Promjene sadržaja tokola tijekom skladištenja silaže rehidriranog zrna kukuruza

Jareš, Marieta

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:204:124701

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

PROMJENE SADRŽAJA TOKOLA TIJEKOM SKLADIŠTENJA SILAŽE REHIDRIRANOG ZRNA KUKURUZA

DIPLOMSKI RAD

Marieta Jareš

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Hranidba životinja i hrana

PROMJENE SADRŽAJA TOKOLA TIJEKOM SKLADIŠTENJA SILAŽE REHIDRIRANOG ZRNA KUKURUZA

DIPLOMSKI RAD

Marieta Jareš

Mentor: doc. dr. sc. Kristina Kljak

Zagreb, rujan,2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Marieta Jareš**, JMBAG 0178092511, rođena 30.09.1993. u Bjelovaru, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

PROMJENE SADRŽAJA TOKOLA TIJEKOM SKLADIŠTENJA SILAŽE REHIDRIRANOG ZRNA KUKURUZA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica 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 upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Marieta Jareš**, JMBAG 0178092511, naslova

PROMJENE SADRŽAJA TOKOLA TIJEKOM SKLADIŠTENJA SILAŽE REHIDRIRANOG 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. Zlatko Svečnjak	član	_____

Zahvala

Ovim putem se zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i ljubavi koju mi je pružila tijekom cjelokupnog razdoblja mog obrazovanja.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Kristina Kljak na iznimnom trudu, mnogobrojnim savjetima, strpljenju i velikoj pomoći u izradi ovog rada.

Veliko hvala prof. dr. sc. Darku Grbeši na velikoj motivaciji tijekom diplomskog studija i poklonjenoj literaturi za svako područje za koje sam pokazala interes. Jednako tako se zahvaljujem prof. dr. sc. Zlatku Janječiću za iznimnu pristupačnost te usmjeravanje tijekom mog cjelokupnog studiranja.

Hvala prof. dr. sc. Zlatku Svečnjaku na savjetima pri izradi ovog rada te poticanju istraživačkog razmišljanja.

Također, zahvaljujem se svim mojim profesorima i ostalim djelatnicima Agronomskog fakulteta sveučilišta u Zagrebu na prenošenju znanja te omogućenom završetku studija.

Sadržaj

1. Uvod 1
   1.1. Hipoteze i cilj rada 2
2. Pregled literature 3
   2.1. Tokoli (vitamin E) 3
   2.2. *In vivo* funkcije tokola (vitamina E) kod životinja 5
      2.2.1. Deficijencija i višak tokola (vitamina E) kod životinja 7
      2.2.2. Potrebe za vitaminom E 9
   2.3. Izvori tokola (vitamina E) 9
      2.3.1. Prirodni izvori vitamina E 9
      2.3.2. Sintetski vitamin E 11
   2.4. Tokoli (vitamin E) i zrno kukuruza 12
      2.4.1. Zrno kukuruza 12
      2.4.2. Tokoli zrna kukuruza 12
      2.4.3. Gubici tokola zrna kukuruza 13
   2.5. Siliranje i silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 14
      2.5.1. Silaža visoko vlažnog zrna kukuruza u hranidbi životinja 15
3. Materijali i metode istraživanja 17
   3.1. Hibridi kukuruza 17
   3.2. Siliranje, skladištenje i uzorkovanje 19
   3.3. Kemijske analize 22
      3.3.1. Ekstrakcija tokola 22
      3.3.2. Kvantitativno određivanje pojedinih tokola 22
   3.4. Kinetika razgradnje tokola 24
   3.5. Statistička obrada podataka 24
4. Rezultati 26
   4.1. Sadržaj tokola u suhom i rehidriranom zrnu hibrida kukuruza 26
      4.1.1. Promjene sadržaja α-tokoferola 27
      4.1.2. Promjena sadržaja γ-tokoferola 28
      4.1.3. Promjena sadržaja δ-tokoferola 30
      4.1.4. Promjena sadržaja γ-tokotrienola 31
      4.1.5. Promjena sadržaja ukupnih tokola 33
   4.2. Kinetika razgradnje tokola suhog i rehidriranog zrna hibrida kukuruza 34
5. Zaključak 40
6. Popis literature 41

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Marieta Jareš**, naslova

PROMJENE SADRŽAJA TOKOLA TIJEKOM SKLADIŠTENJA SILAŽE REHIDRIRANOG ZRNA KUKURUZA

Zrno kukuruza je izvor α-, γ- i δ-tokoferola te γ-tokotrienola, no, skladištenje i obrada zrna može smanjiti njihov sadržaj. Kada se zrno kukuruza zbog vremenskih neprilika ili nedostataka mehanizacije ne može ubrati u optimalno vrijeme, ono postaje manje vlažno te mu se mora rehidrirati radi uspješnog siliranja. Siliranje rehidriranog zrna stvara kiseli medij koji utječe na sadržaj bioaktivnih spojeva kao što su tokoli. Cilj ovog rada bio je utvrditi promjene u sadržaju tokola tijekom šesto-mjesečnog skladištenja silaže rehidriranog zrna kukuruza. Zrno sedam hibrida kukuruza (Bc 344, Bc 418b, Bc 424, Bc 525, Bc 572, Kekec i Pajdaš) ubrano je nakon fiziološke zrelosti te rehidrirano do 32% vlage i silirano uz dodatak komercijalnog inokulanta u vakuum vrećicama na sobnoj temperaturi. Vrećice su uzorkovane 0., 21., 38., 63., 100. i 185. dan. Tokoli su u svim uzorcima ekstrahirani heksanom nakon saponifikacije i kvantificirani HPLC metodom. Na temelju sadržaja tokola u svakoj vremenskoj točki skladištenja praćena je dinamika razgradnje tokola u kiselim uvjetima. Hibrid, vrijeme i način skladištenja su značajno utjecali na sadržaj tokola ($P<0,001$) pri čemu je tijekom skladištenja pao sadržaj tokola i u suhom i u siliranom rehidriranom zrnu, a silaže su imale niži sadržaj od suhog zrna istog hibrida. Hibrid Kekec je imao najveću brzinu razgradnje tokola dok je hibrid najmanje brzine razgradnje bio Bc 525. Najveći pad sadržaja ukupnih tokola utvrđen je u razdoblju do 21. dana skladištenja, blaži pad do 38. dana, a od 38. do 185. dana je došlo do stagnacije sadržaja u siliranom rehidriranom zrnu, dok je kod suhog zrna utvrđen značajan pad sadržaja u razdoblju od 100. do 185 dana.

Ključne riječi: silaža zrna kukuruza, tokoli, suho zrno, rehidrirano zrno, kinetika

Summary

Of the master's thesis – student **Marieta Jareš,** entitled

CHANGES IN CONTENT OF TOCOLS DURING STORAGE OF ENSILED REHYDRATED MAIZE GRAIN

Maize grain is the source of α-, γ- and δ-tocopherols and γ-tocotrienols, but storing and processing can reduce their content. When grains cannot be harvested at the optimal period due to adverse weather conditions or lack of mechanization, it does not contain sufficient moisture and needs to rehydrate for successful ensilaging. Ensilaging of rehydrated grain creates an acidic medium that influences the content of bioactive compounds such as tocols. The aim of this research was to determine changes in the content of tocols during six-month storage of rehydrated corn silage. Grain of seven maize hybrids (Bc 344, Bc 418b, Bc 424, Bc 525, Bc 572, Kekec and Pajdaš) was harvested after physiological maturity, rehydrated to 32% of moisture and ensiled with the addition of commercial inoculant in a vacuum bags at room temperature. The bags were sampled on days 0, 21, 38, 63, 100 and 185 of the experiment. Tocols were extracted with hexane after saponification in all samples and quantified by HPLC method. Based on the content of tocols at each storage time point, the dynamics of tocols degradation in acidic conditions was monitored. Hybrid, time, and type of storage had a significant effect on the contents of tocols ($P<0.001$), resulting in reduced tocol content during the storage period, in both dry and ensiled rehydrated grain, and lower content in silages than in dry grain of the same hybrid. Hybrid Kekec had the highest rate of degradation of the tocols, while the hybrid with lowest rate of degradation rate was Bc 525. The largest reduction in content of total tocols was in the period until 21st day of storage, milder reduction occurred until 38th day, and from 38th to 185th day, tocols content stagnated in ensiled rehydrated grain, while in dry grain, a significant reduction occurred in the period of 100th to 185th day.

Keywords: maize grain silage, tocols, dry grain, rehydrated grain, kinetics

1. Uvod

Tokole čini skupina od osam spojeva topivih u mastima s aktivnošću vitamina E. Podijeljeni su u dvije glavne grupe: tokoferole i tokotrienole unutar kojih se nalaze α-, β-, γ- i δ-oblici. Osim u aktivnosti vitamina E, razlikuju se prema kemijskog građi, izvoru te ulozi u organizmu.

Vitamin E je jedan od najvažnijih vitamina u hranidbi životinja i prehrani ljudi, jer je neophodan za integritet i optimalnu funkciju reproduktivnog, mišićnog, krvožilnog, živčanog i imunološkog sustava. Ima niz različitih funkcija, a jedna od najvažnijih je uloga međustaničnog i unutarstaničnog antioksidansa pri čemu ima status glavnog antioksidansa topljivog u mastima u tijelu. Antioksidacijska svojstva tokola omogućuju održavanje strukturnog integriteta stanica, osiguravaju stabilnost eritrocita i održavanje cjelovitosti kapilara, a funkcija protiv nastanka oksidacijskog stresa u stanicama pomaže u sprečavanju pojave artritisa, raka, kardiovaskularnih bolesti, katarakta, dijabetesa i infekcija. Vitamin E djeluje sinergistički s drugim sustavima obrane stanica i na njegovu funkciju utječe nutritivni status drugih hranjivih tvari, kao što je selen. Osim antioksidacijske uloge, vitamin E ima i druge bitne uloge u animalnom i humanom organizmu. Pojedine grupe tokola imaju zasebne funkcije, a utvrđene su i specifične funkcije pojedinih tokola.

Životinje i ljudi ne mogu sintetizirati vitamin E, stoga ga moraju unositi hranom. Potrebe za vitaminom E su to veće što je životinja mlađa i produktivnija. Među peradi najviše vitamina E (50-150 mg/kg) trebaju brzorastući purani, brojlerski pilići, prasad i telići te rasplodni podmladak (DSM, 2016). Vitamin E mogu sintetizirati samo fotosintetski organizmi - biljke, alge i neke cijanobakterije, no tokoferoli se proizvode u biljkama u fotosintetskim i nefotosintetskim dijelovima. Svih osam oblika tokola se pojavljuje u skoro svim krmivima kao zaštitnik njihovih lipida i to ih je više što je viša koncentracija lipida u krmivu. Tokoferoli se nalaze u ulju zrna, lišću i drugim zelenim dijelovima viših biljaka. α-tokoferol je uglavnom prisutan u kloroplastima biljnih stanica, dok se β, γ i δ-homolozi obično nalaze izvan ovih organela. Tokotrienoli se ne nalaze u zelenim dijelovima biljaka, nego omotaču i klici sjemenki i određenih biljnih vrsta. Žitarice u prosjeku sadrže 15 mg/kg vitamina E i to ga je više što je više ulja i zrnju. Znatno veće razine vitamina E sadrži svježa voluminozna krma bogata lišćem (200 mg/kg), zatim dehidrirana lucerna koja sadrži 150 mg/kg dok silaža kukuruza i sijena sadrže samo 10 mg/kg (Gruber Tabelle, 2017). Najvišu razinu vitamina E među krmivima sadrže ulja, pa tako ulje suncokreta sadrži 625 mg/kg, uljane repice 219 a sojino 170 mg/kg (Sauvant, i sur., 2004). Intenziviranjem animalne proizvodnje te prelaskom s pašnjačkog na štalski način držanja životinja, počeli su se javljati znakovi deficita vitamina E, a s tim i proizvodnja sintetskog vitamina E. Međutim, za razliku od ostalih sintetskih vitamina, sintetski vitamin E nije u potpunosti identičan strukturi prirodnog, što uzrokuje manje iskorištenje sintetskog oblika jednake mase.

Kukuruz je danas treća kultura po zastupljenosti u svijetu. U Republici Hrvatskoj je prema zasijanim površinama i ukupnoj proizvodnji najvažnija ratarska kultura. Unatoč tome što kukuruz nije krmivo s najvećim sadržajem tokola (17-47 µg/g ST; Grbeša, 2016), visoki udio kukuruza u obroku ukazuje na značajnost poznavanja kemijskog sastava pojedinih hibrida, a time sadržaja i vrste tokola. Velike su genetske razlike u sadržaju i profilu tokola između kultivara kukuruza. U zrnu kukuruza su prisutni α-, γ- i δ- tokoferoli te γ-tokotrienol, a u većini hibrida dominantan je γ-tokoferol.

U mnogim dijelovima svijeta kukuruz je najčešće korištena žitarica za siliranje: način konzerviranja hrane za životinje s visokim udjelom vlage uz pomoć bakterija mliječne kiseline koje fermentiraju lako dostupne ugljikohidrate do organskih kiselina. Obrade zrna poput mljevenja i siliranja narušavanju konzistenciju perikarpa, te povećavaju dostupnost hranjivih tvari pa tako silaža visoko vlažnog zrna kukuruza ima veću probavljivost buražnog i ukupnog škroba u odnosu na suho zrno, koja se dodatno povećava sa stajanjem. Promjene sadržaja tokola u suhom zrnu kukuruza iznimno su slabo istraživane, a u silaži visoko vlažnog zrna kukuruza do sada nisu istraživane. Stoga je cilj ovog istraživanja bila utvrditi promjene sadržaja tokola siliranog rehidriranog zrna kukuruza različitih hibrida kukuruza, te usporedba s promjenama sadržaja tokola suhog zrna istih hibrida.

1.1. Hipoteze i cilj rada

Hipoteze ovog istraživanja su:

- Hibridi kukuruza će imati varijabilan sadržaj α-, γ- i δ- tokoferola te γ-tokotrienola.
- Tijekom skladištenja, sadržaja tokola će više opadati kod siliranog rehidriranog zrna nego kod suhog zrna.
- Hibridi kukuruza će se razlikovati u kinetici razgradnje tokola.

Na temelju postavljenih hipoteza, cilj ovog istraživanja je utvrditi promjene u sadržaju *α*-, *γ*- i *δ*- tokoferola te *γ*-tokotrienola tijekom šesto-mjesečnog skladištenja suhog zrna i silaže rehidriranog zrna sedam hibrida kukuruza.

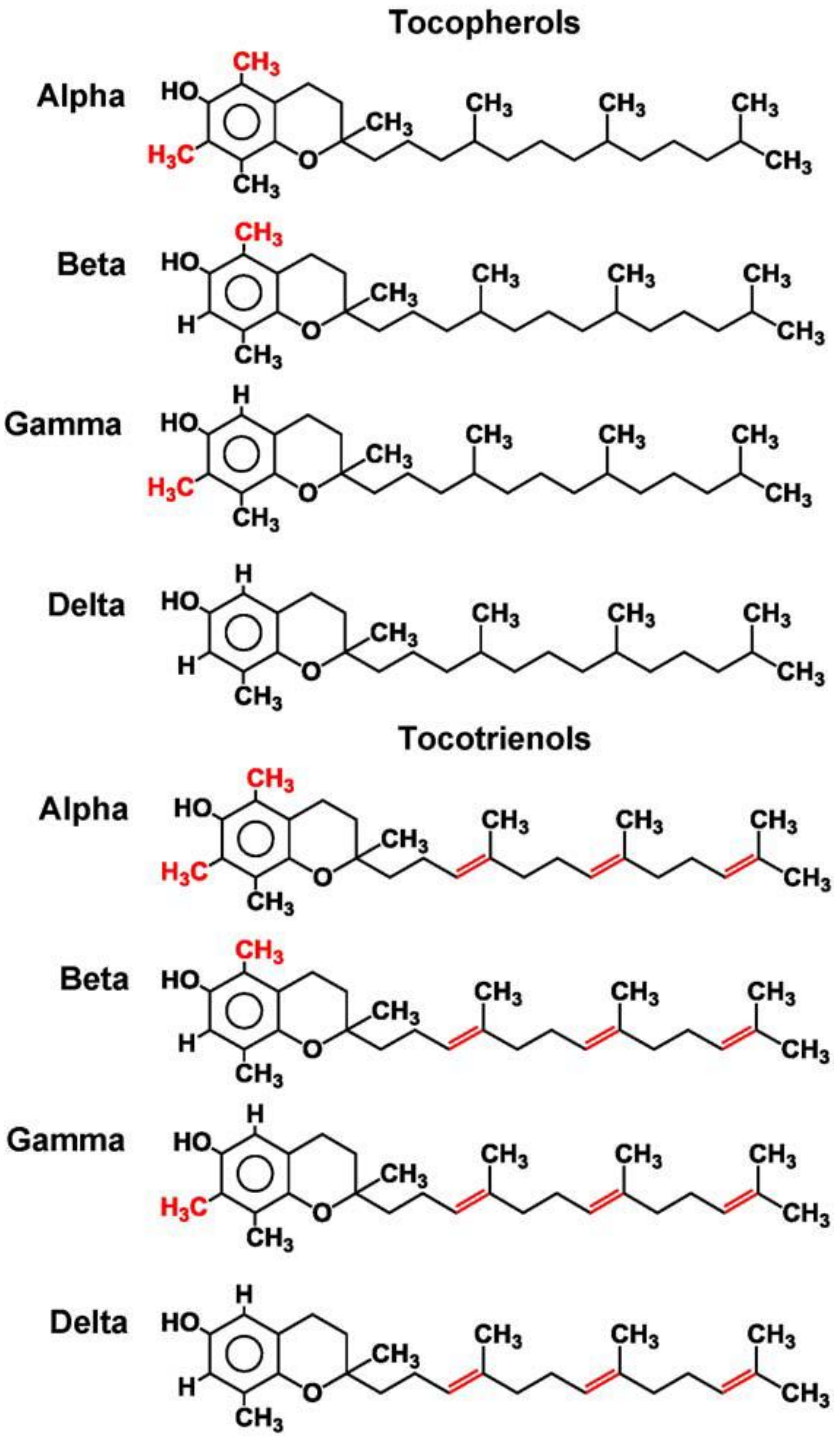
2. Pregled literature

2.1. Tokoli (vitamin E)

Vitamin E je pojam koji se koristi za skupinu od osam tokola topljivih u mastima koji se prirodno pojavljuju, pokazuju antioksidacijsku aktivnost i nutritivno su važni. Tokole čine dvije glavne grupe: tokoferoli i tokotrienoli. Spojevi unutar obje grupe imaju različiti aktivnost vitamina E kod životinja i ljudi, a sintetizirani su u višim biljkama i cijanobakterijama (EFSA, 2006).

