecajem hrane i sline, jednjački i kardijalni dio želuca svinje ima na početku hranidbe blago lužnati do neutralni pH te se nastavlja razgradnja ugljikohidrata započeta u ustima, a istodobno se pod utjecajem mikroorganizama odvija i slaba mikrobiološka aktivnost ugljikohidrata do nižih masnih kiselina. Niska pH vrijednost u fundusnom i pilorusnom dijelu želuca primarno je važna za aktivnost enzima i razgradnju bjelančevina (Domaćinović, 2015). Škrob je najvećim dijelom hidroliziran od strane enzima u nekoliko koraka. α -amilaza sline djeluje efikasno na škrob, ali se vrlo brzo razgradi pod utjecajem kisele sredine želuca te stoga ima vrlo malu ulogu u probavi škroba. U hidrolizi škroba najviše sudjeluje amilaza gušterače, koja se otpušta u tanko crijevo. α -amilaza katalizira hidrolizu α -1-4 glikozidne veze u amilozi i amilopektinu, a konačni produkti probave amiloze su maltoza, maltotrioza i maltotertaoza. α -amilaza nema mogućnost razgradnje α -1-6 glikozidne veze u amilopektinu te se kao

posljedica probave amilopektina pojavljuju većinom dekstrini ili razgranati oligosaharidi (Singh i sur., 2010).

Probavljivost škroba kukuruza u cijelom probavnom traktu peradi, svinja i goveda je 97%, što je gotovo potpuna probavljivost i nema većih razlika između hibrida kukuruza (Grbeša, 2016). Lin i sur. (1987) su u svojem istraživanju utvrdili da se je najveći dio škroba istraživanih krmiva hidrolizirao u tankom crijevu svinja do glukoze dok su neznatne količine dospjele u debelo crijevo i fermentirale do kratkolančanih masnih kiselina te su tamo i apsorbirane. Ilealna probavljivost škroba pšeničnih posija i ječma bila je nešto manja u odnosu na kukuruz, pšenicu, šećernu trsku, zob i griz.

2.3. Kinetika probavljivosti škroba

Kemijska kinetika je grana kemije koja se bavi proučavanjem brzina kemijskih reakcija i mehanizama kojima se one odvijaju u određenom vremenu. Istraživanja o kinetici probavljivosti škroba postaju sve značajnija u hranidbi svinja zbog mogućeg utjecaja na probavljivost drugih nutrijenata, metabolizam aminokiselina, crijevu fermentaciju, fiziologiju gastrointestinalnog sustava, pasažu digesta, retenciju dušika, veću produktivnost i sastav trupa. Zbog toga nam je sve zanimljiviji glikokemijski indeks (GI) koji je mjera kojom se uspoređuje vrijednost glukoze u krvi nakon unosa određenog krmiva, u odnosu na referentnu vrijednost. Za referentnu vrijednost se uzima unos čiste glukoze. GI mjeri se u istraživanjima kinetike probavljivosti kod hranidbe temeljene na žitaricama. U praksi se koristi pretpostavljeni GI zbog visoke cijene *in vivo* istraživanja. Pretpostavljeni GI (pGI) koristi se u nutricionističkim istraživanjima za izražavanje kinetike probavljivosti škroba.

Poznato je da hrana sa sporijom i ujednačenijom hidrolizom škroba osigurava ravnomjerniju razinu glukoze u krvi pa je ona energetski kvalitetnija, „hranjivija“ za organizam. Mjesto probave škroba određuje brzina probavljivosti u crijevima monogastričnih životinja pa se prema brzini probave škrob dijeli na brzoprobavljivi, sporoprobavljivi i rezistentni škrob (Grbeša, 2016). Englyst i sur.(1992) su uspostavili klasifikaciju škroba koja se temelji na kinetici *in vitro* probavljivosti škroba. Metoda se temelji na *in vitro* probavi škroba u kojoj se oponašaju uvjeti u želucu i crijevima te se mjeri otpuštanje glukoze u različitim vremenima. Tako se razlikuju brzoprobavljivi (eng. Rapidly Digestible Starch, RDS, količina glukoze koja je otpuštena do 20 min), sporoprobavljivi (eng. Slowly Digestible Starch, SDS, količina glukoze otpuštene između 20 i 120 min) i rezistentni škrob (eng. Resistant Starch, RS, ukupni škrob minus količina glukoze koja je otpuštena unutar 120 min).

Brzoprobavljivi škrob se za dva sata potpuno probavi do glukoze u gornjem dijelu crijeva, pa donji dio crijeva nema dovoljno energije i zato koriste aminokiseline kao njen izvor. Naime, crijeva prva koriste glukozu i tek kada se ona namire, propuštaju je u metabolizam pa životinje hranjene s puno brzoprobavljivog škroba sporije rastu. Sporoprobavljivi škrob se za 2-4 sata probavi u donjem dijelu tankog crijeva i stalno opskrbljuje metabolizam životinje glukozom. Pilići hranjeni istom količinom škroba od kojega je jedan dio sporoprobavljivi bolje rastu od onih hranjenih samo brzoprobavljivim škrobom. Naime, ako se sav škrob brzo

probavlja, sva oslobođena glukoza se ne može apsorbirati, pa životinja dobije manje energije (Grbeša, 2008). U istraživanju koje je proveo Weurding (2002) su zaključili kako brojleri hranjeni krmivima niske brzine probavljivosti škroba (bliže 1,26 l/h) pokazuju učinkovitiji rast u odnosu na one koji su hranjeni krmivima visoke brzine probavljivosti škroba. Smatra se da je pozitivan utjecaj niže brzine probavljivosti škroba rezultat postupne opskrbe škroba duž tankog crijeva čime se postiže bolja ujednačenost opskrbe proteinima i energijom (Gutierrez del Alamo i sur., 2009).

Što se tiče zrna kukuruza, Weurding i sur. (2001) su dobili vrijednosti brzine probavljivosti škroba od 1,19 do 1,38 l/h ovisno o tipu kukuruza i načinu mljevenja zrna. U istraživanju Giuberti i sur. (2012), 14 uzoraka kukuruza je imalo prosječno 14,7 g/kg ST brzoprobavljivog, 36,7 g/kg ST sporoprobavljivog i 19,1 g/kg ST rezistentnog škroba. Prosječna brzina razgradnje iznosila je 1,02 l/h a potencijalno probavljiva frakcija prema kinetici prvog reda je iznosila 95%.

