Utjecaj hibrida i dodataka silaži na udio ukupnih i γ-zeina tijekom siliranja visoko vlažnog zrna kukuruza

Duvnjak, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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:204:682867

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Marija Duvnjak

Utjecaj hibrida i dodataka silaži na udio ukupnih i γ- zeina tijekom siliranja visoko vlažnog zrna kukuruza

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Marija Duvnjak

Influence of corn hybrids and type of silage additives on total and *γ*- zein content during the high moisture corn silage production

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016



Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Marija Duvnjak

Utjecaj hibrida i dodataka silaži na udio ukupnih i *γ*- zeina tijekom siliranja visoko vlažnog zrna kukuruza

DOKTORSKI RAD

Mentori: prof. dr. sc. Darko Grbeša
doc. dr. sc. Mario Cindrić

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Marija Duvnjak

Influence of corn hybrids and type of silage additives on total and *γ*- zein content during the high moisture corn silage production

DOCTORAL THESIS

Supervisors: PhD Darko Grbeša, full professor
PhD Mario Cindrić, assistant professor

Zagreb, 2016

Bibliografski podaci:

- **Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti
- **Znanstveno polje:** Poljoprivreda (agronomija)
- **Znanstvena grana:** Hranidba životinja
- **Institucija:** Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet,
  Zavod za hranidbu životinja
- **Voditelj doktorskog rada:** prof. dr. sc. Darko Grbeša
  doc. dr. sc. Mario Cindrić
- **Broj stranica:** 157
- **Broj slika:** 45
- **Broj tablica:** 35
- **Broj priloga:** -
- **Broj literaturnih referenci:** 180
- **Datum obrane doktorskog rada:** 15. travnja 2016
- **Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:**
  1. red. prof. dr. sc. Zlatko Svečnjak
  2. izv. prof. dr. sc. Anita Slavica
  3. doc. dr. sc. Kristina Kljak

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4, p.p. 550, 10 000 Zagreb

Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10 000 Zagreb

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 13. siječnja 2015., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 14. travnja 2015.

Ocjena doktorskog rada

Ovu disertaciju ocijenilo je povjerenstvo u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Zlatko Svečnjak,

   redoviti profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2. Izv. prof. dr. sc. Anita Slavica,

   izvanredna profesorica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

3. Doc. dr. sc. Kristina Kljak,

   docentica Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Disertacija je obranjena na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu,_____pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Zlatko Svečnjak, _____

redoviti profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2. Izv. prof. dr. sc. Anita Slavica, _____

izvanredna profesorica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

3. Doc. dr. sc. Kristina Kljak, _____

docentica Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

prof. dr. sc. Darko Grbeša

Prof. dr. sc. Darko Grbeša redoviti je profesor u trajnom zvanju na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao je 1980. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje se zapošljava 1981. godine. Na istom fakultetu magistrirao je 1988. godine s magistarskim radom *Pepeo netopiv u kiselini i pepeo netopiv u kiselom detergentu kao indikatori probavljivosti biljne stanične stijenke i njenih sastojaka*. Doktorirao je 1996. godine s doktorskim radom *Odnos između sadržaja topljivosti minerala iz krmnih trava i mahunarki u buragu ovaca* na istom fakultetu. Na preddiplomskom studiju Animalnih znanosti koordinator je modula Hranidba životinja i suradnik na modulu Sigurnost hrane. Voditelj je diplomskog studija Hranidba životinja i hrana u sklopu kojeg je koordinator modula Hrana za životinje i Hranidba preživača. Suradnik je na još pet modula diplomskih studija (Precizna hranidba ovaca i koza, Hranidba goveda u proizvodnji mesa, Tehnologije i tehnički procesi u proizvodnji mlijeka i mesa, Pisanje i izlaganje znanstvenog rada i Žitarice – zrnate, škrobne kulture) i koordinator je modula Metode hranidbenih istraživanja poslijediplomskog doktorskog studija Poljoprivredne znanosti. Bio je voditelj ili suradnik na više od 15 znanstvenih projekata u Republici Hrvatskoj. Do danas je tri puta bio stipendist Cochran Fellowship američkog Ministarstva poljoprivrede te je sudjelovao na 15 znanstvenih usavršavanja na vodećim europskim znanstvenim ustanovama u području hranidbe životinja. Kao prvi autor ili koautor od 1982. godine do danas objavio je oko 175 znanstvenih i stručnih članaka te dvije znanstvene knjige i jedan sveučilišni udžbenik. Sudjelovao je na dvadesetak znanstvenih skupova u zemlji i desetak u inozemstvu, te presjedao na 12 skupova. Član je Znanstvenog odbora Vijeća Hrvatske agencije za hranu za dodatke i proizvode ili tvari koje se koriste u proizvodnji hrane za životinje (od 2008.), znanstvenog i stručnog društva Društvo agronoma i World Poultry Science Association (WPSA, od 2001.), uređivačkog odbora časopisa *Krmiva* i *Praxis Veterinaria*, Poslovnog udruženja industrije stočne hrane RH, a od 1993. godine član je znanstveno-stručnog skupa Krmiva.