Tokoferoli i tokotrienoli se razlikuju prema prisutnosti tri dvostruke veze na lancu s 15 ugljikovih atoma, a ime tokotrienol zapravo označava tokoferol s pravim izoprenskim bočnim lancem (Aggarwal i sur., 2010). I tokoferoli i tokotrienoli mogu biti u α- (alfa, 5,7,8-trimetil), β- (beta, 5,8-dimetil), γ-(gama, 7,8-dimetil) i δ- (delta, 8-metil) obliku, ovisno o broju i položaju metilne skupine na kromanolnom prstenu (slika 1) i imaju mnogo izomera koji se razlikuju po broju i položaju metilne skupine na pobočnom lancu (Brigelius-Flohe i sur., 2002). Osim navedenih razlika u kemijskoj strukturi, tokoli se razlikuju po aktivnosti pa tako najvišu biološku antioksidacijsku aktivnost ima d-α-tokoferol (RRR-tocopherol) (Langman, 2003). To potvrđuju Atkinson i sur. (2008) te navode da je spomenuti oblik oko šest puta aktivniji od γ-tokoferola te da γ-tokoferol pokazuje najmanje 32 puta veću antioksidacijsku aktivnost od δ-tokoferola.

Tokoli se također razlikuju prema aktivnosti vitamina E. Prema Wu (2018), d-α-tokoferol ima najvišu aktivnost vitamina E (1,49 IJ/mg), dok ostali tokoferoli imaju značajno nižu: d-β-tokoferol 0,12, d-γ-tokoferol 0,05 i d-δ-tokoferol 0,006 IJ/mg. Tokotrienoli imaju nižu aktivnost od tokoferolnih analoga; tako d-α-tokotrienol ima aktivnost od 0,32 IJ/mg), d-β-tokotrienol 0,05 IJ/mg dok, d-γ-i d-δ-tokotrienol ne pokazuju vitamin E aktivnost.



Slika 1. Kemijska struktura tokoferola i tokotrienola

Izvor: Aggarwal i sur. (2010)

2.2. *In vivo* funkcije tokola (vitamina E) kod životinja

Životinje i ljudi ne mogu sami sintetizirati vitamin E pa ga moraju unositi hranom. S obzirom na to da je vitamin E neophodan za integritet i optimalnu funkciju reproduktivnog, mišićnog, krvožilnog, živčanog i imunološkog sustava, (Bendich, 1987; McDowell i sur., 1996, McDowell, 2000) on predstavlja jedan od najvažnijih vitamina u hranidbi životinja i prehrani ljudi.

Vitamin E ima niz različitih funkcija, a jedna od najvažnijih je uloga međustaničnog i unutarstaničnog antioksidansa (Mc Dowell, 2000), pri čemu je vitamin E glavni antioksidans topljiv u tjelesnim mastima (Galanakis, 2017). Budući da se nalazi u staničnim membranama, ondje štiti polinezasićene masne kiseline (PUFA) membranskih fosfolipida od peroksidacijske degradacije i nastanka slobodnih radikala (Brigelius-Flohe i Traber, 1999; Kuchan i sur., 2016). Na taj način oksidacija vitamina E štiti staničnu membranu od oštećenja. U odsustvu dovoljne količine tokoferola, lipidni hidroperoksidi mogu uzrokovati oštećenje staničnog tkiva te narušiti strukturalni integritet stanica i uzrokovati metaboličke poremećaje (McDowell, 2000). Sljedeći autori također ukazuju na antioksidacijsku važnost vitamina E pa tako Guzman i sur. (1989) utvrđuje da antioksidacijska svojstva osiguravaju stabilnost eritrocita i održavanje cjelovitosti kapilara, a Galanakis (2017) navodi da antioksidacijska funkcija vitamina E protiv oksidacijskog stresa u stanicama pomaže u sprečavanju pojave artritisa, raka, kardiovaskularnih bolesti, katarakta, dijabetesa i infekcija.

Uz već navedene osnovne uloge, McDowell (2000) navodi dodatne funkcije vitamina E, uključujući reakcije fosforilacije, ulogu u sintezi vitamina C, ulogu u metabolizmu sumpornih aminokiselina. Također, utvrđena je uloga vitamina E u reakcijama oksidacijske redukcije, u reguliranju biosinteze DNK unutar stanica te metabolizmu vitamina B12. Daljnja uloga vitamina E je inhibiranje agregacije trombocita kod svinja (McDowell, 2000), a može imati ulogu inhibiranja peroksidacije arahidonske kiseline, što je potrebno za stvaranje prostaglandina uključenih u agregaciju trombocita (Machlin, 1991). Novija istraživanja ukazuju da povećani unos vitamina E može smanjiti rizik od Alzheimerove bolesti u starijim populacijama (Li i sur., 2011).

Vitamin E djeluje sinergijski drugim sustavima obrane stanica i na njegovu funkciju utječe nutritivni status drugih hranjivih tvari, kao što je selen. S porastom aktivnosti stanica (npr. mišićne stanice) raste priljev lipida za energetsku opskrbu te je veći rizik od oštećenja tkiva ako je razina vitamina E ograničena. Uz navedene sinergijske funkcije vitamina E i selena, utvrđeno je sinergijsko djelovanje u osiguravaju obrane organizma od toksičnosti teških metala (McDowell, 2000). Zatim, Guzman i sur., (1989) navode sinergijsko djelovanje u održavanju kvalitete sperme. Osim odnosa vitamina E i Se, vitamin E, vitamin C i β-karoten kao antioksidacijski vitamini zajedno imaju važnu ulogu u mehanizmu obrane tkiva protiv oštećenja slobodnim radikalima. *In vitro* i *in vivo* pokusi ukazuju da antioksidacijski vitamini

poboljšavaju različite aspekte staničnog i humoralnog imuniteta. Poboljšavaju imunitet održavanjem funkcionalnog i strukturnog integriteta važnih imunoloških stanica. Kompromitirani imuni sustav utječe na zdravlje životinja i rezultira smanjenjem učinkovitosti proizvodnje životinja kroz povećanu osjetljivost na bolesti, što dovodi do povećane pojave bolesti i smrtnosti životinja. Vitamin E i Se imaju značajnu ulogu u zaštiti leukocita i makrofaga tijekom fagocitoze, mehanizma kojim životinje imunološki uništavaju invazivne bakterije (Badwey i Karnovsky; 1980, McDowell, 2000). Vitamin E je uključen u stimulaciju sinteze serumskih protutijela, osobito IgG antitijela (Tengerdy, 1980). Zaštitni utjecaj vitamina E na zdravlje životinja može biti uključen u njegovu ulogu u smanjenju imunosupresivnih glukokortikoida (Golub i Gershwin; 1985; McDowell, 2000).

Poseban naglasak u hranidbi preživača stavljen je na vitamin E zbog toga što smanjuje oksidacijski stres i poboljšava zdravlje mliječnih krava (Miller i sur., 1993). Visoka razina vitamina E (1000 mg/d) u obroku tijekom razdoblja suhostaja ima pozitivan učinak na zdravlje vimena kod mliječnih krava u ranoj laktaciji, što dokazuje smanjena učestalost pojave (sub)kliničkog mastitisa nakon teljenja (Smith i sur., 1984; Weiss i sur., 1990). Pridonosi funkcijama leukocita kod goveda (Politis et al., 2004) te ima antioksidacijsko djelovanje u stanicama jetre (Bouwstra i sur., 2008). Mahan (2008) navodi da dovoljna razina vitamina E u obroku poboljšava reproduktivne učinke, povećava razinu α-tokoferola u kolostrumu, mlijeku i mesu te smanjuje smrtnost u prasadi, ali i povećava kvalitetu smjese smanjujući mogućnost njene oksidacije, smanjuje gubitak poželjne boje mesa i produljuje trajnost svinjskih prerađevina. Vitamin E smanjuje porast tjelesne temperature kod pilića u stresnim uvjetima izazvanim vrlo visokom temperaturom zraka i tim putem smanjuje smrtnost (Kan i sur., 1993; Qureshi i sur., 2000). Visoka razina vitamina E u obroku poboljšava sve proizvodne parametre u tovu pilića (Weber i sur., 1999, Bird i sur., 1999, Siegel i sur., 2000).

Istraživanje učinka tokoferola i tokotrienola u otklanjanju slobodnih radikala pokazuje da su tokotrienoli superiorniji zbog njihove bolje raspodjele u masnim slojevima stanične membrane. Razlog tome je činjenica da nezasićeni bočni lanac tokotrienola omogućuje učinkovitije prodiranje u tkiva koja imaju zasićene masne slojeve kao što su mozak i jetra (Suzuki i sur., 1993). Zatim, Sen i sur. (2006) navode da tokotrienoli posjeduju moćna neuroprotektivna i antikarcinogena svojstva te svojstva snižavanja kolesterola, koja u toj mjeri tokoferoli ne pokazuju. Učinke tokotrienola u sprečavanju razvoja raka dojke navode Shun i sur. (2004), debelog crijeva Agarwal i sur. (2004), jetre Sakai i sur. (2006), pluća Kashiwagi i sur. (2008), kože Chang i sur. (2009), prostate Constantinou (2009) kod ljudi te mliječne žlijezde kod miševa McIntyre i sur. (2000). Rezultati ukazuju da γ- i δ-tokotrienol pokazuju veću antikancerogenu aktivnost od α- i β-tokotrienola (Wada i sur., 2005). Također, Aggarwal i sur. (2010) uz isticanje bitne uloge tokotrienola, navode da različiti izomerni oblici variraju u sposobnosti snižavanja razine kolesterola te navode δ-tokotrienol kao najuspješniji, zatim slijede γ-, α-, β-tokotrienol. Serbinova i sur. (1994) navode sljedeće čimbenike kao razloge za bolju učinkovitost tokotrienola: strukturne razlike, tokotrienoli mogu biti ravnomjernije raspodijeljeni u lipidni dvosloj, kromanolni prsten tokotrienola može učinkovitije komunicirati

s lipidnim dvoslojem, tokotrienoli mogu imati veću reciklažnu učinkovitost, a stanični unos tokotrienola je 70 puta veći od unosa tokoferola.

Mnoga istraživanja ukazuju na različito djelovanje pojedinih tokola pa tako Atkinson i sur. (2008) ukazuju na jedno od rijetkih istraživanja u kojima su istraživani svi tokoferoli, a čiji rezultati dokazuju da je α-tokoferol, ali ne i β-, γ- i δ-tokoferol, povećao polarizaciju fluorescencije pirena u intestinalnim četkastim membranama i stoga su zaključili da samo α-tokoferol smanjuje fluidnost membrane. Isti autori ukazuju na dva istraživanja, rezultati prvog govore da je α-tokoferol oko 1,4 puta bolji čistač radikala nego γ-tokoferol, koji je oko 2,5 puta bolje od δ-tokoferola, dok su u drugom istraživanju utvrđeni omjeri učinkovitosti α-tokoferola naprema γ-tokoferolu 1,7 i γ-tokoferola naprema δ-tokoferolu jednaki 2,5. Međutim, Suarna i sur. (1993) navode da je antioksidacijska aktivnost α-tokotrienola slična onoj α-tokoferola. Uz ranije navedena svojstva i učinke α-tokola, Zingg i Azzi (2004) navode da α-tokoferol inhibira proliferaciju stanica, agregaciju trombocita i primatelje monocita. Navedeni učinci nisu povezani s antioksidacijskom aktivnošću vitamina E i odražavaju specifične interakcije α-tokoferola s enzimima, strukturnim proteinima, lipidima i faktorima transkripcije. S druge strane, Wagner i sur. (2004) utvrđuju da γ-tokoferol ima bolji antikancerogeni učinak u prevenciji pojave određenih vrsta raka i infarkta miokarda kod ljudi od α-tokoferola. Nadalje, γ-tokotrienol ima funkciju u sprječavanju razvoja povišenog krvnog tlaka te smanjenja lipidnih peroksida u plazmi i krvnim žilama (Aggarwal i sur., 2010).

2.2.1. Deficijencija i višak tokola (vitamina E) kod životinja

Vitamin E pokazuje najveću svestranost među vitaminima u rasponu znakova deficita kod životinja. Znakovi nedostataka razlikuju se među vrstama, ali i unutar iste vrste životinja. Simptomi deficijencije se manifestiraju na neuromuskularnim, krvožilnim i reproduktivnim sustavima (Langman i sur, 2003). Potrebna količina vitamina E u obroku može varirati ovisno o faktorima kao što su razine PUFA, selena, antioksidansa i sumpornih aminokiselina u obroku. Mišićna distrofija je poremećaj koji se pojavljuje kod gotovo svih vrsta domaćih životinja, a uzrokovan je nedostatkom vitamina E u organizmu (McDowell, 2000). Dolazi do degenerativnog razaranja stanica poprečno-prugastih mišića što uzrokuje bljedilo pojedinih vlakana te mišići imaju bijele pruge po snopovima (Smith, 1970; McDowell, 2000). Istraživanja su pokazala pozitivan odnos između sadržaja selena u tlu i zemljopisne pojave mišićne distrofije u svijetu (McDowell, 2000).

Nedostatak vitamina E i selena kod teladi i janjadi dovodi do nastanka bolesti bijelih mišića (eng. white muscle disease). Bolest bijelih mišića javlja se u dva klinička oblika; prvi je tip mišićne distrofije kod kojih su mladi preživači mrtvorođeni ili uginu unutar nekoliko dana nakon rođenja poslije iznenadnog fizičkog napora. Drugi oblik (odgođeni) razvija se kod janjadi najčešće u dobi od 3 do 6 tjedana, ali se može pojaviti 4 mjeseca nakon rođenja. Znakovi

bolesti kod teladi se obično očituju u dobi od 1 do 4 mjeseca. Bolest karakterizira slabost, ukočenost i grčenje mišića, životinje teško stoje i unakrsno hodaju, teško sišu jer je zahvaćena muskulatura jezika (McDowell, 2000). Manji broj autora navodi poremećaje nastale uslijed nedostatka vitamina E kod starijih dobnih kategorija preživača. Međutim, zabilježena je degenerativna miopatija kod odraslih goveda (Hutchinson i sur., 1982), dok su kod junica mogući abortusi; mrtvorođena telad i zaostajanje posteljice (Hutchinson et al., 1982). Zabilježena su miopatska stanja goveda hranjenih sa žitaricama tretiranih s propionskom kiselinom, koja uništava vitamin E. Kod visokoproizvodnih mliječnih koza, nedostatak se očitovao u slaboj involuciji maternice, uz pratnju zaostajanja posteljice i metritis (McDowell, 2000). Potrebne su adekvatne količine vitamina E u obroku kako bi se spriječili oksidacijski okusi mlijeka. Učinkovitost prijenosa u mlijeko je manja od 2% (NRC, 1989).

Kod svinja je nedostatak vitamina E povezan s nedostatkom selena, budući da razina obje tvari u obroku mora biti niska da bi dovela do znakova nedostatka. Na srcu se mogu pojaviti hemoragične lezije koje dovode do bolesti dudolikog srca. Nedostatak vitamina E i selena kod svinja je često povezan s iznenadnom smrću. U većini slučajeva nisu zapaženi klinički znakovi bolesti prije uginuća (McDowell, 2000). Klinički znakovi uključuju periferna crvenila (osobito ušiju), abdominalno disanje i slabi puls, neposredno prije smrti. Najčešće patološke lezije uključuju nekrozu jetre, degenerativnu miopatiju srčanih i skeletnih mišića, edem, hemoglobinuriju, gušenje, krvarenje u različitim tkivima i žućkasto obojenje masnog tkiva (Piper i sur., 1975; McDowell, 2000). Nedostatak ovih tvari pospješuje pojavu mastitisa u laktirajućih krmača, želučanog ulkusa, neplodnosti i neurednog izgleda kože (McDowell, 2000).

Nedostatak vitamina E u peradi može dovesti do tri najčešće manifestacije deficijencije; esudativne dijateze, encefalomalacije i mišićne distrofije (Scott i sur., 1982). Esudativnu dijatezu karakterizira propusnost kapilara koja dovodi do nastanka edema kod pilića te na posljedično stvaranje plavo-zelenog obojenja kože. Pilići su manje aktivni te smanjuju konzumaciju hrane, a dulji nedostatak dovodi do uginuća (McDowell, 2000). Encefalopatija zahvaća piliće od 2 do 6 tjedana starosti, a rezultat je hemoragija i edema unutar malog mozga nastalog zbog propusnosti krvnih žila. Encefalomalacija dovodi do živčanih simptoma koji se očituju u nekoordiniranom kretanju, trzanjem ispruženih nogu te savijanjem i zabacivanjem glave (NRC, 1994). Kada je nedostatak vitamina E praćen deficitom sumpornih aminokiselina u obroku, piliće zahvaća jaka mišićna distrofija, osobito mišića prsa i to najčešće u četvrtom tjednu starosti (Scott i sur., 1982; McDowell, 2000). Dugotrajan nedostatak vitamina E može dovesti do trajne sterilnosti (NRC, 1994), a embrionalna smrtnost je visoka tijekom prva četiri dana inkubacije i tijekom kasnijih faza kao rezultat cirkulacijskog zatajenja. Pijetlovi postaju neplodni jer spermiji postaju neaktivni (Barroeta i sur., 2012).