2.4. Siliranje

Siliranje je način konzerviranja visoko vlažnih krmiva pomoću kiselina (mliječne i octene kiseline) bez prisutnosti kisika koji je gaženjem i pokrivanjem folijom istisnut iz biljne mase. Bakterije octene i mliječne kiseline razgrađuju šećere te ih pretvaraju u octenu i mliječnu kiselinu koje čuvaju silažu od kvarenja. Tijekom konzerviranja vlažnih krmiva siliranjem odvijaju se dva procesa: respiracija i fermentacija u pet glavnih faza, a u svakoj fazi dominira više glavnih procesa. U sljedećim poglavljima objašnjene su promjene u siliranoj masi koje na staju od berbe i mljevenja preko fermentacije do hranidbe (Lukić i Džeba, 2014).

2.4.1. Prva faza

Prva faza je aerobna ili respiracijska faza jer je u silaži prisutan kisik. Traje od mljevenja do zatvaranja silosa, odnosno dok se ne potroši sav prisutni kisik. Kisik treba što prije nestati jer on pogoduje razvoju nepoželjnih bakterija koje troše šećere te ga je manje za mliječno kiselinske bakterije i mikroorganizme buraga. Sve dok je kisik prisutan u silaži se razvijaju gljivice i pljesni koje proizvode toplinu i ako ona podigne temperaturu silirane mase iznad 35 °C dolazi do karamelizacije silaže (smeđa boja) koja je znak gubitka suhe tvari i smanjenog iskorištenja proteina.

U ovoj fazi su također aktivni enzimi otpušteni raspadom stanica koji razgrađuju vrijedne sastojke silaže, hidroliziraju proteine na peptide i slobodne aminokiseline, a ugljikohidrate na jednostavne šećere. Raspadnute biljne stanice opskrbljuju hranjivim supstratom aerobne mikroorganizme i populacije gljivica, plijesni i aerobnih bakterije te se povećava njihov broj, a rezultat njihove aktivnost su obično male promjene u kvaliteti krme u ovom stadiju

pripremanja silaže. Rastu samo populacije gljivica i bakterija na otprilike 10^8 CFU(eng. Colony Forming Units)/g krmiva i pljesni na 10^6 CFU/g krme. Slično i istovremeno odvija se rast fakultativnih anaeroba kao što su bakterije mliječne kiseline i enterobakterije.

Prva faza završava kada se potroši prisutni kisik i kiselost (pH) opadne na otprilike 5,5 što smanjuje aktivnost biljnih enzima i razgradnju proteina i ugljikohidrata.

2.4.2. Druga faza – stvaranje octene kiseline

Druga faza ili prvi dio aktivne faze počinje kada je potrošen sav kisik i počinje stvarno zakiseljavanje silaže. Nakon punjenja i zatvaranja silosa biljke disanjem potroše preostali kisik za nekoliko sati. Stvoreni anaerobni uvjeti omogućuju da anaerobni mikroorganizmi pretvaraju šećere u octenu kiselinu, nešto mliječne, alkohol i ugljični dioksid. Druga faza traje obično 24-72 sata. Premda je octena kiselina slabija od mliječne ona prva počinje snižavati pH silirane mase. Opadanje kiselosti je povoljno za razvoj mliječno-kiselinskih bakterija (Grbeša, 2015).

Isto tako, samorazgradnja silirane mase daje tvari za rast poželjnih anaerobnih mikroorganizama mliječno-kiselinskog vrenja. Već 2-3 dana nakon zatvaranja silosa počinju dominirati enterobakterije i bakterije mliječne kiseline.

2.4.3. Treća faza – mliječno kisela

Treća faza ili drugi dio aktivne faze počinje kada pH padne na 5 što smanjuje aktivnost bakterija octene kiseline i istovremeno ubrzava aktivnost bakterija mliječno kiselinskog vrenja koje sada jedine pretvaraju preostale šećere u jaku mliječnu kiselinu. Treća faza je najdulja faza u siliranju i traje sve dok kiselost ne padne toliko nisko da zaustavi rast samih mliječno-kiselih bakterija (Grbeša, 2015).

Drugi proizvodi ove faze su etanol, 2,3-butan-diol, jantarna i mravlja kiselina i manitol. Bakterije mliječno kiselinskog vrenja rastu aktivno tijekom od jednog do četiri tjedna ovisno o materijalu koji se silira smanjujući pH silaže do 3,8-5,0, a što ovisi o vlažnosti silaže, pufernom kapacitetu i sadržaju šećera. Kada pH opadne dovoljno da zakoči mikrobiološki rast ili kad su hranjiva iscrpljena, bakterije mliječne kiseline postaju inaktivne i opada brojnost njihove populacije. Poželjna duljina treće faze je 1-3 tjedna kod siliranja visoko-vlažnog zrna kukuruza.

2.4.4. Četvrta faza

Četvrta ili stabilna faza započinje nakon što je anaerobna mikrobiološka aktivnost prestala zbog niskog pH ili potrošnje svog šećera. U ovoj fazi dominira mliječno kiselo vrenje. Stabilna faza traje najdulje sve dok pH ne padne na 4,5 ili manje, ovisno o pufernom kapacitetu, i tako zakoči aktivnost svih mikroorganizama silaže. U ovoj fazi silaža može ostati jako dugo vremena sve dok nema ulaza kisika i vode u nju. Iako su silosi jako dobro zatvoreni, postoji sporo prodiranje-difuzija zraka kroz plastiku ili beton (Grbeša, 2015).

2.4.5. Peta faza

Posljednja faza ili izuzimanje započinje nakon što je silos otvoren. Kisik iz zraka prodire u otvorenu silažnu masu. Aeracija otvorene površine silaže i silaže u valovu pospješuje rast aerobnih mikroorganizama kvasaca i pljesni koji izazivaju sekundarne fermentacije koje mogu bitno povećavati zagrijavanje i naknadni gubitak suhe tvari kao i zdravstvene probleme. Početno zagrijavanje je uzrokovano gljivicama ili bakterijama octene kiseline (Grbeša, 2015).