Doc. dr. sc. Mario Cindrić

Doc. dr. sc. Mario Cindrić, viši znanstveni suradnik, voditelj je Laboratorija za sistemsku biomedicinu u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. Unutar Laboratorija za sistemsku biomedicinu vodi i Centar za proteomiku i spektrometriju masa te je dodatno predsjednik Povjerenstva za intelektualno vlasništvo Instituta Ruđer Bošković. Diplomirao je 1998. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s temom *Sinteza i spektralne karakteristike specifično izotopno obilježenih cis- i trans- stilbena i njihovih izotopomera*. Doktorirao je 2004. godine s doktorskim radom *Karakterizacija rekombinantnih proteina tehnikama tekućinske kromatografije i spektrometrije masa* na doktorskom studiju Kemija, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Vlaste Drevenkar. Kao nastavnik sudjeluje ili je nositelj više različitih modula na dodiplomskom, diplomskom i poslijediplomskom doktorskom studiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu: Uvod u proteomiku, Metode istraživanja proteina, Bioanalitika, Kromatografske metode u analitici. Član je različitih profesionalni društava od kojih su neka: Hrvatsko kemijsko društvo, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (u sklopu kojeg je bio i voditelj Sekcije za kromatografiju), American Society for Mass Spectrometry, The Chromatographic Society. Posjeduje više od 12 certifikata iz područja kromatografskih metoda i spektrometrije masa, od kojih su neki: *Agilent 1100 liquid chromatography system*, *Agilent 1100 liquid chromatography preparative system*, *Waters CapLC system*, *Waters triple quadrupole mass spectrometer (Quattro Micro)*, *Waters Q-TOF Micro mass spectrometer*, *Applied Biosystems Voyager-DE STR MALDI-TOF mass spectrometer*. Nositelj je tri patenta: *Method of detection of amino acid sequence and/or identification of peptides and proteins, by use of a new derivatization reagent and synthesis of 5-formyl-benzene-1,3-disulphonic acid as derivatization reagent*, *Mass spectrometry - based protein identification*, *Proteomics profiles and detection methods of proteins in blood plasma*. Od 2004. godine kao prvi autor ili koautor objavio je 29 radova A1 katerogije, tri poglavlja u knjigama te je ostvario više sudjelovanja na međunarodnim kongresima i objavljivanja radova A2 kategorije. Kao voditelj ili suradnik sudjelovao je na 8 međunarodnih i nacionalnih znanstvenih projekata, od kojih su zadnji: *RapidCell – Rapid identification of cells in a clinical environment* (IPA-in projekt), *Proteomska analiza tkiva u bolesnika s karcinomom prostate* (MZOS-ov projekt), *Biotipizacija kliničkih mikroorganizama* (Ustavna potpora HRZZ-a). Do danas je bio mentor 11 završnih i diplomskih radova te doktorskih disertacija.

Zahvala

Hvala mentorima, prof. dr. sc. Darku Grbeši i doc. dr. sc. Mariju Cindriću na ukazanom povjerenju i podršci tijekom provedbe eksperimentalnog dijela istraživanja. Također, hvala puno na konstruktivnim komentarima i savjetima na oblikovanju pismenog dijela disertacije.

Predsjedniku povjerenstva, prof. dr. sc. Zlatku Svečnjaku, veliko hvala na potpori i savjetima, ne samo tijekom izrade ovog rada nego i inače. Potpora koju pružate svim studentima poslijediplomskog doktorskog studija poljoprivrednih znanosti pokazuju da ste istinski životni učitelj.

Izv. prof. dr. sc. Aniti Slavici od srca hvala na komentarima i pomoći tijekom oblikovanja disertacije. Isto tako hvala i kolegici, doc. dr. sc. Kristini Kljak, na komentarima ovog rukopisa.

Veliko hvala svim zaposlenicima Zavoda za hranidbu životinja na čelu s predstojnikom Zavoda, prof. dr. sc. Zlatkom Janječićem. Hvala vam svima na potpori, pogotovo kolegicama Kseniji Gazić, izv. prof. dr. sc. Jasni Pintar i Višnjici Loje. Hvala i našem predstojniku u mirovini, prof. dr. sc. Stjepanu Mužicu.