Životinje podnose relativno visoke koncentracije vitamina E u hrani. Međutim, oksidirani tokoferoli postaju slobodne vrste radikala te mogu biti toksične za životinje (Wu, 2018). Prema istom autoru, simptomi hipervitaminoze su oštećenja jetre, neumjereno nakupljanje bijele masti u tijelu, atrofija testisa, spori razvoj sekundarnih spolnih oznaka,

usporeni rast i letalnost embrija. U ljudi može dovesti do oštećenja srca. Stoga količina vitamina E ne smije prijeći najviše dopuštene razine za pojedine vrste životinja. Gornja dopuštena količina vitamine E u hrani svinja je između 1000 i 2000 mg/kg hrane, dok je za mliječne krave dopušteno do 75 mg/kg tjelesne mase ili preračunato za kravu tešku 650 kg do 4850 mg/d (INRA, 2018).

2.2.2. Potrebe za vitaminom E

Određivanje minimalne potrebne količine vitamina E početni je korak u utvrđivanju njegovih ukupnih potreba. Naime, mnoštvo čimbenika mijenja potrebe životinje za vitaminom E. Općenito, brzorastuće i rasplodne životinje trebaju više vitamina E od tovnih. Potrebe tovne peradi, preživača i svinja se kreču u rasponu od 50 do 150 mg/kg ST hrane (Grbeša, 2016). Nadalje, što je viši sadržaj lipida u tijelu ili hrani to su više potrebe za vitamin E da bi spriječile oksidacije. Smatra se da u hrani treba biti 2-3 mg vitamina E po gramu nezasićenih masnih kiselina. Ako se želi da meso i jaja imaju svježe izgled, boju i sočnost u hrani bi trebalo biti barem 200 mg/kg vitamina E. Kravama se daju izrazito visoke količine od 500 do 1000 mg/dan vitamina E radi smanjenja učestalosti mastitisa i broja somatskih stanica u mlijeku. Međutim, potrebna razina vitamina E u hrani životinja jako ovisi o broju i intenzitetu djelovanja interferirajućih čimbenika kao što su Se, Zn Cu i Mn koji kao sastojci antioksidacijskih enzima štede potrošnju vitamina E ali i soli Ca, Mg i Fe koje troše vitamin E. Isto tako puno višestruko nezasićenih masnih kiselina u hrani te raketljiva mast povisuje potrebnu koncentraciju vitamina E za nekoliko puta iznad minimalnih potreba (Grbeša, 2017).

2.3. Izvori tokola (vitamina E)

2.3.1. Prirodni izvori vitamina E

Svih osam oblika vitamina E (α-, β-, γ- i δ-tokoferoli i tokotrienoli) se pojavljuju u raznoj hrani, ali u različitim količinama (Hui, 1991; Macrae i sur., 1993). Vitamin E sintetiziraju samo fotosintetski organizmi – biljke, alge i neke cijanobakterije (Combs i sur., 2017) pri čemu se tokoferoli proizvode u biljkama u fotosintetskim i nefotosintetskim dijelovima (Torbert i sur, 2002). U fotosintetskim tkivima tokoferoli su pohranjeni u kloroplastima i uključeni su u uklanjanje slobodnih radikala (Torbert i sur., 2002) i zaštitu fotosintetskog aparata od lipidne peroksidacije. U nefotosintetskim tkivima tokoferoli su neophodni za zaštitu višestruko-

nezasićenih masnih kiselina i poboljšanje stabilnosti pohranjenih lipida štiteći ih od autooksidacije (Goffman i sur, 2001).

Tokoferoli su prisutni u ulju zrna, lišću i drugim zelenim dijelovima viših biljaka. γ-tokoferol je često dominantan oblik vitamina E u zrnu i u ulju zrna (Torbert i sur., 2002), a zelene biljke često sadrže više vitamina E od žutih (Combs i sur., 2017). α-tokoferol je uglavnom prisutan u kloroplastima biljnih stanica, dok se β-, γ- i δ-homolozi obično nalaze izvan ovih organela (Hess, 1993). Nasuprot tome, tokotrienoli se ne nalaze se u zelenim dijelovima biljaka, nego omotaču i klici sjemenki i žitarica određenih vrsta (Combs, 1992). Sav α-tokoferol u krmi je u obliku izomera, d-α-tokoferola. To je oblik vitamina E kojeg animalni organizam može najbolje iskoristiti (Hui, 1991; Macrae i sur. 1993), njegova biološka aktivnost je najveća.

Vitamin E je prisutan u većini jestivih ulja kao što je pšenično, rižino (0,035%), ječmeno (0,012%), zobeno (0,03%), kokosovo (0,019%) i palmino (0,044%,; Aggarwal i sur., 2010). Najbogatiji prirodni izvori d-α-tokoferola su biljna ulja, kao na primjer; ulje pšeničnih klica, zrna suncokreta i ulje šafranike, dok su izvori d-γ-tokoferola ulja kukuruza i soje. Tako je pšenično ulje najbogatiji prirodni izvor α-tokoferola – sadrži 0,9-1,3 mg/g a α-tokoferol čini oko 60% ukupnih tokoferola ulja pšenice. Pojedini dijelovi zrna, osobito endosperm i klice, mogu sadržavati tokotrienole u esterificiranom obliku, za razliku od tokoferola koji postoje samo kao slobodni alkoholi (Combs i sur, 2017). Ako su biljna ulja zahvaćena oksidacijom, ne samo da je u njima razina vitamina E niska, već uništavaju vitamin drugih komponenata obroka i iscrpljuju vitaminske zalihe iz životinjskih tkiva (Liu i Huang, 1996). Većina nusproizvoda uljarica koji se koriste u hranidbi životinja gotovo su bez ulja zbog ekstrakcije ulja otapalima (McDowell, 2000).

Žitarice su važni izvori tokola, međutim, puno veće koncentracije nalaze se u voluminoznom krmivu poput kvalitetnog sijena, osobito lucerne. Koncentracija tokoferola u suhoj tvari svježe trave je 5 do 10 puta veća nego kod nekih žitarica i nusproizvoda žitarica (Hardy i Frape, 1983). To potvrđuju Barroeta i sur. (2012) koji navode da žitarice sadrže između 10 i 40 μg/g ST tokola, preciznije ječam 35 – 40, zob 20 – 25, a kvalitetna mlada trava 200 μg/g ST. Odrasli preživači koji su na paši ili se hrane s najmanje 50% zelene krme u obroku trebaju 67% manje vitamina E od krava koje se hrane konzerviranom krmom (Grbeša, 2017). Međutim, Harvey i Bieber-Wlaschny (1988) upozoravaju da je u tim krmivima velika varijabilnost u sadržaju vitamina E, a stabilnost njihovih tokoferola je mala i dolazi do značajnih gubitaka prilikom konzerviranja krme (Dove i Ewan, 1991; McDowell i sur., 1996).

Životinjska tkiva gotovo isključivo sadrže α-tokoferol, osim jaja gdje prevladava γ-tokoferol (Macrae i sur, 1993; Hui, 1991). Međutim, ona obično sadrže niske količine α-tokoferola, a najviše razine su u masnim tkivima. Te se razine razlikuju prema unosu vitamina, tj. hranidbom se može utjecati na razinu α-tokoferola u tkivima. Budući da se vitamin E nalazi u mastima i uljima, pri njihovom smanjenom unosu očekuje se i smanjenje unosa vitamina E. Dominantni dio ukupnih tokoferola u obroku (70% ukupnih tokoferola) u obrocima za hranidbu životinja u SAD-u čini γ-tokoferol. Kao i u masnim tkivima, sadržaj vitamina E u

mlijeku je vrlo promjenjiv. Može postojati peterostruka sezonska razlika u sadržaju α-tokoferola u kravljem mlijeku. S druge strane, sadržaj vitamina E u kolostrumu je vrlo značajan jer se mladunčad većine domaćih vrsta životinja rađa s vrlo malom razinom u tkivima (McDowell, 2000). Kolostrum mliječnih krava sadrži u prosjeku 1,9 µg/mL α-tokoferola i kroz 30 dana se taj sadržaj smanjuje do 0,3 µg/mL mlijeka (Hidiroglou, 1989). Unatoč visokim razinama γ-tokoferola u obroku, Stone i sur. (2003) su utvrdili omjer sadržaja *α*-tokoferola naprema γ-tokoferola od 5 naprema 1 u humanom mlijeku.

2.3.2. Sintetski vitamin E

Životinje ne mogu sintetizirati vitamin E te ga moraju unositi putem obroka. Intenziviranjem stočarske proizvodnje te prelaskom s pašnjačkog na štalski način držanja životinja, počeli su se javljati znakovi deficita vitamina E, a s tim i proizvodnja sintetskog vitamina E (NRC, 1973; Mahan, 2008). Sintetski α-tokoferol se prodaje kao vitamin E, međutim, za razliku od ostalih sintetskih vitamina, sintetski α-tokoferol nije u potpunosti identične strukture prirodnog α-tokoferola. Prirodni α-tokoferol se sastoji od jedne molekule (d-α-tokoferol), dok je sintetski vitamin E racemična (rac) smjesa 8 izomera (all-rac-α-tokoferol) od kojih je samo jedan od izomera identičan RRR-α-tokoferolu. Starija terminologija za prirodni α-tokoferol je "d-α-tokoferol" dok se sintetski vitamin E naziva "dl-α-tokoferol" (The United States Pharmacopeia (USP), 1999).

Razlike u strukturi između sintetskog i prirodnog vitamina E uzrok su i različitom iskorištenju ova dva oblika. USP (1999) je objavila vrijednost internacionalne jedinice (IJ) za dva izvora vitamina E u pokušaju izjednačavanja prirodnih i sintetskih izvora. Koristeći istraživanja resorpcije kod fetusa štakora, ustanovljeno je da prirodan izvor vitamina E posjeduje oko 36% veću biološku aktivnost nego jednaka masa sintetskog (Mahan, 2008). Međutim, usporedbom jednakih količina IJ prirodnog i sintetičkog vitamina E u obroku, izmjerena je veća količina vitamina E u kolostrumu krava, mlijeku te u tkivu prasadi pri rođenju i odbiću uz korištenje prirodnog izvora vitamina E (Lauridsen i sur., 2002; Mahan i sur., 2008). U tri studije usporedbe prirodnog i sintetskog vitamina E, prirodni izvor vitamina E je imao bolji prijenos u serum, jetru i kolostrum te je izmjerena veća koncentracija tokoferola u mlijeku kod korištenja prirodnog izvora. Iz toga su izračunati sljedeći ekvivalenti; 1,61 u serumu i omjer 1,89 u jetri, a u krmačinom kolostrumu i mlijeku prosječan ekvivalent od 1,58. To znači da su vrijednosti ekvivalenta bile znatno iznad službeno priznatog (1,36) omjera pretvorbe, što potvrđuju i novija istraživanja na svinjama gdje je utvrđen ekvivalent od 1,75 do 2,25 u korist aktivnosti vitamina E iz prirodnih izvora (Mahan, 2008). Nedavna istraživanja jasno pokazuju da dvostruko manje doze prirodnog vitamina E bolje sprečavaju oksidaciju nezasićenih masti (ulja) kukuruza, soje i osobito lana, nego sintetski vitamin E. Isto tako prirodni vitamin E bolje smanjuje oštećenja mišića u trkaćih konja i više ga se nakuplja u jetri od sintetskog vitamina E

(Grbeša, 2016). Također, veća je učinkovitost iskorištenja kod manjeg unosa sintetskog α-tokoferola (Mahan, 2008).

2.4. Tokoli (vitamin E) i zrno kukuruza

2.4.1. Zrno kukuruza

Kukuruz je danas, nakon riže i pšenice, treća kultura po zastupljenosti u svijetu. U Republici Hrvatskoj je prema zasijanim površinama i ukupnoj proizvodnji najvažnija ratarska kultura. U prošlosti je zrno kukuruza bilo glavna hrana ljudi, no danas se malo upotrebljava za izravnu prehranu ljudi, uglavnom kao kukuruzni kruh ili kuhana brašnasta masa. Iako se još upotrebljava za prehranu ljudi u Južnoj Americi i Africi, u Europi i Republici Hrvatskoj glavna mu je namjena prehrana domaćih životinja (Kljak, 2012). Kukuruz ima povoljan kemijski sastav i zato je njegov udio u obroku životinja velik. Poznavanje njegovih kemijskih i fizikalnih svojstava, a s time i sadržaj i profil vitamina E u zrnu pojedinih hibrida kukuruza, omogućuje njegovo visoko iskorištenje za maksimalnu proizvodnost životinja.

Zrno kukuruza građeno je od perikarpa, klice i endosperma, koji se dijeli na brašnavi (meki) i caklavi (tvrdi) endosperm (Watson, 2003). Endosperm je najzastupljeniji dio kukuruza i čini 83%, klica 11%, omotač 5% i drška 1% suhe mase zrelog zrna. U kukuruzu se nalaze dva tipa endosperma - caklavi i brašnasti. Tip endosperma najviše je povezan s genotipom kukuruza, a zatim u manjoj mjeri i okolišnim čimbenicima i gnojidbom dušikom. Caklavi endosperm sadrži više ulja. Kukuruz sadržava više ulja (3, 6%) nego pšenica, ječam i tritikale. U zrnu kukuruza najviše je masti smješteno u klici (82,6%), pa endospermu (15,4%) i najmanje u omotaču (2%; Grbeša, 2016).

2.4.2. Tokoli zrna kukuruza

Kukuruz među žitaricama sadržava najviše (17-47 μg/g ST) vitamina E koji je najvećim dijelom smješten u klici gdje štiti ulje od oksidacijskog kvarenja. Sadržaj vitamina E je usko povezan sa sadržajem ulja u zrnu kukuruza (Grbeša, 2016). Ulje kukuruza je stabilno zbog visokog sadržaja prirodnih, u mastima topljivih antioksidansa koji obuhvaćaju tokole (vitamin E) i druge spojeve (Grbeša, 2016).

U zrnu kukuruza su prisutni α-, γ- i δ-tokoferoli te γ-tokotrienol, a u većini hibrida dominantan je γ-tokoferol (Torbert, 2002). Ulje kukuruza sadrži visoko potentne forme vitamina E koji su bitni za zdravlje životinja i ljudi, što se očituje u 10-12 puta višem sadržaju γ- nego α-tokoferola. Ostali tokoli prisutni su u nižoj koncentraciji. α-tokoferol se prvi bori protiv oksidacije i donedavno je smatran najjačim antioksidansom među tokolima. Međutim,

dokazano je da je γ-tokoferol najpotentniji odstranjivač slobodnih radikala među izomerima vitamina E. Dodatno, γ-tokoferol snažno djeluje protuupalno i inhibira karcinogenezu. Stoga, nije poželjno samo povećanje razine α-tokoferola u zrnu kukuruza, nego i razine γ-tokoferola (Torbert, 2002).

Velike su genetske razlike u sadržaju i profilu tokola između kultivara kukuruza (Torbert, 2002). Weber (1987) u istraživanju na četiri hibrida kukuruza navodi vrijednosti sadržaja ukupnih tokola od 36,90 do 62,30 μg/g ST, pri čemu je zastupljenost α-tokoferola bila 6,50 – 39,30%, α-tokotrienola 3,40 – 15,00%, γ-tokoferola 35,90 – 59,9% te 9,80 – 32,80%. Prema hrvatskim istraživanjima, Bc hibridi sadržavaju visokih 43,32 μg/g ST tokola, dok europske tablice navode 19,7 μg/g ST, a prema američkim, prosječni sadržaj je 13,2 μg/g ST (Grbeša, 2016), dok Barroeta i sur. (2012) navode vrijednosti u rasponu od 10 do 40 μg/g ST.

2.4.3. Gubici tokola zrna kukuruza

Obradom hrane za životinje, pa tako i kukuruza, mogu nastati značajni gubici vitamina E. Gubici mogu nastati kao posljedica djelovanja peroksidacijskih lipida tijekom razvoja oksidacijske degradacije masti i drugih uvjeta koji pogoduju oksidaciji kao što je: sušenje uz prisutnost svjetlosti i zraka, dodavanje organskih kiselina, zračenje i konzerviranje (Combs, 2017). Oksidacijski potencijal se povećava mljevenjem, miješanjem s mineralima, dodavanjem masti i peletiranjem (Dove i Ewan, 1991), što je uobičajeno prilikom pripreme gotovih smjesa i obroka životinja. Primjerice, željezne soli mogu potpuno uništiti vitamin E (Dove i Ewan 1991).