2.5. Silaža visoko-vlažnog zrna kukuruza

Kod siliranja kukuruz se bere s većim postotkom vlage (30-35 %) u fazi fiziološke zrelosti, zrno se zatim melje (otvori na mlinu dimenzija 10-12 mm), a prekrupa se odmah stavlja u silos. Sabijanjem silirane mase istiskuje se zrak. Površina silirane mase prekriva se plastičnom folijom. Zidovi silosa moraju biti zaštićeni plastificiranim premazom ili plastičnom folijom. Fermentacija dobro sabijene i izolirane biljne mase teče brzo i već nakon 2-4 dana stvara se mliječna kiselina koja konzervira siliranu masu. Trajanje procesa siliranja ovisi o vlažnosti biljne mase (minimalna vlažnost zrna je 28%, a dodavanje vode u slučaju nižeg sadržaja vlage rizično je zbog mogućnosti kvarenja silaže), odgovarajućim anaerobnim uvjetima i temperaturi (pri nižim temperaturama u kasnu jesen proces siliranja je sporiji). Veliki porast temperature silirane biljne mase, ukazuje na mogućnost kvarenja silaže, a uzrok je nedovoljno sabijanje i zaostajanje veće količine zraka ili slaba bočna ili površinska izolacija (Lukić i Džeba, 2014).

Siliranje zrna kukuruza vrši se u horizontalnim silosima (rjeđe u silo tornjevima), a za izradu se koristi beton (rjeđe cigla, nehrđajući čelik, drvo). Silosi se postavljaju neposredno uz objekte za smještaj stoke. Ranija praksa da se silosi ukopavaju u zemlju je napuštena zbog sakupljanja velike količine atmosferske vode što otežava rad, ali i smanjuje kvalitetu silaže.

Upotreba siliranog kukuruza ima mnoge prednosti:

- štedi se energija za sušenje i transport kukuruza,
- smanjuje se opasnost od kvarenja kukuruza i pojave pljesni i mikotoksina. Silirana prekrupa je mikrobiološki potpuno ispravna,
- silirana masa je ukusnija, a hranljive tvari su probavljivije. Prisutnost mliječne kiseline i niska pH vrijednost (4-4,5) povoljno djeluju na mikrofloru probavnog trakta,
- korištenjem kasnozrelih hibrida kukuruza povećava se prinos silirane mase što smanjuje troškove hranidbe,
- siliranje omogućava 10-15 dana raniju berbu usjeva što omogućava bolju i jeftiniju pripremu zemljišta za sljedeći usjev (Lukić i Džeba, 2014).

Visoko-vlažno zrno kukuruza najviše se koristi u hranidbi svinja u tovu, junadi u tovu, mliječnih krava i rasplodnih krmača. U obroku goveda dnevna količina silaže visoko-vlažnog kukuruza se kreće od 2 do 6 kg ovisno o proizvodnji i dobi životinje. Kod svinja silaža visoko-vlažnog kukuruza može činiti i 70 % obroka uz dodatak kvalitetne proteinske dopunske krmne smjese (Jones i sur., 1970).

3. Materijali i metode

Zrno kukuruza koje je korišteno u pokusu proizveden je tijekom vegetacijske sezone 2013. godine na pokušalištu Maksimir Zavoda za specijalnu proizvodnju bilja Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Za pokus korišten je hibrid Bc 462, oplemenjivačke kuće Bc Institut d.d. Zagreb. Bc 462 je hibrid izrazito kvalitetnog zrna za proizvodnju brašna i krupice, dobro podnosi sušu, niske stabljike, povećan mu je sadržaj beta-karotena i ksantofila te daje najveći randman krupice kod mljevenja Bc Institut, 2017). Sjeme hibrida kukuruza istraživnog u ovom istraživanju dobiveno je od sjemenarske tvrtke Bc Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja d.d., Zagreb. Inokulant Bio-Sil (Dr. Pieper, Njemačka) dobiven je od tvrtke Fanon d.o.o., dok je mliječna kiselina kupljena od BioVit d.o.o. zastupnika Sigme-Aldrich za Hrvatsku. Znanstveno istraživanje provedeno je u Zavodu za hranidbu životinja i Zavodu za specijalnu proizvodnju bilja Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1. Agrotehnika pokusa

Tlo pokusnog polja je euterično smeđe, praškasto ilovaste teksture (Vidaček i sur., 1994). Takvo tlo neutralne je reakcije (pH u 1 M KCl je 6,94), slabo je opskrbljeno humusom (0,2%), ali dobro s fiziološki aktivnim fosforom (41,1 mg/100 g tla) i kalijem (25,0 mg/100 g tla).

Kukuruz je proizveden u uvjetima intenzivne agrotehnike poštujući plodored pšenica – kukuruz – soja. Osnovna gnojidba obavljena je u jesen zaoravanjem 400 kg NPK 7:20:30 ha⁻¹ mineralnog gnojiva na dubinu od 30 do 35 cm. U proljeće je primijenjena predsjedvena gnojidba sa 100 kg ha⁻¹ uree. Predsjetvena priprema tla obavljena je zvrk drljačom nekoliko dana prije sjetve na dubinu od 6 do 9 cm. Sjetva je obavljena strojno sa sijačicama specijaliziranim za sjetvu pokusa kukuruza i to unutar optimalnog roka 22. travnja 2013.

Zaštita od korova provedena je prije nicanja herbicidima na bazi atrazina i metolaklora, te poslije nicanja s herbicidima na bazi aktivne tvari dikamba. Tijekom vegetacije obavljene su dvije međuredne kultivacije kukuruza u V3 i V5 stadiju rasta koje su obavljene sa međurednim kultivatorom uz deponaciju mineralnog gnojiva 175 kg KAN ha⁻¹ u svakoj prihrani. Padaline i temperatura tijekom vegetativnog rasta kukuruza prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Srednja temperatura zraka i padaline u Maksimiru tijekom vegetacijske sezone ispitivanih hibrida kukuruza 2013. godine.