Hvala i kolegicama dr. sc. Ani Butorac i Kristini Perica, dipl. ing. na pomoći i savjetima tijekom eksperimentalnog dijela istraživanja.

Veliko hvala mojoj obitelji na potpori i strpljenju. Bez takvog oslonca ovaj rad ne bi bio izvediv. Hvala i ostalim dragim ljudima, prijateljima i bližnjima.

Sažetak

Siliranje visoko vlažnog zrna kukuruza način je da se očuva zrno kukuruza od berbe do berbe. U klasičnoj teoriji siliranje je metoda konzerviranja uz pomoć anaerobnih uvjeta i bakterija mliječne kiseline. Proizvodnja organskih kiselina, u najvećem dijelu mliječne kiseline, snižava pH koji inhibira nepoželjne mikroorganizame i sprječava daljnje promjene u siliranoj masi 1−2 mjeseca nakon početka siliranja. Suvremena istraživanja ukazuju na to da silaža nastavlja fermentirati i nakon 1−2 mjeseca, što bi za posljedicu moglo imati i kontinuirane promjene sastava i probavljivosti zrna kukuruza. Cilj istraživanja bio je utvrditi kako dodatak inokulanta i mliječne kiseline prilikom siliranja vlažnog zrna u periodu od godine dana utječe na intenzitet fermentacije i kvalitetu silaža te na razgradnju 16 kDa i 27 kDa *γ*-zeina hibrida različite tvrdoće zrna i udjela ukupnih zeina. Dodatno se ispitala i buražna razgradivost suhe tvari i škroba ispitivanih silaža. Tri hibrida (Bc 513 pc, Bc 462 i Bc 344) uzgojena u *split-plot* dizajnu u pet ponavljanja pri istim agroklimatskim uvjetima razlikovala su se u tvrdoći zrna, što su pokazali rezultati Stenvertove analize tvrdoće zrna i prava gustoća. Udio ukupnih zeina razlikovao se signifikantno između tri ispitivana hibrida kukruza (Bc 513 pc: 59,96% SP; Bc 462: 55,13% SP; Bc 344: 48,75% SP). Silaže sva tri hibrida silirane su s dodatkom inokulanta (Bio-Sil; $3x10^5$ CFU/g), dodatkom mliječne kiseline (linearni porast 5 – 15 g/kg ST) i bez dodataka (kontrola) u periodu od godine dana. Silaže su imale optimalne fermentacijske karakteristike tijekom godine dana siliranja. Suha tvar (ST) silaža brojčano se minimalno mijenjala tijekom siliranja 69,11 – 71,04% i nije se razlikovala između tretmana i hibrida. Sadržaj mliječne kiseline signifikantno je rastao do 182. dana stajanja silaža (1,01 – 15,38 g/kg ST), iza čega je opadao do zadnjeg uzorkovanja (9,10 g/kg ST). Nije utvrđena razlika između silaža pojedinih hibrida u sadržaju mliječne kiseline. Skoro dvostruko viši sadržaj mliječne kiseline imale su silaže s inokulantom, manje s mliječnom kiselinom i najmanje silaže bez dodataka. Titracijska kiselost rasla je tijekom stajanja silaža (0,02 – 0,74 meq/g ST) s najvišim vrijednostima u silažama s dodatkom inokulanta. Vrijednost pH bilježila je očekivan signifikantan pad tijekom siliranja (6,45 – 4,18), s najnižim vrijednostima u silažama s inokulantom i sukladno porastu mliječne kiseline te titracijske kiselosti u silažama s dodatkom inokulanta. Tijekom godine dana stajanja silaža rastao je i sadržaj produkata proteolize: topljivi protein (17,9 – 47,0% SP) te amonijak (0,38 – 3,73% SP). Silaže hibrida Bc 513 pc imale su viši sadržaj sirovog proteina i ukupnih zeina od silaža ostalih dvaju hibrida u svim vremenskim točkama. Na kraju siliranja zabilježena je redukcija količine 16 kDa i 27 kDa *γ*-zeina, što ukazuje na to da siliranje uzrokuje razgradnju ovih proteina. U svim silažama na kraju siliranja nije detektiran 27 kDa *γ*-zein. S druge strane razgradnja 16 kDa *γ*-zeina bila je različita u silažama ispitivanih hibrida siliranim s različitim dodacima. Dodatak inokulanta imao je veći utjecaj na razgradnju *γ*-zeina silaža tvrđih hibrida (Bc 513 pc i Bc 462), a dodatak mliječne kiseline na silaže mekšeg hibrida (Bc 344). Silaže s dodacima imale su veću razgradnju 16 kDa *γ*-zeina od kontrolnih silaža kod svih ispitivanih hibrida. Na kraju siliranja zabilježen je signifikantan porast buražne razgradivosti suhe tvari (od 0,59 na početku do 0,77 na kraju) i škroba (od 0,53 do 0,78), što je potvrda da siliranje (i razgradnja *γ*-zeina) povisuju razgradnju škroba i suhe tvari. Istraživanjem je potvrđena hipoteza o većoj razgradnji 16 kDa i 27 kDa *γ*-zeina u starijim silažama te hibridima tvrđeg, nego mekšeg endosperma te u silažama s dodacima, nego bez dodataka. Dodatno, istraživanje ukazuje da uz slične vrijednosti razgradivosti suhe tvari i škroba na kraju siliranja, kao i hibridi mekšeg zrna, hibridi tvrđeg zrna (Bc 462) imaju bolje proizvodne karakteristike.