Tokoferoli su obično manje stabilni pri visokim temperaturama od tokotrienola. Dodavanje 1% propionske kiseline (kao antifungalno sredstvo) vlažnom zrnu kukuruza može uništiti do 90% ukupnog vitamina E (Combs, 2017). U testiranju stabilnosti vitamina E, McDowel (2000) navodi da je sadržaj vitamina E kukuruza smanjen s 30 - 50 μg/g ST na oko 5 μg/g ST kao rezultat umjetnog sušenja na 100 °C tijekom 24 sata pri kontinuiranom protjecanju zraka. Slično tome, Adams (1973) je izvijestio da umjetno sušenje kukuruza 40 minuta na 74 °C stvara prosječni gubitak α-tokoferola od 19% i gubitak ostalih tokoferola od 12% dok je sušenjem 54 minuta pri 93 °C, prosječni gubitak α-tokoferola iznosio 41%. Visoko vlažni kukuruz tretiran kiselinama (propionska ili octeno-propionska smjesa), sadržavao je otprilike 1 μg/g ST α-tokoferola, dok je umjetno sušeni kukuruz sadržavao približno 5,7 μg/g ST (Young i sur., 1978). Očigledno, gubici nisu posljedica same vlage nego i učinka propionske kiseline (McMurray i sur., 1980). Razgradnja α-tokoferola se javlja tijekom produljenog skladištenja, sve dok zrno u konačnici ne dosegne razinu α-tokoferola nižu od 1 μg/g ST (McDowell, 2000).

2.5. Siliranje i silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

Siliranje je način konzerviranja hrane za životinje s visokim udjelom vlage uz pomoć bakterija mliječne kiseline koje fermentiraju lako dostupne ugljikohidrate, monomere i dimere heksoza te pentoze do organskih kiselina, prvenstveno mliječne kiseline. Proizvodnja organskih kiselina uzrokuje snižavanje pH vrijednosti te dovodi do inhibiranja nepoželjnih mikroorganizama, a s tim i konzerviranja žitarica (Weinberg, 2003). Siliranje obuhvaća usitnjavanje sirovine za siliranje koja se zatim sprema u silose ili druge oblike zrakonepropusnog skladišnog prostora. Sastoji od četiri faze: aerobne, faze fermentacije, stabilne faze i faze izuzimanja silaže. Tijekom aerobne faze pH vrijednost se kreće oko 6, a faza traje dok se ne potroši kisik iz silažne mase (McDonald i sur., 1991). U fermentacijskoj fazi dolazi do pada i stabilizacije pH vrijednosti koja se u silaži visoko vlažnog zrna kukuruza kreće između 4,0 i 4,5 (Hoffman i sur., 2011; Diaz i sur., 2013; Kung i sur., 2014). Tijekom stabilne faze promjenjivost sadržaja i kvalitete silažne mase je minimalna ako su očuvani anaerobni uvjeti (Weinberg i Muck, 1996). Tijekom faze izuzimanja dolazi do prodora zraka u silažnu masu čime se stvaraju uvjeti za aktivnost aerobnih mikroorganizama koji mogu uzrokovati kvarenje silaža koje su sklone kvarenju, a u njih se ubraja silaža visoko vlažnog zrna kukuruza. Kvarenju doprinosi viši sadržaj dostupnih ugljikohidrata, korištenje dodataka koji uzrokuju usmjerenu fermentaciju, te viši udio suhe tvari silaže (Muck, 1996).

Kukuruz je najčešće korištena žitarica za siliranje u mnogim dijelovima svijeta. Razlog tome je visoki udio suhe tvari, visoka razina lako razgradivih ugljikohidrata potrebnih za stvaranje mliječne kiseline te nizak puferni kapacitet koji označava sposobnost odupiranju promjeni pH (Meeske i sur., 2000). Kvaliteta silaže i njena nutritivna vrijednost ovisi o sirovini za siliranje, ali i o procesu siliranja te upotrijebljenim dodacima. (McDonald i sur., 1991).

Visoko vlažno zrno kukuruza se s 30 – 35% vlage tijekom branja silira ili na neki drugi način konzervira (dodavanjem ugljikova dioksida, kiselina). Vlažno zrno je probavljivije te njegova suha tvar ima najmanje 5% više energije za preživače i svinje od suhe tvari osušenog zrna kukuruza (Grbeša, 2016).

Nepovoljni agroklimatski uvjeti i nedostatak mehanizacije sužavaju vremenski interval u kojemu se može uvesti mehanizacija u polje te se smanjuje mogućnost berbe kukuruza u optimalnom roku. Berba zrna kukuruza nakon optimalnog roka uzrokuje gubitak vlage te zrno nije prikladno za siliranje. Postupkom rehidracije se podiže sadržaj vode u zrnu do optimalne koncentracije za siliranje. Junges i sur. (2017) su zrno polutvrdunaca (eng. flint corn) za siliranje rehidrirali do 32% vlage te su pokazali da je proteolizi (otapanju bjelančevina tijekom fermentacije) najviše doprinijela aktivnost bakterija (60%), zatim enzimi zrna kukuruza (30%), dok su gljivice i krajnji produkti fermentacije (glavne kiseline – mliječna, octena; i etanol) imali tek manji doprinos (svaki oko 5%). Pozitivne učinke rehidracije zrna navode Wang i sur. (2012.) te rezultati njihovog istraživanja upućuju da hranidba s probiotski fermentiranim, visoko

vlažnim zrnom kukuruza može modulirati crijevnu mikrofloru, te da inokulacija s *Lactobacilus acidophilus* može utjecati na performanse rasta svinja.

2.5.1. Silaža visoko vlažnog zrna kukuruza u hranidbi životinja

Siliranje visoko vlažnog zrna kukuruza je način konzerviranja i čuvanja zrna do sljedeće berbe te se na taj način cijele godine koristi u hranidbi goveda, svinja te u manjoj mjeri peradi (Svečnjak i sur., 2007; Diaz i sur., 2013). Žitarice pa tako i kukuruz imaju važnu ulogu u intenzivnoj hranidbi goveda te se kukuruz u toj skupini smatra najboljim izvorom energije za mikrobe buraga i krave (Hoffman i sur., 2011). Glavna energetska komponenta žitarica je škrob, koji s obzirom na probavljivost dijelimo na brzo probavljivi, sporo probavljivi i neprobavljivi škrob (Singh i sur., 2010). Niska razgradnja škroba u buragu, glavnom mjestu razgradnje škroba kod preživača, može dovesti do nepotpune probavljivosti škroba u cijelom probavnom traktu životinje, što uzrokuje proizvodne gubitke. S druge strane, previsoka razgradnja škroba u slučaju kada životinja ne uspijeva neutralizirati velike količine proizvedenih organskih kiselina može dovesti do smanjenja unosa hrane, te do patoloških stanja (Huhtanen i Sveinbjörnsson, 2006).

Za iskorištavanje hranjivih tvari zrna žitarica u hranidbi životinja, neophodno je otvaranje perikarpa. Prilikom hranidbe goveda cijelim zrnom dolazi do narušavanja perikarpa žvakanjem i preživanjem. Međutim, do 30% zrna se pojavljuje u fecesu te prouzročuje proizvodne gubitke (Ørskov, 1986). Obrada zrna poput mljevenja i siliranja narušavanju konzistenciju perikarpa, te povećavaju dostupnost hranjivih tvari (Cheng, 1996). Silaža visoko vlažnog zrna kukuruza ima veću probavljivost buražnog i ukupnog škroba u odnosu na suho zrno, što su utvrdili Philippeau i Michalet-Doreau (1998), Firkins (2001) te Ferraretto i sur. (2013). Nadalje, Newbold i sur. (2006) su u *in situ* provedenom istraživanju zabilježili porast buražne razgradivosti škroba silaže za 53,20% u drugom mjesecu nakon siliranja, a u desetom mjesecu nakon siliranja za 69,0%, dok su i Stock i sur. (1991) utvrdili porast probavljivosti škroba od 20,40% u *in vitro* istraživanju probavljivosti silaža visoko vlažnog zrna starih 120 dana i 365 dana. Osim navedenih čimbenika dostupnosti i razgradivosti škroba silaže visoko vlažnog zrna kukuruza, značajan utjecaj ima fiziološki status životinja, veličine čestica silaže (Ferraretto i sur., 2013), sadržaj suhe tvari silaže (Ngonyamo-Majee i sur., 2009) te tip endosperma kukuruza (Philippeau i sur., 2000; Correa i sur., 2002; Ngonyamo-Majee i sur., 2008; Lopes i sur., 2009; Ali i sur., 2014). To potvrđuju Ekinci i sur. (1997) u istraživanju buražne probavljivosti suhe tvari, škroba i vlakana kod mliječnih krava, pri čemu je buražna probavljivost svih parametara povećana smanjenjem veličine čestica zrna silaže visoko vlažnog zrna kukuruza s 4,33 na 1,66 mm.

Pravilno silirana, zdrava i kvalitetna silaža visoko vlažnog zrna kukuruza privlačnog je mirisa i dobre ješnosti, što omogućuje njezinu upotrebu u hranidbi životinja. Ovisno o

proizvodnji i dobi životinje, goveda u dnevnom obroku mogu dobiti od 2 do 6 kg visoko vlažnog zrna kukuruza, odnosno njegov udio u obroku može biti u rasponu od 15 do 50%. Udio siliranog visokovlažnog zrna kukuruza u obroku svinja može biti i 70%, uz dodatak dopunske visokoproteinske krmne smjese (Jones i sur., 1970.).

3. Materijali i metode istraživanja

Istraživani hibridi kukuruza dobiveni su od sjemenarske tvrtke Bc Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja d.d., Zagreb. Kemijske analize provedene su u laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja Agronomskog fakulteta u Zagrebu.

3.1. Hibridi kukuruza

U istraživanju je korišteno zrno 7 hibrida kukuruza žute boje (slika 2 – 8). Svi hibridi uzgajani su na istom pokusnom polju pri čemu je svaki hibrid zasijan na parcelama istih dimenzija, pod istim uvjetima intenzivne agrotehnike, u Rugvici (Zagrebačka županija) tijekom vegetacijske sezone 2017. godine. Tlo u Rugvici je mineralno-močvarno umjereno oglejno i livadsko semiglejno.

Prema Bc Institut (2018), karakteristike ispitivanih hibrida kukuruza su:

1. Bc 344 – pripada FAO grupi 300, skupini kvalitetnih zubana. Karakterizira ga odlična kombinacija svih gospodarskih svojstava; visok i stabilan urod. Niske je i čvrste stabljike, velikog, nisko nasađenog klipa, krupnog, crvenkastog zrna.



Slika 2. Hibrid Bc 344
Izvor: Bc Institut (2018)



Slika 3. Hibrid Bc 418b
Izvor: Bc Institut (2018)



Slika 4. Hibrid Bc 424
Izvor: Bc Institut (2018)

2. Bc 418b – pripada FAO grupi 460, skupini kvalitetnih zubana. Karakterizira ga poboljšana kvaliteta zrna. Izuzetno je čvrste stabljike, dugog zelenog lista. Odličnog je uroda i u gustom sklopu te je tolerantan na sušu.
3. Bc 424 – pripada FAO grupi 460, skupini kvalitetnih zubana. Hibrid izuzetnog potencijala rodnosti, nešto više stabljike, čvrstog, uspravnoga lista, srednje velikog klipa. Krupnog je zrna, narančasto-žute boje u tipu zubana. Odlične je tolerantnosti na sušu i povećanje sklopa.
4. Bc 525 – pripada FAO grupi 510, skupini zubana. Karakterizira ga visoka klijavost i energija klijanja sjemena. Niske je i ujednačene stabljike, velikog klipa sa 16-18 redova, krupnog zrna. Namijenjen je proizvodnji zrna na različitim razinama agrotehnike uz laganu berbu i kombajniranje.



Slika 5. Hibrid Bc 525
Izvor: Bc Institut (2018)



Slika 6. Hibrid Bc 572
Izvor: Bc Institut (2018)



Slika 7. Hibrid Kekec
Izvor: Bc Institut (2018)



Slika 8. Hibrid Pajdaš
Izvor: Bc Institut (2018)

5. Bc 572 – pripada FAO grupi 520, skupini kvalitetnih zubana. Karakterizira ga odlična kvaliteta zrna, brzo otpuštanje vode iz zrna, niža i čvrsta stabljika te dug zelen list. Velikog je klipa, privlačnog izgleda. Odličnog je uroda u grupi te je tolerantan na sušu.
6. Kekec – pripada FAO grupi 330, skupini polutvrdunaca. Karakterizira ga visok urod uz odličnu kvalitetu zrna. Nešto je više stabljike, odlične čvrstoće i tamnozelenih listova. Nisko nasađenog je klipa srednje veličine. Odličnog je ranog porasta te je pogodan za rane rokove sjetve. Podnosi gušće sklopove i intenzivnu agrotehniku.

7. Pajdaš – pripada FAO grupi 490, skupini kvalitetnih zubana. Karakterizira ga visok urod i kvaliteta zrna te odličan rani porast, Niske je i čvrste stabljike, dugog zelenog lista i velikog klipa s crvenim, krupnim zrnima.

3.2. Siliranje, skladištenje i uzorkovanje

Kukuruz je ubran nakon fiziološke zrelosti s pet unaprijed određenih mjesta svake parcele (5 repeticija svakog hibrida), a pri čemu se nisu brali klipovi iz dva rubna reda svake parcele. Prilikom branja klipovi su okrunjeni na kombajnu, a nakon miješanja zrna svake repeticije uzet je uzorak koji predstavlja početno stanje suhog zrna.

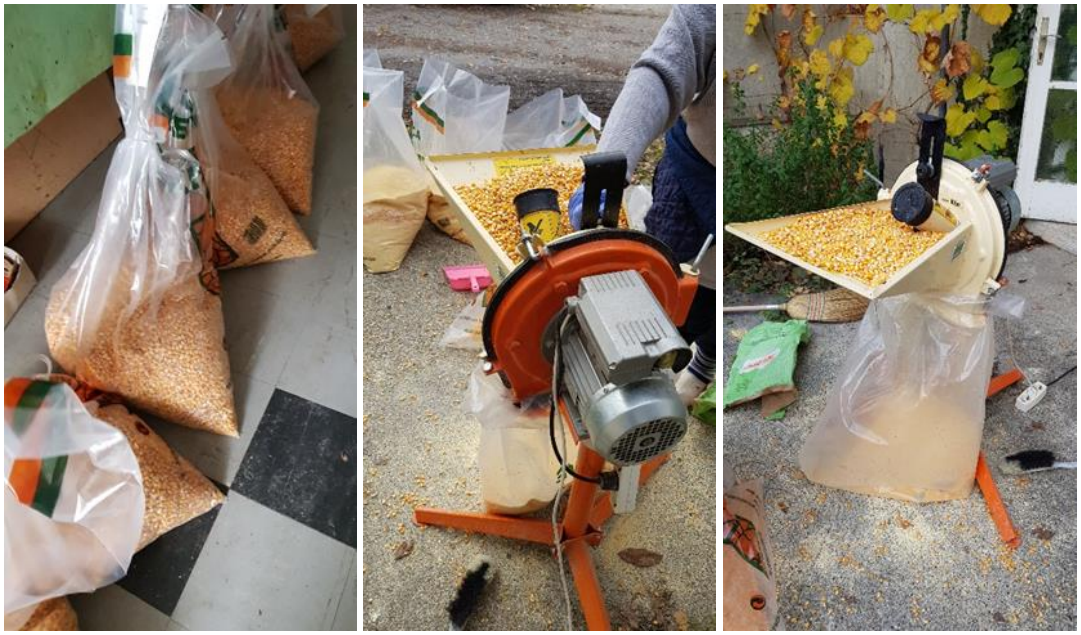
Svaka repeticija svakog hibrida podijeljena je zatim na dva jednaka dijela (oko 10 kg za svaki dio). Jedan dio je odvojen u papirnatu vreću i zatvoren te spremljen u skladišnu prostoriju Bc Instituta u Rugvici pri čemu se oponašalo skladištenje suhog zrna na farmi. Uzorak od 1 kg iz svake vrećice uzorkovan je 21., 63., 95. i 185. dana skladištenja i dostavljen u laboratorij. Promjene temperature u skladištenom prostoru tijekom promatranog razdoblja od 6 mjeseci prikazane su u grafikonu 1.



Grafikon 1. Promjene temperature u skladištenom prostoru suhog zrna kukuruza tijekom promatranog razdoblja

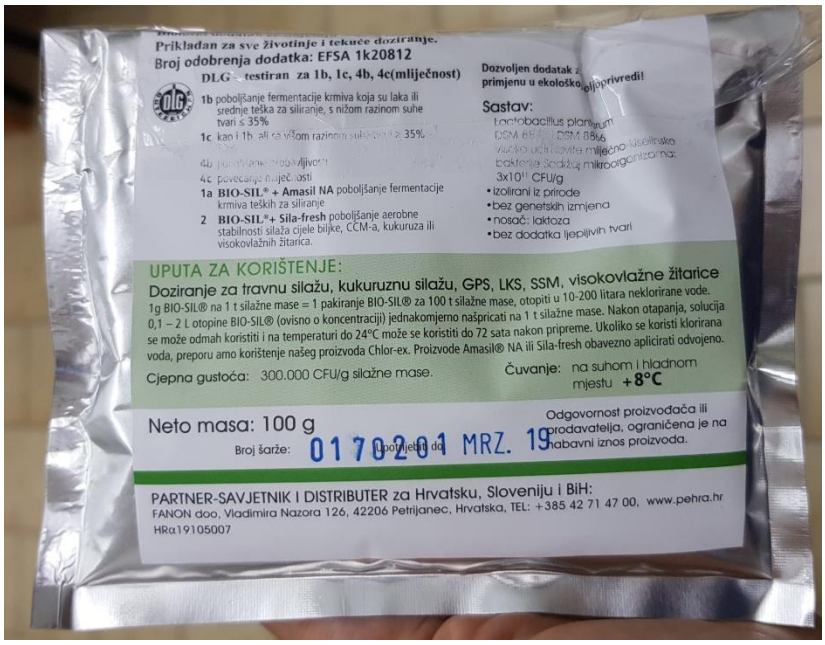
Drugi dio zrna svake repeticije svakog hibrida je rehidriran do 32% dodatkom potrebne mase destilirane vode u plastične vreće zapremnine 50 L. Plastične vreće su zatvorene i nekoliko puta dnevno okretane kako bi se zrno rehidriralo tijekom 2 dana na sobnoj

temperaturi (slika 9). Zrno iz svake vreće je zatim samljeveno na mlinu čekićaru (Ino Brežice d.o.o.) sa sitom veličine pora od 5 mm (slika 9. Na meljavu je prskanjem aplicirana otopina inokulanta BIO-SIL® (Dr. Pieper, Njemačka) koncentracije pripremljene prema uputama proizvođača (slika 10). BIO-SIL inokulant sadrži s liofilizirane kulture *Lactobacillus plantarum* 8862 i 8866.