Mjesec	Dekada	Temperatura, °C		Padaline, mm	
		Prosjeak		Ukupno	Prosjeak
Travanj	I	6,4		5,3	
	II	14,9		2,4	
	III	17,7		2,2	
	I-III	13,0	12,7	9,9	56,1
Svibanj	I	19,0		4,9	
	II	16,2		4,1	
	III	15,5		4,5	
	I-III	16,9	16,2	13,5	94,0
Lipanj	I	17,0		2,1	
	II	23,3		3,7	
	III	19,9		5,6	
	I-III	20,1	19,7	11,4	48,7
Srpanj	I	22,5		9,6	
	II	21,7		0,4	
	III	27,9		1,6	
	I-III	24,0	22,8	11,6	33,2
Kolovoz	I	26,9		2,2	
	II	21,9		5,0	
	III	21,2		20,5	
	I-III	23,3	22,6	27,7	145,2
Rujan	I	18,4		4,9	
	II	15,0		7,6	
	III	14,4		7,9	
	I-III	15,9	16,4	20,4	111,9
		18,9	18,28	94,5	489,1

3.2. Priprema uzoraka silaže visoko-vlažnog zrna kukuruza

Zrno kukuruza ubrano je u fiziološkoj zrelosti, ručno, s udjelom suhe tvari od oko 70 %. Prilikom branja nisu uzeti klipovi iz dva krajnja reda svake repeticije.

Nakon branja klipovi su okrunjeni na eksperimentalnom kombajnu (Wintersteiger) Zavoda za specijalnu proizvodnju bilja. Isti dan nakon branja i krunjenja, ukupna masa zrnja svake pojedine repeticije samljevena je na mlinu čekićaru (Ino Brežice d.o.o.) sa sitom veličine pora 8 mm (slika 2.).



Slika 2. Samljeveni uzorci

Samljevena masa zrnja svake repeticije podijeljena je na tri jednaka dijela mase jednog kilograma:

- Jedan dio mase zrnja siliran je bez dodatka inokulanta ili trećeg tretmana, mliječne kiseline
- U drugi dio dodana je pripremljena otopina Bio-Sil inokulanta s liofiliziranim kulturama *Lactobacillus plantarum* 8862 i 8866 (DSM, njem. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) u koncentraciji 300 000 CFU/g svježe mase. Primijenjena je koncentracija prema uputama proizvođača inokulanta.
- U treći dio samljevenog zrnja aplicirana je mliječna kiselina u koncentraciji od 11 g/kg ST.

Svi tretmani silirani su u vakum vrećice (Status, 280 × 360 mm, 25 set, Status d.o.o.) koje su vakumirane na uređaju za vakumiranje i varenje (SmartVac, Status d.o.o.; slika 3.).



Slika 3. Vakumiranje uzoraka

Vakumiranjem je inhibirana prva, aerobna, faza siliranja (Weinberg i Muck, 1996). Za svaki tretman pripremljeni su peteoplikati vakumiranih uzoraka silaža. Uzorci silaže silirani su 182 dana, tijekom siliranja su čuvane na sobnoj temperaturi (20 do 25 °C; slika 4.). Nakon uzorkovanja, svi uzorci su pospremljeni i čuvani na -20 °C do provođenja kemijskih analiza. Neposredno prije provođenja analiza, uzorci su prosušeni na 40 °C 24 sata, i samljeveni kroz sito 1 mm (Cyclotec, FossTecator, Švedska)



Slika 4. Čuvanje uzoraka

3.3. Kemijske analize

3.3.1. Određivanje sadržaja vlage

Količina vlage u uzorcima određena je prema HRN ISO 6496:2001 (Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo, 2001). Posudice za određivanje vlage su prvo izvagane prazne, nakon čega je u njih izvagano 3 g uzorka siliranog kukuruza koji je prethodno izvađen iz zamrzivača u kojem se čuvao nakon uzorkovanja. Posudice s uzorcima su sušene na temperaturi od 103 ± 2 °C. Nakon 24 sata sušenja, posudice s uzorcima su ohlađene na sobnoj temperaturi u eksikatoru. Udio vlage je određen prema razlici masa uzoraka prije i nakon sušenja.

3.3.2 Određivanje sadržaja škroba

Za određivanje sadržaja škroba u uzorcima kukuruza korištena je enzimatska metoda Total starch assay (amyloglucosidase/ α -amylase method, K-TSTA, Megazyme, Irska). 0,1 g uzorka izvagano je u staklene epruvete od 15 ml. U svaku epruvetu dodano je 0,2 ml etanola te je smjesa vorteksirana. Zatim je dodano 3 ml otopine α -amilaze u natrij acetatnom puferu (100 mM, pH 5,0) te je smjesa dobro promiješana vorteksiranjem. Epruvete su zatim kuhane u vodenoj kupelji pri vrenju šest minuta pri čemu je sadržaj vorteksiran svake dvije minute. Nakon vađenja iz kupelji, u svaku je epruvetu dodano 0,1 ml amilglukozidaze. Nakon inkubacije u vodenoj kupelji na 50 °C, 30 minuta, sav sadržaj epruveta je kvantitativno prenesen u odmjerne tikvice od 100 ml. Alikvot otopine je centrifugiran pri 3000 rpm 10 minuta (Centric 322A, Tehnica, Slovenija). 0,1 ml otopine supernatanta odpipetiran je u duplikatu u epruvete od 5 ml te je dodano 3 ml GOPOD reagensa. Smjesa je inkubirana 20 minuta na 50 °C. Nakon hlađenja izmjerena je apsorbancija pri 510 nm (Helios γ , Thermo Electron Corporation, UK). Na temelju dobivenih vrijednosti apsorbancije uzoraka i standarda glukoze izračunat je sadržaj škroba u uzorku.

3.3.3. Određivanje sadržaja šećera

Za određivanje sadržaja šećera korištena je modifikacija Luff-Schoorlove (Schoorl, 1929) i Nelson-Somogyjeve (Somogy, 1945) metode. U odmjernu tikvicu izvagano je 1,5 g uzorka, čemu je dodano oko 50 ml destilirane vode te je stavljen na mućkanje na tresilicu 30 minuta. Nakon mućkanja, u svaku tikvicu dodano je 2 ml Carrez(I) i 2 ml Carrez(II) otopine nakon čega je sadržaj tikvice nadopunjen destiliranom vodom do oznake i dobro promiješan. Sadržaj tikvice profiltriran je preko filter papira, nakon filtracije alikvot od 25 ml filtrata odpipetiran je u tikvicu od 50 ml. Dodano je 15 ml 7,2%-tne otopine HCl i tikvice su inkubirane u vodenoj kupelji na temperaturi od 65-70 °C 5 minuta. Naglo ohlađenoj otopini dodano je 1-2 kapi fenolftaleina i titrirana je 28%-tne otopine NaOH do postojane ljubičaste boje, nakon čega je dopunjena destiliranom vodom do oznake. Otopina je ponovno filtrirana, alikvot filtrata svake otopine odpipetiran je u duplikatu u epruvetu sa čepom. U epruvetu od 20 ml odpipetirano je 0,5 ml filtrata i dodano 0,5 ml destilirane vode, a u posebne epruvete odpipetiran je 1 ml destilirane vode za slijepu probu te 0,5 ml standarda glukoze i 0,5 ml destilirane vode. U sve epruvete dodan je 1 ml bakrene otopine zatvorene gumenim čepovima te kuhane 10 minuta u vodenoj kupelji pri vrenju. Nakon kuhanja i brzog hlađenja u svaku epruvetu dodan je po 1 ml arsenomolibdata. Nakon 5 minuta boja se razvila i dodano je 15 ml destilirane vode, poslije čega je smjesa dobro promiješana te joj je izmjerena apsorbancija pri 540 nm. Na temelju apsorbancija otopina uzoraka i standarda glukoze izračunat je sadržaj ukupnih šećera u uzorku, pri čemu su šećeri u uzorku kvantitativno određeni kao ekvivalenti glukoze(g/kg).

3.4. *In vitro* probavljivost škroba

3.4.1. Određivanje *in vitro* probavljivosti

Za određivanje količine probavljivog škroba korištena je *in vitro* metoda kojom se oponaša proces probavljanja škroba u želucu i tankom crijevu probavnog sustava svinja. Metoda koja je korištena za određivanje *in vitro* probavljivosti škroba opisana je u radu Englyst i sur.(1996), modificiranom prema radu Giuberti i sur. (2012).

U staklenu Erlenmayerovu tikvicu od 50 ml sa šlifanim čepom izvagano je 0,75 g uzorka te je dodano 6 staklenih kuglica. U tikvicu koja je služila za slijepu probu dodani su svi enzimi i staklene kuglice osim uzorka. Nakon staklenih kuglica, u tikvice je dodano 5 ml 0,05 M otopine HCl koja sadrži 5 mg/ml pepsina te je započela inkubacija u kupelji u trajanju od 30 minuta pri temperaturi od 37 °C. Nakon 30 minuta inkubacije, pH vrijednost je podešena na 5,2 dodavanjem 20 mL 0,1 M natrij acetatnog pufera i 5 ml mješavine enzima amilaze (3800 U/ml), pankreatina (48193 FIP-U/g), amiloglukozidaze (300 U/ml) i invertaze (300 U/g). Enzimi i pufer dodavani su u svaku tikvicu u razmaku od 15 sekundi. Nakon dodavanja enzima i pufera nastavljena je inkubacija u kupelji i započelo je oponašanje procesa probavljanja škroba u ileumu probavnog sustava svinje.

Uzorci su uzimani svakih 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 i 360 minuta. Razmak između uzorkovanja iz svake tikvice bio je 15 sekundi redoslijedom kojim je dodavana smjesa enzima. Uzorak je uziman u alikvotu od 0,1 ml. U najkraćem vremenu nakon uzorkovanja epruvete s uzorcima prebačene su u zamrzivač na -20 °C gdje su čuvane do detekcije, kako bi se zaustavila daljnja razgradnja škroba.

Odmah nakon zadnjeg uzorkovanja, sav preostali sadržaj tikvice filtriran je preko filter papira poznate mase, kako bi se odredila probavljivost suhe tvari. Sadržaj tikvice dva je puta ispran destiliranom vodom, nakon toga etanolom te na kraju acetonom. Poslije ispiranja acetonom, filter papiri su prosušeni u sušioniku na 103 °C preko noći. Nakon sušenja izvagani su te je iz razlike mase uzorka prije i nakon inkubacije određena masa probavljene suhe tvari.

Kako bi uzorke pripremili za posljednju fazu mjerenja glukoze u otopini uzorka koja je konačni produkt razgradnje škroba, uzorci su izvađeni iz zamrzivača te im je dodano po 3 ml destilirane vode. Nakon toga svaki je uzorak vorteksiran neposredno prije uzimanja alikvota od 70 µL za određivanje glukoze. U epruvetu s alikvotom dodano je 2 ml GOPOD reagensa te su uzorci ponovno vorteksirani. Uz GOPOD reagens u epruvete koje su služile za slijepu probu dodan je standard škroba, destilirana voda i standardna otopina glukoze u istim alikvotima kao i kod uzoraka. Zatim su svi uzorci inkubirani u vodenoj kupelji prethodno zagrijanoj na 50 °C, te su nakon inkubacije ohlađeni i ponovno vorteksirani prije mjerenja apsorbancije. Apsorbancija je izmjerena pri 510 nm.

Glukoza je određena spektrofotometrijski metodom glukoza–oksidaze [D–glucose assay (GOPOD format), K–GLUC, Megazyme, Irska]. Sadržaj glukoze u alikvotima, a prema tome i u smjesama prilikom probave škroba u određenom vremenu izračunate su na temelju apsorbanije standarda glukoze poznate koncentracije.

3.4.2. Probavljivost suhe tvari

Probavljivost suhe tvari izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$P_{ST} = \frac{(1 - m_{neprobavljeno})}{m_{ST}} \times 100$$

P_{ST} je probavljivost suhe tvari(%), $m_{neprobavljeno}$ razlika masa filter papira nakon filtracije i prosušivanja te praznog prosušenog filter papira, a m_{ST} je masa suhe tvari uzorka koja je bila podvrgnuta *in vitro* metodi probavljivosti.

3.4.3. Brzina probavljivosti škroba

Koeficijent probavljivosti škroba za vrijeme t (DC_t , eng. Digestion Coefficient) izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$DC_t = \frac{(G_t - FG) \times 0,9}{TS}$$

gdje G_t predstavlja količinu glukoze u vremenu t , FG sadržaj slobodne glukoze tj. Ukupnih (eng. Free Glucose) šećera u uzorku, a TS sadržaj ukupnog škroba u uzorku (eng. Total Starch). PROC NLIN metoda (SAS Institute, 2003) korištena je za obradu podataka nelinearne regresije. Pri tome je korištena Marquardtova metoda (procedura iterativne prilagodbe krivulji) za najmanju sumu kvadrata ostatka povezanu s regresijskim modelom (Weurding, 2002).