Slika 9. Rehidriranje i mljevenje zrna istraživanih hibrida kukuruza

Vlastiti izvor



Slika 10. Pakiranje inokulanta BIO-SIL® (Dr. Pieper, Njemačka)
Vlastiti izvor

Nakon miješanja meljave i aplicirane otopine inokulanta, oko 1 kg mase vakuumiran je u vakuum vrećice (Status, 280 × 360 mm, 25 set, Status d.o.o.) i siliran na temperaturi 20-25 °C. Svaki dio zrna siliran je u 5 vrećica pri čemu je svaka vrećica predstavljala određeno vrijeme siliranja i skladištenja (21., 38., 63., 95. i 185. dan; slika 11). Nakon otvaranja vrećica, sadržaj je sušen na 40 °C kako bi se mogao pripremiti laboratorijski uzorak.



Slika 11. Apliciranje inokulanta i siliranje rehidriranog zrna istraživanih hibrida kukuruza
Vlastiti izvor

3.3. Kemijske analize

Neposredno prije analize, suho i silirano zrno svake repeticije sedam istraživanih hibrida kukuruza samljeveno je na mlinu Cyclotec (Tecator, Švedska) sa sitom veličine pora 1 mm. U svim uzorcima određen je sadržaj vlage sušenjem uzorka na 103 °C tijekom 4 sata.

3.3.1. Ekstrakcija tokola

Određivanje sadržaja tokola u uzorcima provedeno je prema postupku ekstrakcije i kvantitativnog određivanja opisanom u radu Kurilich i Juvik (1999). Uzorku silaže zrna kukuruza (600 mg) izvaganom u staklenu epruvetu za centrifugiranje dodano je 6 mL etanola koji sadrži 0,1% antioksidansa BHT (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol). Smjesa je homogenizirana (T10, Ika, Njemačka; 30 s pri najjačoj brzini okretaja), a zatim inkubirana 5 min. na 85 °C u vodenoj kupelji (Waterbath, 5L, Cole Parmer, SAD). Uzorak je dobro izmiješan vorteksiranjem nakon dodatka 120 µL 80%-tne otopine kalijeve lužine i vraćen u vodenu kupelj još 10 min. s jednim vorteksiranjem nakon 5. min. inkubiranja tijekom postupka. Nakon vađenja iz kupelji uzorci su odmah ohlađeni na ledu uz dodatak 3 mL hladne ultračiste vode. Ohlađenoj smjesi dodano je 3 mL heksana, a nakon vorteksiranja 30 s i centrifugiranja 5 min. na 2 200 *g* (Centric 322A, Tehtnica, Slovenija) odvojen je gornji heksanski sloj. Postupak ekstrakcije s heksanom ponovljen je još 4 puta, a sakupljene i spojene heksanske frakcije isprane su s 3 mL ultračiste vode, vorteksirane i ponovno centrifugirane. Heksanski ekstrakt je zatim uparen na rotacionom uparivaču (Laborata 400 efficient, Heidolph, Njemačka). Suhi ostatak otopljen u 300 µL otopine acetonitril:metanol:metilen klorid (45:20:35, v/v/v).

3.3.2. Kvantitativno određivanje pojedinih tokola

Tokoli su odvojeni i kvantitativno određeni tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (eng. High Performance Liquid Chromatogryphy, HPLC. Sustav kolona bio je sastavljen od serijski spojenih Vydac 201TP54 (5 µm; 4,6 x 150 mm; Grace Davison Discovery Sciences, SAD) i Zorbax RX-C18 (5 µm; 4,6 x 150 mm; Agilent Technologies, SAD) C18 kolona obrnutih faza. Kolone su bile zaštićene Supelguard Discovery (5 µm; 4 x 20 mm; Supelco, SAD) C18 zaštitnom kolonom.

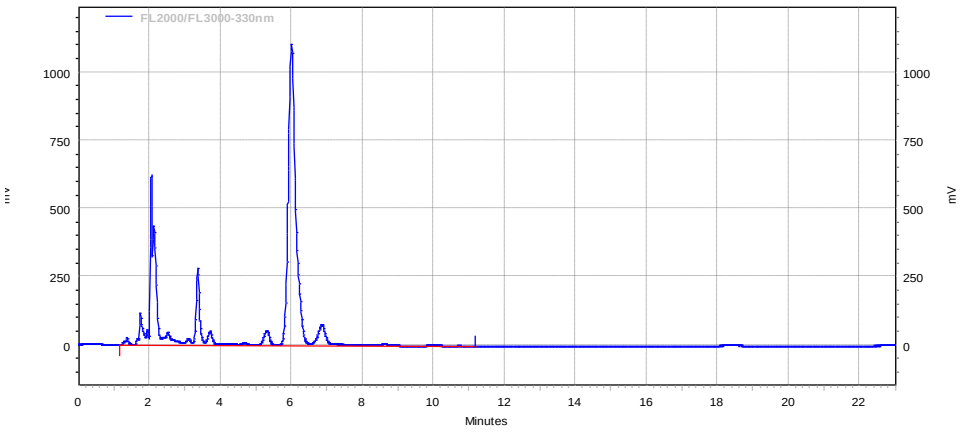
HPLC sustav SpectraSystem (Thermo Separation Products, Inc., SAD; slika 13) sastojao se od kvaterne gradijent pumpe (P4000), sustava za otplinjavanje (SCM 1000), automatskog sustava za injektiranje uzorka (AS3000), grijača kolone te UV/Vis (UV2000) i fluorescencijskog

(FL3000) detektora. Podaci su sakupljeni i obrađeni ChromQuest 5.0 softwareom (Thermo Fisher Scientific, SAD). Pokretna faza sastojala se od smjese otapala acetonitril:metanol:metilen klorid (75:20:5, v/v/v) i sadržavala je 0,05% trietil-amina (TEA) i 0,1% BHT. Protok mobilne faze bio je namješten na 1,8 mL/min pri sobnoj temperaturi.



Slika 12. HPLC sustav SpectraSystem (Thermo Separation Products, Inc., SAD)
Vlastiti izvor

Volumen injektiranja otopina uzoraka bio je 30 µL, a tokoli su detektirani fluorescencijskim detektorom s 290 nm kao valnom duljinom pobuđivanja i 330 nm kao valnom duljinom emisije. Primjer kromatograma jednog od uzoraka prikazan je slikom 14. Svaki je uzorak ekstrahiran u duplikatu, a kao rezultat sadržaja tokola uzeta je srednja vrijednost.



Slika 13. Kromatogram tokola suhog zrna kukuruza hibrida Bc 344
Izvor: K. Kljak

Za identifikaciju i kvantitativno određivanje tokola pripremljene su ishodne otopine α-tokoferola, γ-tokoferola, δ-tokoferola i γ-tokotrienola (Sigma Aldrich, Njemačka). Otopine standarda pripremljene su u apsolutnom etanolu, a stvarne koncentracije ishodnih otopina određene su spektrofotometrijski korištenjem spektralnih apsorpcijskih koeficijenata spojeva. Za identifikaciju ispitivanih spojeva pripremljene su radne otopine pojedinačnih tokola uzimanjem alikvota ishodne otopine, uparivanjem otapala te otapanjem ostatka u 1 mL otopine acetonitril:metanol:metilen klorid (45:20:35, v/v/v). Pojedinačni tokoli propušteni su kroz HPLC te je zabilježeno retencijsko vrijeme na temelju kojega je identificiran određen tokol.

Različitim alikvotima ishodnih otopina pripremljeno je pet otopina različitih koncentracija pojedinačnih standarda za pet točaka baždarnog pravca. Spojeni alikvoti pojedinačnih tokola upareni su na rotacionom uparivaču i otopljeni u 1 mL otopine acetonitril:metanol:metilen klorid (45:20:35, v/v/v).

3.4. Kinetika razgradnje tokola

Razgradnja tokola suhog i siliranog rehidriranog zrna kukuruza istraživanih hibrida kukuruza praćena je kinetikom 1. reda (Hidalgo i sur., 2009) prema jednadžbi:

$$c_R = c_{R_0} \times e^{-k \times t}$$

pri čemu su c_R koncentracija tokola u trenutku t (0., 21., 38., 63., 95. i 85. dan), c_{R0} početna koncentracija tokola u uzroku, a k brzina razgradnje (1/dan).

Za obradu podataka nelinearne krivulje korištena je NLIN procedura statističkog alata SAS (Statistical Analysis System 9.4, 2015.). Pri tome je korištena Marquardtova metoda (procedura iterativne prilagodbe krivulji) za najmanju sumu kvadrata ostatka povezanu s regresijskim modelom. Statističkom procedurom NLIN određeni su parametri nelinearne krivulje razgradnje tokola kukuruza koja prati kinetiku prvog reda – početna koncentracija određenog tokola u uzroku te brzina razgradnje određenog tokola.

3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je pomoću statističkog paketa SAS 9.4 (Statistical Analysis System, 2015.). Pokus je bio postavljen prema nasumičnom blok rasporedu s pet repeticija. Rezultati istraživanja su obrađeni kao ponovljena mjerenja s fiksnim utjecajem hibrida, načina skladištenja i vremena siliranja i njihovih interakcija korištenjem

MIXED procedure sa SP(POW) kao strukture kovarijance za vremenske intervale. Srednje vrijednosti i standardne greške su određene korištenjem LSMEANS naredbe dok su razlike srednjih vrijednosti određene korištenjem PDIFF naredbe. Statistička signifikantnost bila je postignuta ako je $P \leq 0,05$.

4. Rezultati

U istraživanju su praćene promjene sadržaja tokola u silaži rehidriranog zrna kukuruza te u suhom zrnu istih hibrida. Za potrebe istraživanja korišteno je sedam hibrida proizvođača Bc Institut s prosječnim sadržajem sirovih masti 48,63 µg/g ST, koji se kretao u rasponu od 44,95 µg/g ST do 57,80 µg/g ST te prosječnom veličinom čestice meljave za siliranje od 913,79 µm koja se kretala u rasponu od 819,72 do 967,81 µm.

4.1. Sadržaj tokola u suhom i rehidriranom zrnu hibrida kukuruza

Od tokolnih spojeva u zrnu kukuruza su detektirani α-tokoferol, γ-tokoferol, δ-tokoferol i γ-tokotrienol, a njihov sadržaj kvantitativno je određen HPLC metodom. Analizom varijance utvrđen je značajan utjecaj ($P < 0,001$) hibrida (H), načina skladištenja (S; silirano, suho zrno) i vremena skladištenja (V) na sadržaj svih tokolnih spojeva u zrnu kukuruza. Kombiniranom varijancom utvrđen je značajan utjecaj ($P < 0,001$) interakcije H × V, H × S, S × V i H × V × S (tablica 1).

Tablica 1. Rezultati kombinirane analize varijance za sadržaje pojedinačnih i ukupnih tokola istraživanih sedam hibrida kukuruza

	n - 1	α-tokoferol	γ-tokoferol	δ-tokoferol	γ-tokotrienol	Ukupni tokoli
Hibrid (H)	6	***	***	***	***	***
Vrijeme (V)	4	***	***	***	***	***
Skladište (S)	1	***	***	***	***	***
H × V	24	***	***	*	***	***
H × S	6	***	***	***	***	***
S × V	4	***	***	***	***	***
H × V × S	24	***	***	***	***	***

***P < 0,001; *P < 0,05

4.1.1. Promjene sadržaja α-tokoferola

Drugi po zastupljenosti tokolni spoj zrna kukuruza je α-tokoferol. U suhom zrnu istraživanih hibrida nulti dan istraživanja njegova prosječna koncentracija je iznosila 12,67 μg/g ST s vrijednostima u rasponu od 7,21 μg/g ST (Kekec) do 18,27 μg/g ST (Pajdaš; tablica 2), što je unutar raspona vrijednosti koje su dobivene u istraživanju Weber (1987) – 6,50 do 39,30 μg/g ST. Početni dan nakon postupka rehidriranja i siliranja utvrđena je prosječna vrijednost sadržaja α-tokoferola 9,70 μg/g ST (4,60, Kekec – 12,66 μg/g ST, Pajdaš), što ukazuje na pad vrijednosti od 23,44% uzrokovanim tim postupcima. Promjena sadržaja tokola istraživanih hibrida suhog i siliranog rehidriranog zrna tijekom šestomjesečnog razdoblja skladištenja prikazana je u tablici 2.

Dosadašnja istraživanja nisu obuhvaćala praćenje promjena sadržaja tokola u zrnu kukuruza, ali se u dostupnoj literaturi može pronaći radove vezane uz ostale žitarice. Tako su Rice i sur. (1985) proveli istraživanje na rehidriranom ječmu (18, 25 i 35% vlage) skladištenom u anaerobnim i aerobnim uvjetima. Autori su 24. dana zabilježili pad sadržaja α-tokoferola od 12,75% u aerobnim uvjetima u odnosu na sadržaj početnog dana, dok je u anaerobnim uvjetima taj sadržaj niži za 3,26% u odnosu na aerobne uvjete isti dan pokusa. Prilikom anaerobnog skladištenja zrna 24 dana uz dodatak propionske kiseline došlo je do pada sadržaja α-tokoferola za 35,29% u odnosu na sadržaj u suhom zrnu inicijalnog dana istraživanja, što je za 25, 84% niži sadržaj u odnosu na sadržaj prilikom istog perioda aerobnog skladištenja rehidriranog zrna. Rice i sur. (1985) su zaključili da dodatak vlage ima minimalan utjecaj na sadržaj α-tokoferola kao i anaerobni uvjeti, dok dodatak organske kiseline (propionske) u velikoj mjeri uzrokuje degradaciju α-tokoferola.

Temperatura skladištenja u navedenom istraživanju Rice i sur. (1985) je iznosila 12 – 15 °C, što su približne vrijednosti vrijednostima skladištenja suhog zrna u ovom istraživanju (grafikon 1) u istom razdoblju skladištenja. U ovom istraživanju je u približnom vremenu skladištenja suhog zrna (21. dan) utvrđen prosječan pad sadržaja α-tokoferola od 11,16% u odnosu na sadržaj početnog dana što je približan pad kao i kod Rice i sur. (1985). Istog dana izmjeren je pad od 53,65% u rehidriranom siliranom zrnu (izloženom djelovanju mliječne kiseline) u odnosu na suho zrno početnog dana istraživanja, što je znatno veći pad u odnosu na vrijednosti u istraživanju Rice i sur. (1985). Međutim, treba napomenuti da je rehidrirano zrno silirano na 25 °C što je doprinijelo većoj razgradnji ovog tokola.

Vrijednosti sadržaja α-tokoferola su nastavile značajno opadati do 38. dana u zrnu oba tipa skladištenja, a nakon toga je došlo do stagnacije vrijednosti sadržaja u silaži rehidriranog zrna do kraja promatranog razdoblje. Međutim, u suhom zrnu je sadržaj α-tokoferola nastavio opadati i nakon 38. dana te je veći pad zabilježen od 100. do 185. dana istraživanja – od 4,45 do 18,72% ovisno o hibridu. U tom razdoblju zabilježen je porast temperature u skladišnom prostoru (grafikon 1) što je moguć razlog ovog većeg pada sadržaja α-tokoferola. Tijekom šestomjesečnog skladištenja, sadržaj α-tokoferola je smanjen za 26,41% u suhom zrnu u

odnosu na sadržaj početnog dana istraživanja, dok je u rehidriranom siliranom zrnu pad prosječno veći za još 2,97% u odnosu na suho zrno.

Tablica 2. Sadržaj α-tokoferola (μg/g) u suhoj tvari sedam hibrida kukuruza suhog i siliranog visoko vlažnog zrna tijekom šestomjesečnog razdoblja

Hibrid	Skladištenje	Vrijeme (dani)					
		0	21	38	63	100	185
Bc 344	Suho	13,44	13,34		10,16	10,02	8,90
	Silirano	9,25	6,41	5,26	5,20	5,19	5,86
Bc 418b	Suho	14,14	12,97		13,99	14,50	11,78
	Silirano	12,66	8,62	7,82	5,19	7,83	8,32
Bc 424	Suho	13,37	12,69		12,23	12,82	10,93
	Silirano	11,32	9,32	7,33	8,26	8,36	8,68
Bc 525	Suho	11,35	11,18		9,77	10,72	9,42
	Silirano	9,29	7,93	6,61	8,53	7,37	7,54
Bc 572	Suho	10,91	9,63		9,14	8,33	7,96
	Silirano	8,50	5,58	6,05	6,11	6,03	6,29
Kekec	Suho	7,21	7,30		4,33	4,66	4,29
	Silirano	4,60	2,62	2,19	2,37	2,25	2,13
Pajdaš	Suho	18,27	16,48		14,09	17,55	11,99
	Silirano	12,27	9,98	9,59	8,49	8,63	9,53
Svi hibridi	Suho	12,67	11,94		10,53	11,23	9,32
	Silirano	9,70	7,21	6,41	6,31	6,52	6,91

4.1.2. Promjena sadržaja γ-tokoferola

U zrnu kukuruza očekivano je bio najzastupljeniji γ-tokoferol te je njegov prosječan sadržaj u suhom zrnu istraživanih hibrida kukuruza nulti dan iznosio 50,39 μg/g ST (tablica 3), s vrijednostima od 35,10 μg/g ST (Bc 572) do 65,46 μg/g ST (Kekec). Navedeni raspon je za većinu hibrida sličan onome u istraživanju Weber (1987) – 35,99 do 59,90 μg/g ST u istraživanju na 4 hibrida kukuruza, dok su hibridi Bc 344 i Kekec sadržavali više od 60 μg/g ST γ-tokoferola. Sadržaj γ-tokoferola siliranog rehidriranog zrna inicijalnog dana se kretao od 29,70 μg/g ST (Bc 572) do 53,36 μg/g ST (Bc 344), pri čemu je postupkom rehidriranja i siliranja prouzročen prosječan pad sadržaja od 18,50%.

Prilikom sljedećeg mjerenja sadržaja γ-tokoferola (21. dan), došlo je do prosječne degradacije sadržaja γ-tokoferola od 9,40% u suhom zrnu u odnosu na sadržaj u suhom zrnu početnog dana skladištenja, dok Rice i sur. (1985) navode veću degradaciju sadržaja γ-tokoferola (11,67%) u rehidriranom ječmu približnog vremena skladištenja (24. dan). Tijekom anaerobnog skladištenja ječma uz dodatak propionske kiseline, Rice i sur. (1984) navode pad vrijednosti γ-tokoferola od 20%, što je znatno manji pad u odnosu na pad u silaži rehidriranog zrna kukuruza ovog istraživanja (32,92%) skladištenog 21 dan u odnosu na sadržaj u suhom zrnu nulti dan skladištenja.

Tablica 3. Sadržaj γ-tokoferola (µg/g) u suhoj tvari sedam hibrida kukuruza suhog i siliranog visoko vlažnog zrna tijekom šestomjesečnog razdoblja

Hibrid	**Skladištenje**	**Vrijeme (dan)**					
		0	21	38	63	100	185
Bc 344	Suho	61,73	52,36		60,12	52,85	48,59
	Silirano	53,36	33,17	35,61	36,95	39,42	40,78
Bc 418b	Suho	47,70	44,28		49,65	50,66	40,37
	Silirano	43,94	35,26	32,90	32,43	33,19	33,75
Bc 424	Suho	55,95	49,13		52,31	52,39	46,86
	Silirano	48,54	43,57	38,60	40,35	41,83	39,06
Bc 525	Suho	38,76	33,27		36,98	38,52	32,60
	Silirano	34,09	27,39	28,43	28,41	25,67	27,64
Bc 572	Suho	35,10	33,50		34,32	34,28	30,40
	Silirano	29,70	25,38	21,81	22,56	22,59	23,10
Kekec	Suho	65,46	60,40		50,86	50,46	44,21
	Silirano	43,11	38,97	33,80	25,67	30,13	35,07
Pajdaš	Suho	47,99	46,39		39,79	40,05	33,07
	Silirano	34,72	32,86	29,39	26,31	26,45	26,43
Svi hibridi	Suho	50,39	45,62		46,29	45,60	39,44
	Silirano	41,06	33,80	31,51	30,38	31,33	32,26

Značajan pad vrijednosti sadržaja γ-tokoferola u silaži rehidriranog zrna kukuruza nastavio se do 38. dana skladištenja kada su hibridi u prosjeku sadržavali 31,51 µg/g ST (u odnosu na 50,39 µg/g ST u suhom zrnu na početku skladištenja). Kao i kod α-tokoferola, nakon 38. dana pa sve do kraja šestomjesečnog razdoblja nije bilo većih promjena u sadržaju ovog tokola. S druge strane, kod suhog zrna sadržaj α-tokoferola je nastavio lagano opadati te su 185. dana hibridi u prosjeku sadržavali 39,44 µg/g ST pri čemu je najveći pad sadržaja ovog tokola zabilježen između 100. i 185 dana u skladu s povišenjem temperature u skladišnom

prostoru. Ukupan pad sadržaja γ-tokoferola suhog zrna tijekom šestomjesečnog istraživanja prosječno je iznosio 21,37% što je približna vrijednost pada utvrđenoj vrijednosti pada za silirano rehidrirano zrno (21,42%). Međutim, pribrajanjem pada vrijednosti sadržaja γ-tokoferola nultog dana istraživanja uzrokovanim rehidriranjem i početnom fazom siliranja (18,52%), ukupan pad sadržaja ovog tokola siliranog rehidriranog zrna u odnosu na suho zrna inicijalnog dana iznosi 35,98%.

4.1.3. Promjena sadržaja δ-tokoferola

δ-tokoferol je najmanje zastupljen tokol prisutan u zrnu kukuruza. Njegov sadržaj u suhom zrnu svih istraženih hibrida je više od deset puta manji od sadržaja γ-tokoferola te je prosječno početnog dana istraživanja iznosio 2,15 μg/g ST s vrijednostima od 1,60 μg/g ST (Bc 424) do 2,37 μg/g ST (Bc 344). U preglednom radu Torbet i sur (2002) navedene su prosječne vrijednosti sadržaja tokola u zrnu kukuruza dugih autora – ovisno o linijama te vrijednosti mogu biti od 1,60 do 4,28 μg/g ST. Vrijednosti u ovom istraživanju su bliže donjoj vrijednosti koju su naveli Torbet i sur. (2002). Nakon siliranja, prosječna vrijednost δ-tokoferola isti dan je iznosila 1,68 μg/g ST s vrijednostima od 1,35 μg/g ST (Kekec) do 2,03 μg/g ST (Bc 424) što predstavlja pad od 21,98% zbog gubitaka tijekom priprema silaža i uzorka za analizu. Sve vrijednosti tijekom skladištenja suhog zrna i silaže rehidriranog zrna tijekom promatranog razdoblja skladištenja prikazane su u tablici 4.

Kao i kod ostalih tokola, najveći pad sadržaja δ-tokoferola u silažama rehidriranog zrna je zabilježen 21. dana skladištenja kada su silaže sadržavale u prosjeku 1,59 μg/g ST u odnosu na 2,15 μg/g ST u suhom zrnu na početku promatranog razdoblja. Međutim, zbog niskog sadržaja ovog tokola, značajniji pad vrijednosti zabilježen je tek nakon 100. dana istraživanja bez obzira bilo to suho zrno (pad u prosjeku 23,72%) ili silaža rehidriranog zrna (pad u prosjeku 22,62%). Nadalje, također zbog niskog sadržaja, varijabilnost vrijednosti sadržaja δ-tokoferola tijekom promatranog razdoblja su znatno izraženije nego kod ostalih tokola kao posljedica utjecaja siliranja u svakoj od vakuumiranih vrećica silaža. Tijekom šestomjesečnog skladištenja suhog zrna došlo je do pada sadržaja δ-tokoferola od 27,57%, dok je pad u silaži rehidriranog zrna iznosio 16,72%, što je znatno manji pad.

Tablica 4. Sadržaj δ-tokoferol (µg/g) u suhoj tvari sedam hibrida kukuruza suhog i siliranog visoko vlažnog zrna tijekom šestomjesečnog razdoblja

Hibrid	Skladištenje	Vrijeme (dan)					
		0	21	38	63	100	185
Bc 344	Suho	2,37	2,13		2,01	1,77	1,66
	Silirano	1,73	1,38	1,48	1,57	1,65	1,28
Bc 418b	Suho	2,37	2,17		2,26	1,89	1,73
	Silirano	1,92	1,72	1,91	1,88	1,22	1,51
Bc 424	Suho	2,29	2,14		2,25	1,85	1,78
	Silirano	2,03	2,02	2,02	1,97	1,53	1,66
Bc 525	Suho	2,15	1,84		1,82	1,76	1,74
	Silirano	1,76	1,61	1,85	1,95	1,55	1,63
Bc 572	Suho	1,60	1,49		1,33	1,21	1,22
	Silirano	1,36	1,28	1,25	1,31	0,88	1,08
Kekec	Suho	2,27	2,08		1,57	1,51	1,41
	Silirano	1,35	1,54	1,54	1,59	1,22	1,39
Pajdaš	Suho	1,98	1,73		1,75	1,49	1,35
	Silirano	1,59	1,56	1,21	1,82	1,09	1,22
Svi hibridi	Suho	2,15	1,94		1,86	1,64	1,56
	Silirano	1,68	1,59	1,61	1,73	1,30	1,40

4.1.4. Promjena sadržaja γ-tokotrienola

γ-tokotrienol je jedini kvantificirani tokotrienol u ovom istraživanju. Njegov prosječan sadržaj u suhom zrnu istraživanih hibrida početni dan skladištenja je iznosio 6,41 µg/g ST s rasponom vrijednosti od 4,81 µg/g ST (Bc 424) do 8,24 µg/g ST (Pajdaš), a Torbert i sur. (2002) u preglednom radu navode znatno veću prosječnu vrijednost 9,35 µg/g ST iz istraživanja na 15 linija kukuruza. Nakon siliranja prosječna vrijednost ovog tokola se kretala u rasponu od 4,29 µg/g ST (Bc 424) do 5,97 µg/g ST (Bc 344), s padom prosječne vrijednosti na 5,25 µg/g ST što čini pad sadržaja za 18,05% zbog postupaka tijekom siliranja i pripreme uzorka. Promjene sadržaja γ-tokotrienola svih istraživanih hibrida kukuruza u suhom i siliranom rehidriranom zrnu tijekom šestomjesečnog razdoblja prikazane su u tablici 5.

Kao i kod tokoferola, najveći pad sadržaja γ-tokotrienola u silaži rehidriranog zrna zabilježen je 21. dana skladištenja kada su silaže istraživanih hibrida u prosjeku sadržavale 3,70 µg/g ST ovog tokola (pad prosječno 42,25% u odnosu na sadržaj u suhom zrnu na početku istraživanja). Također, pad sadržaja u silažama rehidriranog zrna zabilježen je do 38. dana

nakon čega nema značajnih promjena do kraja promatranog razdoblja. Kod suhog zrna, a slično tokoferolima, sadržaj γ-tokotrienola opadao je polako tijekom cijelog šestomjesečnog razdoblja, a najveći pad je zabilježen od na kraju u posljednjem razdoblju tj. od 100. do 185. dana istraživanja (prosječno od 5,66 do 3,72 μg/g ST).

U odnosu na ovo istraživanje, Rice i sur. (1985) nisu zabilježili značajne promjene u sadržaju γ-tokotrienola u rehidriranom ječmu prilikom anaerobnog skladištenja nakon približnog vremena skladištenja (24. dana), ali su zabilježili gubitak od 25,13% u odnosu na sadržaj početnog uzorka u uzorcima s dodatkom propionske kiseline.

Nakon šestomjesečnog razdoblja skladištenja, prosječna vrijednost sadržaja γ-tokotrienola suhog zrna je smanjena za 41,59%, te 40,55% u silaži rehidriranog zrna u odnosu na sadržaj u suhom zrnu na početku istraživanja. Ovi rezultati ukazuju na blago višu degradaciju γ-tokotrienola dužim skladištenjem suhog zrna u odnosu na silažu rehidriranog zrna.

Tablica 5. Sadržaj γ-tokotrienola (μg/g) u suhoj tvari sedam hibrida kukuruza suhog i siliranog visoko vlažnog zrna tijekom šestomjesečnog razdoblja

Hibrid	**Skladištenje**	**Vrijeme (dan)**					
		0	21	38	63	100	185
Bc 344	Suho	7,64	7,07		6,55	6,36	4,76
	Silirano	5,97	3,74	3,17	2,26	3,77	3,96
Bc 418b	Suho	6,12	6,03		6,30	6,91	3,83
	Silirano	5,61	3,62	3,14	3,53	4,12	3,80
Bc 424	Suho	4,81	4,47		4,35	4,36	2,84
	Silirano	4,29	3,36	2,44	2,96	3,51	2,96
Bc 525	Suho	5,35	5,74		5,37	5,57	3,74
	Silirano	5,11	4,01	3,90	4,43	4,30	4,41
Bc 572	Suho	5,62	4,56		4,71	3,98	3,12
	Silirano	4,52	3,31	2,77	3,60	3,29	3,12
Kekec	Suho	7,09	7,01		5,68	5,77	3,80
	Silirano	5,32	3,51	3,37	3,56	4,78	4,48
Pajdaš	Suho	8,24	7,41		6,36	6,70	3,95
	Silirano	5,96	4,36	4,84	4,34	4,36	3,94
Svi hibridi	Suho	6,41	6,04		5,62	5,66	3,72
	Silirano	5,25	3,70	3,38	3,53	4,02	3,81

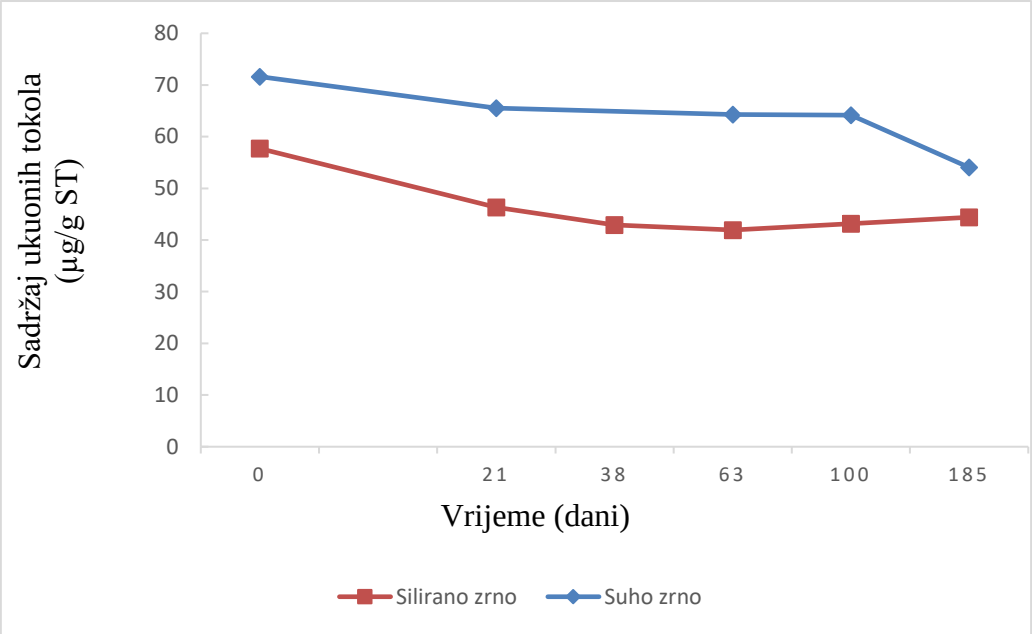
4.1.5. Promjena sadržaja ukupnih tokola

U grafikonu 2. prikazane su promjene prosječnog sadržaja ukupnih tokola suhog i siliranog rehidriranog zrna kukuruza tijekom promatranog razdoblja skladištenja. Prosječan sadržaj ukupnih tokola istraženih hibrida nulti dan je iznosio 71,61 µg/g ST, dok Weber (1987) u istraživanju na četiri hibrida navodi znatno niže vrijednosti koje se kreću u rasponu od 36,9 do 62,30 µg/g ST. Zatim, Grbeša (2016) u istraživanju na hibridima Bc Instituta također navodi nižu prosječnu vrijednost od 43,32 µg/g ST. Nakon postupka rehidriranja i siliranja te pripreme uzoraka koji su uzrokovali degradaciju tokola, sadržaj je iznosio 57,69 µg/g ST pri čemu je zabilježen pad u prosjeku od 19,44% za sve istraživane hibride.

Kod oba načina skladištenja, najveći pad sadržaja ukupnih tokola utvrđen je u razdoblju do 21. dana skladištenja (8,84% u suhom zrnu te 35,35% u silaži rehidriranog zrna), te blaži pad do 38. dana u silaži rehidriranog zrna (7,37%). Od 38. do 185. dana nije bilo značajnijih promjena sadržaja ukupnih tokola u silaži rehidriranog zrna, dok je kod suhog zrna utvrđen značajan pada sadržaja u razdoblju od 100. do 185. (30,80%) dana skladištenja. Očekivano, promjene sadržaja ukupnih tokola tijekom promatranog razdoblja skladištenja pratile su promjene sadržaja pojedinačnih tokola bez obzira u suhom zrnu ili silaži rehidriranog zrna.

Hidalgo i sur. (2008) tijekom 242 dana skladištenja zrna pšenice navode pad sadržaja ukupnih tokola od 9,40% pri skladištenju na temperaturi od 5 °C, a pri skladištenju na 20 °C taj pad se povećao te je iznosio 25,00%, a s daljnjim porastom temperature rasla je brzina degradacije. Budući da se u ovom istraživanju u razdoblju od 38. dana do 185. dana temperatura skladištenja povećala za 10 °C (grafikon 1), utjecaj temperature skladištenja na pad sadržaja tokola utvrđen u radu Hidalgo i sur. (2008) potvrđuje kako je najveći pad od 100. do 185. dana u suhom zrnu ovog istraživanja posljedica upravo porasta temperature u skladišnom prostoru.

Sadržaj ukupnih tokola na kraju pokusnog razdoblja u suhom zrnu je iznosio 54,04 µg/g ST što je 38,33% manje u odnosu na početni sadržaj. U silaži visoko vlažnog zrna sadržaj tokola je iznosio 44,38 µg/g ST što je znatno manji – 23,07%-tni pad sadržaja, no nakon pribrojavanja početnog gubitka tokola uzrokovanog početnom fazom siliranja, ukupan pad sadržaja tokola iznosi 42,5%, što je za 4,18% veći pad sadržaja tokola u odnosu na sadržaj u suhom zrnu.