In vitro probavljivost škroba izračunata je prema jednadžbi kinetike prvog reda:

$$DC_t = D \times (1 - e^{-k_d t}), \text{ pri čemu je } D \leq 100$$

pri čemu je $D \leq 100$ gdje DC_t predstavlja količinu škroba probavljenog u vremenu t , a D predstavlja količinu potencijalno probavljenog škroba koji će probaviti pri brzini k_d (1/h).

3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je PROC GLM procedurom statističkog paketa SAS 9.3 (Statistical Analysis System, 2011). Sadržaji škroba i ukupnih šećera, probavljivost suhe tvari, parametri kinetike probavljivosti škroba i frakcije škroba prema probavljivosti obrađeni su kombiniranom analizom varijance pri čemu je način siliranja bio fiksni efekt, a repeticije slučajni efekti. Statistička signifikantnost bila je postignuta ako je $P \leq 0,05$.

Rezultati i rasprava

4.1. Škrob i šećer

Kukuruz je ratarska kultura koja se zbog svoje zastupljenosti na poljoprivrednim površinama, ali i zbog toga što ga je lako silirati kao cijelu biljku, cijeli klip ili zrno, najčešće silira u Hrvatskoj. Zbog sve veće cijene dosušivanja zrna kukuruza mnogi stočari se odlučuju za spremanje silaže visoko-vlažnog zrna kukuruza.

Prema Grbeši (2008) udio škroba u silaži visoko-vlažnog zrna kukuruza je oko 60%. To je manje nego kod suhog zrna kukuruza koji prema Grbeši (2016) iznosi 64,1%. Xu i sur.(2016) su u svom radu utvrdili 67,6% škroba u sušenom zrnu kukuruza i 65% škroba u siliranom visoko-vlažnom zrnu istog hibrida kukuruza. Silirano zrno je nezrelo pa je zbog toga manji udio škroba nego kod suhog zrna. Vrijednosti sadržaja škroba u uzorcima ovog istraživanja su više od spomenutih vrijednosti te se kreću od 73,06 do 74,99% (tablica 2). Tretman siliranja nije utjecao na njegov sadržaj.

Tablica 2. Sadržaj škroba i šećera u uzorcima silaže visoko-vlažnog zrna kukuruza

Tretman	Škrob	Šećer
	%	
Kontrola	73,73	1,78
Inokulant	74,99	0,22
Mliječna kiselina	73,06	0,10
P	NS	NS
Standardna greška	1,62	0,97

NS, vrijednosti u stupcu nisu statistički značajno različite ($P > 0,05$)

Šećeri su važni kod siliranja jer su oni hrana za bakterije mliječne kiseline koje iz njih proizvode mliječnu kiselinu koja konzervira silažu. Prema Grbeši (2008), sadržaj šećera u zrnu kukuruza iznosi 1,5%, a zbog djelovanja bakterija mliječne kiseline tijekom siliranja može pasti i do deset puta. Šećer sadrži manje energije od škroba pa svakih 1% više šećera smanjuje sadržaj energije. Unatoč tome, on povisuje konzumaciju hrane u svinja i goveda (Grbeša, 2016).

Tretman siliranja nije utjecao na sadržaj ukupnih šećera u ovom istraživanju (tablica 2). Unatoč tome, određene vrijednosti brojčano variraju: sadržaj šećera u tretmanu u kojem su korišteni inokulant i mliječna kiselina iznose 0,22% i 0,10% u odnosu na kontrolni tretman čiji sadržaj iznosi 1,72%. Razlog većoj brojčanoj vrijednosti kontrolnog tretmana je visoka varijabilnost u jednoj repetitiji kontrolnog uzorka.

4.2. Probavljivost suhe tvari

Korištenje silaže visoko-vlažnog zrna kukuruza u hranidbi životinja ima brojne prednosti u odnosu na korištenje suhog zrna. Kukuruz koji se koristi u takvoj silaži ne treba dosušivati, silosi za skladištenje su cijenom pristupačniji, sav kukuruz se prije spremanja u silos melje tako da je spreman za hranidbu odmah nakon izuzimanja iz silosa što olakšava pripremanje obroka za životinje, smanjuje se rizik od kontaminacije kukuruza s mikroorganizmima i insektima. Grbeša (2008) navodi kako se zbog veće vlažnosti zrna, manjeg sadržaja rožnatog endosperma, mljevenja i gnječenja prije siliranja povisuje probavljivost za 30% u odnosu na suho zrno kukuruza.

Probavljivost suhe tvari u uzorcima kretala se od 88,55% do 91,06% i nije se značajno razlikovala između tretmana (tablica 3). Neutvrđeni utjecaj tretman pokazuje da je fermentacija tijekom siliranja neometano išla u svim tretmanima i da su procesi tijekom siliranja jednako djelovali na zrno kukuruza. Benton i sur. (2005) navode kako silaža visoko-vlažnog zrna kukuruza ima veću probavljivost suhe tvari od suhog zrna kukuruza a vrijednosti se obično kreću od 65 do 90%. Jorgensen i sur. (2010) su u svome radu utvrdili da je ilealna probavljivost suhe tvari određena u *in vivo* pokusu viša kod fermentiranih žitarica nego kod suhih. Pa tako za fermentirani ječam iznosi 69% u odnosu na 65% kod suhog zrna, te kod pšenice 77% kod fermentiranog u odnosu na 76% za suho zrno. Iako se radi o brojčano malom poboljšanju, autori ova opažanja objašnjavaju aktiviranjem prirodnih enzima koji pomažu proces probave u tankom crijevu svinja procesom fermentacije.