Grafikon 2. Prosječne vrijednosti sadržaja ukupnih tokola u suhom i siliranom zrnu sedam istraživanih hibrida kukuruza

4.2. Kinetika razgradnje tokola suhog i rehidriranog zrna hibrida kukuruza

Razgradnja pojedinačnih i ukupnih tokola suhog i siliranog rehidriranog zrna kukuruza istraživanih hibrida kukuruza praćena je kinetikom 1. reda (tablica 6 – 10). Kinetika razgradnje tokola u zrnu varirala je u skladu s utjecajem hibrida na sadržaj pojedinačnih i ukupnih tokola.

Kinetički parametri razgradnje α-tokoferola tijekom skladištenja suhog zrna i silaže rehidriranog zrna istraživanih hibrida prikazani su u tablici 6. Potencijalno razgradiva frakcija α-tokoferola suhog zrna (prosječno 12,40 µg/g) je bila slična početnoj vrijednosti sadržaja α-tokoferola suhog zrna (prosječno 12,67 µg/g dok je potencijalno razgradiva frakcija α-tokoferola silaže rehidriranog zrna (prosječno 7,92 µg/g) bila niža od na početne vrijednosti sadržaja α-tokoferola siliranog rehidriranog zrna (prosječno 9,70 µg/g).

Najviša brzina razgradnje α-tokoferola suhog zrna utvrđena je kod hibrida Kekec (0,00368 1/dan; tablica 6), a kod istog hibrida je određena i najviša brzina razgradnje u rehidriranom zrnu (0,00442 1/dan). Prema tome, bez obzira radilo se o suhom zrnu ili silaži rehidriranog zrna, ovaj hibrid je imao najmanje stabilan sadržaj α-tokoferola tijekom šestomjesečnog razdoblja skladištenja. Najniža brzina razgradnje α-tokoferola u siliranom rehidriranom zrnu utvrđena je kod hibrida Bc 525 (0,00071 1/dan) što upućuje da je ovaj hibrid bio pod najmanjim utjecajem uvjeta tijekom siliranja s obzirom na nisku brzinu razgradnje i u

suhom zrnu. S druge strane, utjecaj siliranja na α-tokoferol je bio najveći kod hibrida Bc 418b s obzirom na to da u suhom zrnu ima najnižu vrijednost brzine razgradnje ovog tokola (0,00064 u odnosu na 0,00205 1/dan).

Iako u dostupnoj literaturi nema podataka za kinetiku razgradnje tokola zrna kukuruza, mogu se pronaći podaci za druge žitarice. Tako su Hidalgo i sur. (2009) istraživali utjecaj temperature na kinetičke parametre razgradnje α-tokoferola i ukupnih tokola u brašnu pšenice. Ovisno o vrsti pšenice te pripremi brašna, autori su prikazali vrijednosti brzine razgradnje α-tokoferola od 0,00099 do 0,00214 1/dan pri 20 °C što je slično rasponu vrijednosti za zrno kukuruza u ovom istraživanju. Nadalje, hibridi u radu Hidalgo i sur. (2008) su se značajno razlikovali u brzini razgradnje α-tokoferola (0,000945 i 0,00195 1/dan) što je u skladu s rasponom vrijednosti istraživanih hibrida.

Tablica 6. Kinetika razgradnje α-tokoferola istraživanih hibrida u različitim načinima skladištenja

	Suho zrno		**Silirano zrno**	
Hibrid	C_{R0}	k	C_{R0}	k
Bc 344	13,30	0,00255	7,50	0,00257
Bc 418b	14,11	0,00064	9,57	0,00205
Bc 424	13,24	0,00064	9,49	0,00101
Bc 525	11,22	0,00094	8,26	0,00071
Bc 572	10,34	0,00168	6,82	0,00090
Kekec	7,08	0,00368	3,49	0,00442
Pajdaš	17,73	0,00175	10,56	0,00122
Svi hibridi	12,40	0,00152	7,92	0,00147

CR0, početna koncentracija (μg/g); k, brzina (1/dan)

Kinetički parametri razgradnje γ-tokoferola tijekom skladištenja suhog zrna i silaže rehidriranog zrna istraživanih hibrida prikazani su u tablici 7. Potencijalno razgradiva frakcija γ-tokoferola suhog zrna (prosječno 49,16 μg/g) je bila slična početnoj vrijednosti sadržaja γ-tokoferola suhog zrna (prosječno 50,39 μg/g). Potencijalna razgradiva frakcija γ-tokoferola silaže rehidriranog zrna (prosječno 35,54 μg/g) je bila niža od početne vrijednosti sadržaja γ-tokoferola siliranog rehidriranog zrna (prosječno 41,06 μg/g).

Najviša brzina razgradnje najzastupljenijeg tokola u suhom zrnu utvrđena je kod hibrida Kekec (0,00217 1/dan; tablica 7), te je ovaj hibrid najnestabilniji s obzirom na degradaciju i α- i γ-tokoferola u suhom zrnu. Samo kod hibrida Kekec i Pajdaš su vrijednosti degradacije γ-tokoferola bile niže u siliranom rehidriranom zrnu, ali unatoč tome, Pajdaš (0,00161 1/dan) je imao najvišu vrijednost brzine razgradnje ovog tokola između istraživanih

hibrida. Najniža brzina razgradnje γ-tokoferola u suhom zrnu određena je kod hibrida Bc 525 (0,00049 1/dan), te je on bio stabilan i u siliranom zrnu unatoč gotovo dvostruko višoj vrijednosti (0,00087 1/dan). Najstabilniji hibrid prema brzini razgradnje γ-tokoferola u silaži rehidriranog zrna je bio Bc 344 (0,00037 1/dan). S obzirom na raspon vrijednosti, γ-tokoferol istraživanih hibrida je stabilniji od α-tokoferola.

Tablica 7. Kinetika razgradnje γ -tokoferola istraživanih hibrida u različitim načinima skladištenja

	Suho zrno		**Silirano zrno**	
Hibrid	C_{R0}	k	C_{R0}	k
Bc 344	59,29	0,00101	40,47	0,00037
Bc 418b	48,46	0,00056	37,76	0,00105
Bc 424	53,78	0,00065	44,42	0,00085
Bc 525	37,33	0,00049	30,30	0,00087
Bc 572	35,08	0,00063	25,97	0,00108
Kekec	63,08	0,00217	37,35	0,00123
Pajdaš	47,67	0,00201	32,58	0,00161
Svi hibridi	49,16	0,00109	35,54	0,000973

C_{R0}, početna koncentracija (μg/g); k, brzina (1/dan)

Kinetički parametri razgradnje δ-tokoferola tijekom skladištenja suhog zrna i silaže rehidriranog zrna istraživanih hibrida prikazani su u tablici 8. I potencijalno razgradiva frakcija δ-tokoferola suhog zrna (prosječno 2,07 μg/g) i silaže rehidriranog zrna (prosječno 1,67 μg/g) su bile slične vrijednostima sadržaja δ-tokoferola određenim početnog dana istraživanja (prosječno redom 2,15 i 1,68 μg/g).

Kao i kod dosadašnjih tokoferola, hibrid Kekec je bio najnestabilniji s obzirom na brzinu razgradnje δ-tokoferola u suhom zrnu (0,00299 1/dan), te je kao kod γ-tokoferola u silaži rehidriranog zrna imao niže vrijednosti brzine razgradnje δ-tokoferola (0,00050 1/dan). Najstabilniji od istraživanih hibrida, bez obzira radilo se o suhom zrnu ili silaži rehidriranog zrna, bio je hibrid Bc 525 za kojeg su određene brzine razgradnje δ-tokoferola redom 0,00095 i 0,00045 1/dan.

Korelacijskom analizom ispitana je povezanost brzine razgradnje tokola i sadržaja masti s obzirom na to da je uloga tokola zaštita masti u zrnu kukuruza. Od prisutnih tokola značajna korelacija utvrđena je jedino za δ-tokoferola($P \leq 0,01$); za silažu rehidriranog zrna koeficijent korelacije brzine razgradnje ovog tokola i sadržaja masti iznosio je 0,92 te 0,66 za suho zrno. Dobivene korelacije ukazuju da je brzina razgradnje δ-tokoferola viša s porastom sadržaja sirovih masti u zrnu hibrida kukuruza bez obzira na način skladištenja jer se više δ-tokoferola troši za sprečavanje oksidacije nezasićenih masti (ulja) kukuruza.

Tablica 8. Kinetika razgradnje δ-tokoferola istraženih hibrida istraživanih hibrida u različitim načinima skladištenja

	Suho zrno		Silirano zrno	
Hibrid	C_{R0}	k	C_{R0}	k
Bc 344	2,28	0,00199	1,58	0,00081
Bc 418b	2,34	0,00166	1,89	0,00174
Bc 424	2,28	0,00139	2,06	0,00149
Bc 525	1,99	0,00094	1,78	0,00045
Bc 572	1,53	0,00160	1,33	0,00169
Kekec	2,16	0,00299	1,49	0,00050
Pajdaš	1,91	0,00202	1,57	0,00157
Svi hibridi	2,07	0,00177	1,67	0,00115

C_{R0}, početna koncentracija (μg/g); k, brzina (1/dan)

Kinetički parametri razgradnje γ-tokotrienola tijekom skladištenja suhog zrna i silaže rehidriranog zrna istraživanih hibrida prikazani su u tablici 9. Potencijalna razgradiva frakcija γ-tokotrienola suhog zrna (prosječno 6,25 μg/g) je bila približna početnoj vrijednosti sadržaja γ-tokotrienola suhog zrna (prosječno 6,41 μg/g). S druge strane, matematičkim modelom određena potencijalna razgradiva frakcija γ-tokotrienola silaže rehidriranog zrna (prosječno 4,21 μg/g) je bila gotovo dvostruko viša od početne vrijednost sadržaja γ-tokotrienola siliranog rehidriranog zrna (prosječno 2,25 μg/g).

Od sedam istraživanih hibrida, najviša brzina razgradnje γ-tokotrienola u suhom zrnu utvrđena je kod hibrida Pajdaš (0,00338 1/dan), a Kekec, hibrid s najvišim brzinama razgradnje tokoferola, ima jednu od najviših brzina razgradnje ovog tokotrienola (0,00317 1/dan). Kao i kod γ- i δ-tokoferola, hibrid Bc 525 je najstabilniji i kod degradacije γ-tokotrienola bez obzira radilo se o suhom zrnu (0,00170 1/dan) ili silaži rehidriranog zrna (0,00019 1/dan).

Kinetički parametri razgradnje γ-tokotrienola tijekom skladištenja suhog zrna i silaže rehidriranog zrna istraživanih hibrida prikazani su u tablici 10. Potencijalno razgradiva frakcija ukupnih tokola suhog zrna (prosječno 70,13 μg/g) je bila slična početnoj vrijednosti sadržaja ukupnih tokola suhog zrna (prosječno 71,61 μg/g). Međutim, potencijalno razgradiva frakcija ukupnih tokola silaže rehidriranog zrna (prosječno 49,33 μg/g) je bila nešto niža od početne vrijednosti sadržaja ukupnih tokola siliranog rehidriranog zrna (prosječno 57,69 μg/g).

Tablica 9. Kinetika razgradnje γ-tokotrienola istraživanih hibrida u različitim načinima skladištenja

	Suho zrno		Silirano zrno	
Hibrid	C_{R0}	k	C_{R0}	k
Bc 344	7,61	0,00233	4,37	0,00175
Bc 418b	6,59	0,00172	4,26	0,00107
Bc 424	4,90	0,00233	3,51	0,00114
Bc 525	5,81	0,00170	4,42	0,00019
Bc 572	5,35	0,00289	3,73	0,00128
Kekec	7,27	0,00317	4,06	-0,0004
Pajdaš	8,19	0,00338	5,21	0,00183
Svi hibridi	6,52	0,0025	4,21	0,00093

C_{R0}, početna koncentracija (µg/g); k, brzina (1/dan)

Najviša brzina razgradnje ukupnih tokola kukuruza u ovom istraživanju iznosila je 0,00240 1/dan, a utvrđena je u suhom zrnu hibrida Kekeca, u skladu s najvišim vrijednostima kod svih pojedinačnih tokola. Najveća brzina razgradnje siliranog rehidriranog zrna iznosila je 0,00155 1/dan kod hibrida Pajdaš. S druge strane, Bc 525 je bio najstabilniji hibrid s brzinama razgradnje ukupnih tokola 0,00071 1/dan u suhom zrnu i 0,00027 1/dan u silaži rehidriranog zrna. Uz Bc 525, kao jedan od najstabilnijih hibrida u degradaciji ukupnih tokola u suhom zrnu ističe se i Bc 418b (0,00071 1/dan) ali kod navedenog hibrida u siliranom rehidriranom zrnu dolazi do porasta brzine razgradnje.

Istraživani hibridi kukuruza su usporedivi s istraživanjem Hidalgo i sur. (2009) u brzini razgradnje ukupnih tokola. Brašno različitih kultivara pšenice u istraživanju navedenih autora je imalo sličan raspon vrijednosti (0,00097 – 0,00386 1/dan) pri temperaturi 20 °C bez obzira je li ta usporedba sa suhim ili siliranim rehidriranim zrnom ovog istraživanja.

Tablica 10. Kinetika razgradnje ukupnih tokola istraživanih hibrida u različitim načinima skladištenja

	Suho zrno		**Silirano zrno**	
Hibrid	C_{R0}	k	C_{R0}	k
Bc 344	82,37	0,00137	53,77	0,00072
Bc 418b	71,51	0,00071	53,41	0,00122
Bc 424	74,19	0,00081	59,47	0,00091
Bc 525	56,35	0,00071	44,74	0,00027
Bc 572	52,22	0,00104	37,86	0,00109
Kekec	79,55	0,00240	46,23	0,00119
Pajdaš	75,49	0,00208	49,92	0,00155
Svi hibridi	70,13	0,0013	49,33	0,00105

C_{R0}, početna koncentracija (μg/g); k, brzina (1/dan)

Rezultati kinetike razgradnje pojedinačnih i ukupnih tokolnih spojeva u ovom istraživanju, ukazuju da hibrid Kekec ima najvišu brzinu razgradnje tokola u suhom i siliranom rehidriranom zrnu, zatim hibrid Pajdaš, dok je hibrid najniže brzine razgradnje tokola Bc 525 kod oba načina skladištenja zrna kukuruza. Potencijalna razgradljiva frakcija je bila slična početnoj vrijednosti sadržaja pojedinačnih i ukupnih tokola u suhom zrnu, dok su se u silaži rehidriranog zrna te vrijednosti razlikovale.

5. Zaključak

Na temelju rezultata istraživanja, doneseni su sljedeći zaključci:

- Hibrid, način i vrijeme skladištenja imali su značajan utjecaj ($P < 0,001$) na sadržaj svih tokolnih spojeva u zrnu kukuruza, a kombiniranom varijancom utvrđen je značajan utjecaj ($P < 0,05$) interakcije hibrid×način skladištenja, način skladištenja×vrijeme skladištenja te hibrid×vrijeme skladištenja.

- Siliranje je uzrokovalo pad svih tokolnih spojeva već početnog dana prilikom pripreme mase za siliranje i pripreme uzoraka, pri čemu je utvrđen najveći pad *α*-tokoferola (23,40%), zatim *δ*-tokoferola (21,98), dok je najmanji pad *γ*-tokoferola i *γ*-tokotrienola (18,5 i 18,05%).

- Najveći pad sadržaja ukupnih tokola utvrđen je u razdoblju do 21. dana skladištenja (8,84% u suhom zrnu i 35,35% u silaži rehidriranog zrna). Kod silaže rehidriranog zrna, blaži pad tokola je još do 38. dana (7,37%) nakon čega do 185. dana nema značajnijih promjena sadržaja tokola. Kod suhog zrna sadržaj tokola postupno opada tijekom cijelog promatranog razdoblja a najveći pad je od 100. do 185. dana (30,80%).

- Hibrid Kekec je imao najveću brzinu razgradnje tokola u suhom i siliranom rehidriranom zrnu, dok je hibrid najmanje brzine razgradnje tokola Bc 525 kod oba načina skladištenja zrna kukuruza.