Tablica 3. Probavljivost suhe tvari u uzorcima silaže visoko-vlažnog zrna kukuruza

Tretman	Probavljivost suhe tvari
	%
Kontrola	89,50
Inokulant	88,55
Mliječna kiselina	91,06
P	NS
Standardna greška	1,42

NS, vrijednosti u stupcu nisu statistički značajno različite ($P > 0,05$)

4.3. Kinetika *in vitro* probavljivosti škroba

Škrob je glavni izvor energije u intenzivnoj hranidbi domaćih životinja. Sadržaj škroba prilično je ujednačen između hibrida kukuruza, a njegova probavljivost u cijelom probavnom traktu peradi, svinja i goveda je 97% ili skoro pa potpuna. Međutim, iskorištenje škroba ne ovisi samo o ukupnoj probavljivosti nego i o mjestu probave te je potrebno poznavati kinetiku probavljivosti škroba kako bi se maksimalno upotrijebio potencijal kukuruza u animalnoj proizvodnji. Koeficijenti probavljivosti silaže visoko-vlažnog zrna kukuruza siliranih s različitim aditivima tijekom šest sati inkubacije prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Koeficijenti probavljivosti škroba u uzorcima silaže visoko-vlažnog zrna kukuruza

Vrijeme inkubacije, (h)	Tretman			P	Standardna greška
	Kontrola	Inokulant	Mliječna kiselina		
0,25	26,74	25,50	25,01	NS	0,93
0,50	42,98	39,60	38,64	NS	1,05
0,75	55,15	51,52	51,41	NS	1,13
1	65,43	64,74	64,52	NS	1,16
2	87,40	93,65	90,91	NS	0,58
3	92,42 ^b	96,21 ^a	93,50 ^b	**	0,37
4	97,47 ^b	100,00 ^a	100,00 ^a	*	0,59
5	98,92	100,00	100,00	NS	0,52
6	99,86	100,00	100,00	NS	0,11

^{ab}Vrijednosti u retku označene različitim slovom su statistički značajno različite; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; NS, $P > 0,05$.

Nakon prva dva sata inkubacije razgradilo se prosječno 90,65% škroba, a dodatak inokulanta ili mliječne kiseline nije utjecao na koeficijente probavljivosti od početka do drugog sata inkubacije. Ostatak se kod tretiranih silaža razgradio do potpunosti u četvrtom satu inkubacije dok je kod kontrole tek u šestom satu došlo do potpune probave škroba. Dodatak aditiva imao je utjecaj na koeficijente probavljivosti škroba siliranog visoko-vlažnog zrna kukuruza samo nakon 3 i 4 sata inkubacije. Najvišu vrijednost su ostvarili uzorci silirani s dodatkom inokulanta dok su uzorci silirani s dodatkom mliječne kiseline imali slične vrijednosti spontano siliranim kontrolnim uzorcima. Ove vrijednosti koeficijenata probavljivosti jasno ukazuju na utjecaj mliječne kiseline na otapanje zeina čime škrob postaje dostupniji probanim enzimima (Hoffman i sur., 2011), ali i proteolitičku aktivnost bakterija mliječne kiseline. Naime, Junges i sur. (2017) su utvrdili da bakterije mliječne kiseline, ali i epifitne bakterije imaju najveći utjecaj na razgradnju zeina u proteinsko-škrobnom matriksu; bakterije pridonose 60,4%, enzimi kukuruza 29,5%, gljivice 5,3% i produkti fermentacije 4,8% proteolizi silaže nekonstituiranog zrna kukuruza.

Giuberti i sur. (2012.) su proveli istraživanje na više vrsta krmiva među kojima je bila i silaža visoko-vlažnog zrna kukuruza. Autori navode kako je u prva dva sata probave probavljeno oko 85% škroba, a nakon četiri sata probave oko 95% škroba silaže visoko-vlažnog zrna kukuruza, što je niže od vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju. Razlog sporije probave škroba u navedenom istraživanju može biti i razlika u korištenom tipu kukuruza kao i korištenom inokulantu koji nije jasno naveden. U istraživanju Kosa (2011) korištena je ista *in vitro* metoda probavljivosti i isti hibrid kukuruza, ali je korišteno suho zrno. Razlike u vrijednostima između ovog i istraživanja Kosa (2011) jasno pokazuju utjecaj siliranja na svojstva zrna kukuruza i posljedični porast probavljivosti škroba – u suhom zrnu se nakon dva sata probavi 79,61% a u siliranom 90,65% škroba. Nadalje, nakon četiri sata inkubacije, Kos (2011) navodi 92,05% probavljenog škroba u suhom zrnu dok u ovom istraživanju nakon četiri sata dolazi do potpune razgradnje škroba.

4.4. Brzina i potencijalna probavljivost frakcija škroba

Brzina *in vitro* probavljivosti škroba i potencijalna probavljivost škroba za uzorke silaže zrna visoko-vlažnog kukuruza je dobivena upotrebom nelinearne regresije u SAS računalnom paketu, te su rezultati prikazani u tablici 5. Dodatak aditiva je utjecao na potencijalnu probavljivost škroba pri čemu su najnižu vrijednost imali kontrolni uzorci (98,46%) dok su uzorci silirani s inokulantom imali najvišu vrijednost (101,42%). Ove vrijednosti prate vrijednosti koeficijenata probavljivosti nakon 3 i 4 sata inkubacije koje upućuju da dodatak aditiva povišuje probavljivost škroba zbog djelovanja bakterija mliječne kiseline i koncentracije mliječne kiseline koja otapa zein.

Tablica 5. Brzina i potencijalna probavljivost frakcija škroba u uzorcima silaže visoko vlažnog zrna kukuruza

Tretman	Potencijalna probavljivost škroba	Brzina probavljivosti škroba
	%	1/h
Kontrola	98,46c	1,29
Inokulant	101,42a	1,02
Mliječna kiselina	100,67b	1,02
P	***	NS
Standardna greška	0,23	0,09

^{abc}Vrijednosti u stupcu označene različitim slovom su statistički značajno različite, ***, P<0,001; NS, P > 0,05

Brzina probavljivosti škroba nije se razlikovala između tretmana unatoč utvrđenim razlikama u koeficijentima probavljivosti nakon tri i četiri sata inkubacije. Unatoč tome, brojčano najvišu vrijednost su imali kontrolni uzorci (1,29 1/h), dok su tretmani s inokulantom i mliječnom kiselinom imali za 0,27 1/h niže vrijednosti. Rezultat kontrolnog tretmana se

poklapa s 1,29 1/h koje je Weurding (2002) dobio u svom istraživanju, s napomenom da je koristio koristili model prilagođen peradi ali istih aktivnosti enzima. Sličnu vrijednost od 1,39 1/h je dobila i Kos i sur. (2011) u svojem istraživanju na suhom zrnju kukuruza istog hibrida.