6. Popis literature

1. Adams, C. R., (1973). Effect of processing on the nutritional value of feeds. National Academy of Sciences. Washington DC, USA.
2. Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Prasad, S., Kannappan, R. (2010). Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: its potential against cancer and other chronic diseases. Biochemical pharmacology. 80(11): 1613-1631.
3. Ali, M., Cone, J. W., Hendriks, W. H., Struik P. C. (2014). Starch degradation in rumen fluid as influenced by genotype, climatic conditions and maturity stage of maize, grown under controlled conditions. Animal Feed Science and Technology. 193: 58 – 70.
4. Atkinson, J., Epand, R. F.,. Epand, R. M. (2008). Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review. Free Radical Biology and Medicine. 44: 739 – 764.
5. Barroeta A. C., Baucells M. D., Blanco Perez A., Calsamiglia S., Casals R., Cepero Briz R., Davin R., Gonzalez G., Hernandez M. J., Isabel B., Lopez Bote C., Rey I. A., Rodrigues M., Sanz J., Soto-Salanova M. F., Webwer G. (2012). Optimum vitamin nutrition in the production of quality animal foods. DSM Nutritional Products Limited. Unitet Kingdom.
6. Bc institut, <https://https://bc-institut.hr/kukuruz/>. Pristupljeno 5. srpnja 2018.
7. Bendich, A. (1987). In Proc. Roche technical symposium: the role of vitamins on animal performance and immune response. Nutley, New Jersey.
8. Bouwstra, R. J., Goselink R. M. A., Dobbelaar P., Nielen M., Newbold J. R., van Werven T., (2008). The relationship between oxidative damage and vitamin E concentration in blood, milk, and liver tissue from vitamin E supplemented and nonsupplemented periparturient heifers. J. Dairy Sci. 91: 977 – 987.
9. Bouwstra, R. J., Nielen, M., Stegeman, J. A., Dobbelaar, P., Newbold, J. R., van Werven, T., (2010). Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. Part I: Adverse effect on incidence of mastitis postpartum in a double-blind randomized field trial. Journal of Dairy Science. 93(12): 5684 – 5695.
10. Brigelius-Flohe, R., Kelly, F. J., Salonen, J. T., Neuzil, J., Zingg, J.M., Azzi, A. (2002). The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. The American Journal of Clinical Nutrition. 76; 703 – 716.
11. Brigelius-Flohe, R., Traber, M. G. (1999). Vitamin E: Function and metabolism. The FASEB Journal. 13(10): 1145 – 1155.
12. Chang, P. N., Yap, W. N., Lee, D. T., Ling, M. T., Wong, Y. C., Yap, Y. L. (2009). Evidence of gamma-tocotrienol as an apoptosis-inducing, invasion-suppressing, and chemotherapy drug-sensitizing agent in human melanoma cells. Journal nutrition and cancer. 61: 357 – 366.
13. Coelho, M. B. (1991). Vitamin stability in premixes and feeds: A practical approach. BASF Technical Symposium, Bloomington, Minnesota.

14. Combs, C. F., McClung, J. P., (2017). The vitamins fundamental aspects in nutrition and health. Fifth Edition. 208 – 441.
15. Combs, G. F., Jr. (1992). Vitamin E, in the vitamins: fundamental aspects in nutrition & health. Academic Press Inc. San Diego. 179 – 203.
16. Constantinou, C., Hyatt, J. A., Vraka, P. S., Papas, A., Papas, K.A., Neophytou, C. (2009). Induction of caspase-independent programmed cell death by vitamin E natural homologs and synthetic derivatives. Journal Nutrition and Cancer. 61: 864 – 874.
17. Correa, C. E. S., Shaver, R. D., Pereira, M. N., Lauer, J. G., Kohn, K. (2002). Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. Journal of dairy science. 85: 3008 – 3012.
18. Diaz, E., Ouellet, D. R., Amyot, A., Berthiaume, R., Thivierge, M. C. (2013). Effect of inoculated or ammoniated high-moisture ear corn on finishing performance of steers. Animal feed science and technology. 182: 25 – 32.
19. Dove, C. R.,Ewan, R. C. (1991). Effect of trace minerals on the stability of vitamin E in swine grower diets. Journal of Animal Science. 69: 5.
20. DSM (2016). Vitamin supplementation guidelines 2016 for animal nutrition. DSM N.
21. EFSA, (2006). Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. Scientific Committee on Food. Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies.
22. Ekinci, C., Broderick, G. A. (1997). Effect of processing high moisture ear corn on ruminal fermentation and milk yield. Journal of dairy science. 80: 3298 – 3307.
23. Ferraretto, L. F., Crump, P. M., Shaver, R. D. (2013). Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. Journal of dairy science. 96: 533 – 550.
24. Firkins, J. L., Eastridge, M. L., St-Pierre, N. R., Noftsger, S. M. (2001). Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. Journal of Animal Science. 79E: 218 – 238.
25. Galanakis, Ch. M. (2017). Nutraceutical and functional food components. Effects of innovative processing techniques. Galanakis Laboratories, Chania, Greece.
26. Goffman, F. D., Bohme, T. (2001). Relationship between fatty acid profile and vitamin E content in maize hybrids (Zea mays L.). Jurnal Agric Food Chem. 49: 4990 – 4994.
27. Grbeša, D. (2016). Hranidbena svojstva kukuruza. Bc Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja d.d., Zagreb. <https://bc-institut.hr/wp-content/uploads/2017/10/Grbesa_Hranidbena-svojsta-kukuruza_web.pdf>. Pristupljeno 3. srpnja 2018.
28. Grbeša, D. (2017). Interna skripta. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
29. Hardy, B., Frape, D. L. (1983). Micronutrients and reproduction, No. 1895. Hoffmann-La Roche, Basel.
30. Hess, J. L. (1993). Vitamin E: ~-Tocopherol, in antioxidants in higher plants. CRC Press. Alscher, R.G., and Hess, J.L., eds. Boca Raton. 111 – 134.

31. Hidalgo, A., Brandolin, A., Pompei, C. (2008). Kinetics of tocols degradation during the storage of einkorn (Triticum monococcum L. ssp. monococcum) and breadwheat (Triticum aestivum L. ssp. aestivum) flours. Food Chemistry 116: 821 – 827.
32. Hidiroglou, M. (1989). Mammary transfer of vitamin E in dairy cows. Journal of Dairy Science. 72(4): 106 7 – 1071.
33. Hoffman, P. C., Esser, N. M., Shaver, R .D., Coblentz, W., Scott, M. P., Bodnar, A. L., Schmidt, R., Charley, B. (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.
34. Huhtanen, P., Sveinbjörnsson, J. (2006). Evaluation of methods for estimating starch digestibility and digestion kinetics in ruminants. Animal feed science and technology. 130: 95 – 113.
35. Hui, Y.H. (1991). Encyclopedia of food science and technology. John Wiley and sons, Inc., New York.
36. Hutchinson, L. J., Scholz, W., Drake, T. R. (1982). J. Am. Vet. Med. Assoc. 181: 581.
37. INRA (2018). Feedinf system for ruminats. INRA and Wagebingen Acadenuc Publisher, Wageningen, The Netherlands. 640.
38. Junges, D., Morais, G., Spoto, M. H. F., Santos, P. S., Adesogan, A. T., Nussio, L. G., Daniel, J. L. P. (2017). Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. Journal of Dairy Science. 100: 9048 - 9051.
39. Kan, P., Mitchell, M. A., Carliste, A. J. (1993). Effect of vitamin E on thyroid hormone production in teart stressed broiler chicken. Simp. On Poultry Welfare. Edinburg. 295 – 297.
40. Kashiwagi, K., Harada, K., Yano, Y., Kumadaki, I., Hagiwara K., Takebayashi, J. (2008). A redox-silent analogue of tocotrienol inhibits hypoxic adaptation of lung cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 81: 365 – 875.
41. Kljak, K. (2012). Antioksidacijska i pigmentacijska svojstva karotenoida iz zrna hibrida kukuruza u proizvodnji jaja. Doktorska disertacija. Agronomski fakultet sveučilišta u Zagrebu.
42. Kuchan, M.,J., Jensen, S. K., Johnson, E. J., Lieblein-Boff, J. C. (2016). The naturally occurring α-tocopherol stereoisomer RRR-α-tocopherol is predominant in the human infant brain. British Journal of Nutrition. 116(1): 126 – 131.
43. Kung, L., Windle, M. C., Walker, N. (2014). The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. Journal of dairy science. 97: 1707 – 1712.
44. Kurilich, A. C., Juvik, J. A. (1999). Simultaneous quantification of carotenoids and tocopherols in corn kernel extracts by HPLC. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 22: 2925 – 2934
45. Langman, M. (2003). Safe upper levels for vitamins and minerals. Expert Group on Vitamins and Minerals. Food Standards Agency. 11: 7.

46. Lauridsen, C., Engel, H., Craig, A. M., Traber. M. G. (2002). Relative bioactivity of dietary RRR and all rac-α tocopherol acetates in swine assessed with deuterium-labeled vitamin E. Journal of Animal Science. 80: 702.
47. Li, F. J., Shen, L., Ji, H. F. (2011). Dietary intakes of vitamin E, vitamin C, and β-carotene and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. Journal of Alzheimer's Disease, 31(2): 253 – 258.
48. Liu, J. F., Huang, C. J. (1996). Dietary oxidized frying oil enhances tissue alpha-tocopherol depletion and radioisotope tracer excretion in vitamin E-deficient rats. The Journal of Nutrition. 126(9): 2227 – 2235.
49. Lopes, J. C., Shaver, R. D., Hoffman, P. C., Akins, M. S., Bertics, S. J., Gencoglu, H., Coors, J. G. (2009). Type of corn endosperm influences nutrient digestibility in lactating dairy cows. Journal of dairy science. 92: 4541-4548.
50. Machlin, L. J. (1991). In handbook of vitamins (L.J. Machlin, ed.), Marcel Dekker, New York. 99.
51. Macrae, R., Robinson, R. K., Sadler, M. J. (1993). Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. Academic Press. London.
52. Mahan, D. C., Yang, H., Hill, D. A., Cecava, M. J. (2009). Effect of vitamin E source, natural versus synthetic, and quantity on serum and tissue alpha-tocopherol concentrations in finishing swine. Journal of Animal Science. 87(12): 4057 – 4063.
53. Marin-Guzman, J., Mahan, D. C., Jones, L. S., Pate, J. L. (1989). Ohio Swine Res. Ind. Rep. The Ohio State Univ., Journal of Animal Science. Dept. Series. 89(1): 20.
54. McDonald, P., Henderson, N., Heron, S. (1991). The biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe. Marlow, UK.
55. McDowell, L. R., Williams, S.N., Hidiroglou, N., Njeru, C.A., Hill, G. M. Ochoa, L., Wilkinson, N.S. (1996). Vitamin E supplementation for the ruminant. Animal Feed Science and Technology. 60: 273.
56. McDowell, L., (2000). Vitamins in animal and human nutrition. Second edition. Iowa State University Press. United States of America.
57. McIntyre, B. S., Briski, K. P., Gapor, A., Sylvester, P. W., (2000). Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on preneoplastic and neoplastic mouse mammary epithelial cells. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 224(4): 292 – 301.
58. McMurray, C. H., Rice, D. A., Blanchflower, W. J. (1980). Changes in plasma levels of linoleic and linolenic acids in calves recently introduced to a spring pasture. The Proceedings of the Nutrition Society. 65A: 39.
59. Miller, J. K., Brzezinska-Slebodzinska E., Madsen, F. C. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. Journal of Dairy Science. 76: 2812 – 2823.
60. Newbold, J. R., Lewis, E. A., Lavrijssen, J., Brand, H. J., Vedder, H., Bakker, J. (2006). Effect of storage time on ruminal starch degradability in corn silage. Journal of Dairy Science 84(1): 94 .

61. Ngonyamo-Majee, D., Shaver, R. D., Coors, J. G., Sapienza, D., Lauer, J. G. (2009). Influence of single-gene mutations, harvest maturity and sample processing on ruminal in situ and post-ruminal in vitro dry matter and starch degradability of corn grain by ruminants. Animal feed science and technology. 151: 240 – 250.
62. NRC, (1973). The nutrient requirements for swine. National Academy of Sciences. Washington, DC.
63. NRC, (1989). Nutrient requirements of dairy cattle, 6th Ed.
64. NRC, (1994). Nutrient requirements of poultry, 9th Ed.
65. Ørskov, E. R. (1986). Starch digestion and utilization in ruminants. Journal of Animal Science. 63: 1624 – 1633.
66. Philippeau, C., Landry, J., Michalet-Doreau, B. (2000). Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 404 – 408.
67. Philippeau, C., Michalet-Doreau, B. (1998). Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. Journal of dairy science. 81. 2178 - 2184
68. Piper, R. C., Froseth, J. A., McDowell, L. R., Kroening, G. H., Dyer, I. A. (1975). American Journal of Veterinary Research. 36: 273.
69. Politis, I., Bizelis I., Tsiaras A., Baldi A. (2004). Effect of vitamin E supplementation on neutrophil function, milk composition and plasmin activity in dairy cows in a commercial herd. Journal of Dairy Research. 71: 273 – 278.
70. Qureshi, M. A., Vanhooser, S. L., Teeter, R. G., (2000). Dietary vitamin E, vitamin C and drinking water electrolyte effects on broiler performance and immunity during exposure to high cycling ambient temperature. Poultry Science.
71. Rice, D. A., Blanchflower W. J., Mcmurrayc. H. (1985) The effects of moisture, propionic acid, sodium hydroxide and anaerobiasis on the stability of vitamin £ in stored barley. The Journal of Agricultural Science. 105: 16 – 19.
72. Sakai, M., Okabe, M., Tachibana. H., Yamada, K. (2006). Apoptosis induction by gamma-tocotrienol in human hepatoma Hep3B cells. J Nutr Biochem. 17: 672 – 676.
73. Sauvant, D., Perez, J.M. and G.Tran (2004). Tables of composition and nutritional value of feed materials. Wageningen Academic Publisher & INRA Paris. Nutritional Products Europe Ltd.
74. Scott, M. L., Nesheim, M. C., Young, R. J. 1982. The nutrition of the chicken, third ed. Scott, M.L., & Associates, Ithaca, New York. 490 – 493.
75. Serbinova, E. A., Packer, L. (1994). Antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. Methods Enzymol. 66: 234 - 354.
76. Shun, M.C., Yu, W., Gapor, A., Parsons, R., Atkinson, J., Sanders, B.G., Kline, K., (2004) Pro-apoptotic mechanisms of action of a novel vitamin E analog (alpha-TEA) and a naturally occurring form of vitamin E (delta--tocotrienol)

in MDA-MB-435 human breast cancer cells. Nutrition and Cancer 48(1): 95 – 105.
77. Siegel, P. B., Larson, S. T., Emmerson, D. A., Gerart, P. A., Picard, M. (2000). Feeding regimen, dietary vitamin E and genotype influences on immunological and production traits of broilers. J. Appl. Pultry Res. 9: 269 – 278.
78. Singh, J., Dartois, A., Kaur, L. (2010). Starch digestibility in food matrix: a review. Trends in Food Science & Technology. 21: 168-180.
79. Statistical Analysis System (SAS), (2015). OnlineDoc® Software Release 9.4., SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
80. Stock, R. A., Sindt, M. H., Cleale, R. M., Britton, R. A. (1991). High-moisture corn utilization in finishing cattle. Journal of animal science. 69: 1645 – 1656.
81. Stone, W.L., LeClair, I., Ponder, T., (2003) Infants discriminate between natural and synthetic vitamin E. The American Journal of Clinical Nutrition. 77: 899 – 906.
82. Suarna C., Hood R. L., Dean R. T., Stocker R. (1993). Comparative antioxidant activity of tocotrienols and other natural lipid-soluble antioxidants in a homogeneous system, and in rat and human lipoproteins. Biochim Biophys Acta. 70: 163 – 166.
83. Suzuki, Y. J., Tsuchiya, M., Wassall, S. R., Choo, Y. M., Govil, G., Kagan, V. E., and Packer, L. (1993). Structural and dynamic membrane properties of α-tocopherol and α-tocotrienol: Implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. Biochemistry. 32: 10692 – 10699.
84. Svečnjak, Z., Varga, B., Grbeša, D., Štafa, Z. Uher, D. (2007). Prinos i kvaliteta vlažnog zrna i klipa kukuruza u optimalnim i naknadnim rokovima sjetve. Mljekarstvo 57: 321 – 335
85. Tengerdy, R.P. (1980). In vitamin E: A comprehensive treatise (Machlin, L. J.,). Marcel Dekker, New York.
86. Torbert R,. Rocheford, Ph. D., Jeffrey, C., Wong, Ph. D., Cem, O., Egesel, Ph., D., Robert J., Lambert, Ph., D. (2002). Enhancement of vitamin E levels in corn. Journal of the American College of Nutrition. 21(3): 191 –198.
87. Traber, M.G., Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. Free Radic. Biol. Med. 43: 4 – 15.
88. United States Pharmacopeia. (1999). Rockville. MD.
89. Wada, S., Satomi, Y., Murakoshi, M., Noguchi, N., Yoshikawa, T., and Nishino, H. (2005). Tumor suppressive effects of tocotrienol in vivo and in vitro. Cancer Lett. 229: 181 – 191.
90. Wagner, K. H., Kamal-Eldin, A., Elmadfa, I. (2004). gama-Tocopherol—an underestimated vitamin? Annals of Nutrition and Metabolism. 4: 169 – 188.
91. Wang, J. Q., Yin, F. G., Zhu, C., Yu, H., Niven, S. J., de Lange, C. F. M., Gong, J. (2012). Evaluation of probiotic bacteria for their effects on the growth performance and intestinal microbiota of newly-weaned pigs fed fermented high-moisture maize. Livestock Science. 145: 79 – 86.

92. Watson, S. A. (2003): Description, development, structure, and composition of the corn kernel. U Corn: Chemistry and technology (P.J. White i L.A. Johnson, urednici). American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota. SAD. 68 – 106.
93. Weber, E. J. (1987): Carotenoids and tocols of corn grain determined by HPLC. JAOCS 64: 1129 – 1134.
94. Weinberg, Z. G. (2003). Effect of lactic acid bacteria on animal performance. Indian Journal of Biotechnology 2: 378 – 381.
95. 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.
96. Weiss, W. P., D. A. Todhunter, J. S. Hogan, and K. L. Smith. (1990). Effect of duration of supplementation of selenium and vitamin E on periparturient dairy cows. Journal of Dairy Science. 73: 3187 – 3194.
97. Wu, G. (2018). Principles of animal nutrition. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, USA. 772.
98. Young, L. G., Miller, R. B., Edmeades, D. M., Lun, A., Smith G. C., King. G. J. (1978). Influence of method of corn storage and vitamin E and selenium supplementation on pig survival and reproduction. Journal of Animal Science. 47: 639 – 647.
99. Zingg, J. M., Azzi, A. (2004). Non-antioxidant activities of vitamin E. Current Medicinal Chemistry. 11: 1113 – 1133.