Iako je očekivano da će brzina biti viša kod uzoraka siliranih s aditivom, u ovom istraživanju to nije utvrđeno. Štoviše, brojčano najviša vrijednost utvrđena je kod kontrolnog uzorka što je u skladu s brojčano najvišim koeficijentima probavljivosti u prvim sat vremena inkubiranja. S obzirom da se nakon jednog sata razgradi 2/3 prisutnog škroba, te vrijednosti su imale viši utjecaj na kinetički model korišten za procjenu brzine probavljivosti škroba.

5. Zaključak

Na temelju rezultata istraživanja promjene kinetike *in vitro* ilealne probavljivosti škroba u silaži visoko-vlažnog zrna kukuruza može se zaključiti slijedeće:

- Dodatak inokulanta i mliječne kiseline tijekom siliranja visoko-vlažnog zrna kukuruza nije utjecao na probavljivost suhe tvari. Dodatak inokulanta u silažu visoko-vlažnog zrna kukuruza je rezultirao višim koeficijentima probavljivosti nakon 3 i 4 sata inkubacije u odnosu na dodatak mliječne kiseline i spontano silirane uzorke kontrole.
- Dodatak aditiva je utjecao na vrijednost potencijalne probavljivosti škroba, ali nije utjecao na brzinu probavljivosti škroba unatoč brojčano višoj vrijednosti kontrolnih uzoraka.

6. Popis literature

1. Bc Institut, <<https://www.bc-institut.hr>>. Pristupljeno 10. ožujka 2017.
2. Benton, J. R., Klopfestein, T. J., i Erickson, G. E. (2005). Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. Nebraska Beef Cattle Reports. 151.
3. Fresh off the cob (2013). Corn Milling 101 Part 2: Where our food & fuel products come from. <<http://freshoffthecob.com>>. Pristupljeno: 16. svibnja 2016.
4. Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo (DZNM; 2001): Stočna hrana – Određivanje vode i udjela drugih hlapljivih tvari, Zagreb, Hrvatska.
5. Domaćinović, M. (2015). Hranidba svinja. Specijalna hranidba domaćih životinja. Poljoprivredni Fakultet Osijek, Hrvatska.
6. Englyst, H. N., Kingman, S. M., i Cummings, J. H. (1992): Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. European Journal of Clinical Nutrition, 46: S33-S50.
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014), Maize. <<http://www.fao.org>>. Pristupljeno: 19. kolovoza 2016.
8. Giuberti, G., Gallo, A., Cerioli, C., i Masoero, F. (2012). In vitro starch digestion and predicted glycemic indeks of cereal grains commonly utilized in pig nutrition. Animal Feed Science and Technology, 174: 163-173.
9. Grbeša, D. (2008). Bc hibridi kukuruza u hranidbi životinja. Bc Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja d.d., Hrvatska.
10. Grbeša, D. (2015): Interna skripta, Voluminozna krma - Silaža, Hrana za životinje
11. Grbeša, D. (2016). Bc hibridi kukuruza u hranidbi životinja. Bc Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja d.d., Hrvatska.
12. Gutierrez del Alamo, A., Verstegen, M. W. A., Den Hartog, L. A., Perez de Ayala, P., Villamide, M. J. (2009). Wheat starch digestion rate affects broiler performance. Poultry Science 88: 1666-1675.
13. Hoffman, P. C., Esser, N. M., Shaver, R. D., i Coblenz, W. K. (2011). Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high moisture corn. Journal of Dairy Science, 94: 2465–2474.
14. Jones, G. M., Donefer, E., i Elliot, J. I. (1970). Feeding Value for Dairy Cattle and Pigs of High Moisture Corn Preserved With Propionic Acid. Department of Animal Science, McDonald Campus of McGill University, Quebec.
15. Jorgensen, H., Sholly, D., Pedersen, A. O., Canibe, N., i Knudsen, K. E. B. (2010). Fermentation of cereals — Influence on digestibility of nutrients in growing pigs. Animal Feed Science and Technology, 134: 56–58.

16. Junges, D., Morais, G., Spoto, M. H. F., Santos, P. S., Adesogan, A. T., Nussio, L. G. i Daniel, J. L. P. (2017). Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. *Journal of Dairy Science*, 100: 9048–9051.
17. Jurišić, M. (2008). *Ag Base – Priručnik za uzgoj bilja, I. Tehnologija (agrotehnika) važnijih ratarskih kultura*. VIP-V-10-9/06., Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek.
18. Kos, M. (2011). Brzina in vitro probavljivosti škroba iz zrna kukuruza kod peradi. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Hrvatska.
19. Lukić, L., Džeba, Z. (2014). Kvalitet stočne hrane i proizvodnja mleka – primenom savremenih metoda ishrane muznih krava, Poljoprivredna stručna služba „Sombor“ d.o.o. Sombor, Srbija.
20. Palaveršić, D. (1963). Žašto su nam potrebni domaći hibridi. *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 13: 237-246.
21. Schoorl, N. (1929) Suikertitraties. *Chemische Weekblad*, 26: 130-134
22. Somogyi, M. (1945). A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 160: 61–68.
23. Vidaček Ž., Sraka M., Husnjak S., i Pospišil M. (1994). Lizimetrijsko mjerenje otjecanja vode iz tla u uvjetima agroekološke postaje Zagreb-Maksimir. Znanstveni skup "Poljoprivreda i gospodarenje vodama", Bizovačke Toplice, 17.-19. studenog 1994. godine, 223-232.
24. Weinberg, Z. G., Muck, R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews* 19: 53-68
25. Weurding, R. E., Veldman, A., Veen, W. A. G., van der Aar, P. J. and Verstegen, M. V. A. (2001): In vivo starch digestion correlates well with rate and extent of starch digestion in broiler chickens. *Jurnal of Nutrition* 131: 2336-2342
26. Weurding, R. E. (2002): Kinetics of starch digestion and performance of broiler chickens. Doktorska disertacija, Wageningen Institute of Animal Science, Wageningen University, Wageningen, Nizozemska.
27. Wilfart, A., Jaguelin-Peyraud, Y., Simmins, H., Nobelt, J., Van Milgen, J. and Montagne, L. (2008). Kinetics of enzymatic digestion of feeds as estimated by a stepwise in vitro method. *Animal Feed Science and Technology*. 141: 171-183.
28. Xu, X., Wang, H. L., Li, P., Zeng, Z. K., Tian, Q. Y., Piao, X. S. and Kuang, E. Y. W. (2016). A comparison of the nutritional value of organic-acid preserved corn and heat-dried corn for pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 214: 95-103.