Ključne riječi: *γ*-zeini, inokulant, mliječna kiselina, razgradivost silaža, konzervacijske karakteristike silaža

Influence of corn hybrids and type of silage additives on total and γ- zein content during the high moisture corn silage production

Silage production is a conservation method used for high moisture crop preservation. It is based on natural fermentation that is under control of epiphytic microflora, optimally-mostly by lactic acid bacteria (McDonald et al., 1991). Protein fractions are important indicators of silage quality (Der Bedrosian et al., 2012; Ferraretto et al., 2014). In particular, corn silage soluble crude protein (sCP) fraction and ammonium (NH_3) content are positively associated with proteolysis (Winters et al., 2000; Johnson et al., 2002; Slottnerr and Bertilsson, 2006; Ferraretto et al., 2014) and correlate positively with ruminal in vitro starch digestibility (Ferraretto et al., 2015b). Zein proteins, the most abundant protein fraction in corn grain, surround starch granules and their hydrophobic nature acts as a barrier to starch digestion by rumen microbes (Giuberti et al., 2014). Besides their influence on starch digestibility, zeins also appear to influence the texture and hardness of the grain (Holding and Larkins, 2009). Below et al. (2004) reported that total zein content of corn grain depends primarily on genotypic factors; with environmental factors such as N supply or plant maturity at harvest both causing smaller or larger phenotypic variations.

In the corn endosperm zein proteins are located within protein aggregates called protein bodies and are comprised of four distinctive zein classes: alpha (*α*), beta (*β*), delta (*δ*) and gamma (*γ*) zein. Location of distinctive zein class differs within protein bodies. Gamma zein is thought to be the most important zein fraction. This zein class is located on the surface of protein bodies and in small spots within where they together with beta zein stabilize alpha zein core. Gamma zeins are comprised from three distinctive proteins: 16-kDa gamma zein, 27-kDa gamma zein and 50-kDa gamma zein (Woo et al., 2001; Holding and Larkins, 2006; Boston and Larkins, 2009; Holding and Larkins, 2009).

In silage production, lactic acid bacteria (LAB) additives are widely used to optimize fermentation and thereby maximize lactic acid production, quickly reduce pH, and preserve nutrients (McDonald et al., 1991). Lactic acid production during ensiling of forages is well established (McDonald et al., 1991); this most abundant and the strongest acid in silages dissolves zein proteins, leading to a reduction in grain total zein content (Lawton, 2002). In addition to lactic acid, enzymes from plants or microorganisms degrade zein proteins (McDonald et al., 1991; Lawton, 2002; Hoffman et al., 2011).

The purpose of the present study was to investigate the additive effect of lactic acid bacteria and lactic acid application on the gamma zeins content, total zein content and grain rumen degradability during high moisture corn fermentation process of corn hybrids that differ in endosperm texture and total zein content. In commercial production ensiling is conducted on yearly basis e.g. between two corn harvests. Main silage conservation characteristics where monitored at different time points during one year ensiling period. The gamma zein proteome analysis e.g. differences between gamma zeins content in silages were detected using 2-D gel electrophoresis followed by densitometry quantification and MALDI-TOF/TOF protein identification.

Hybrids (Bc 513 pc, Bc 462 and Bc 344) were grown in 2013 under the same production conditions in split-plot experimental fields at the Faculty of Agriculture of the University of Zagreb. Each hybrid was grown in five replicates. Chopped material from each replicate was divided in three parts. Silages where ensiled at the black layer stage of growth (67.61% – 72.42% DM) in laboratory scale bag silos with one part ensiled with Bio-Sil LAB inoculant (*Lactobacillus plantarum* DSM 8862 and DSM 8866) in a concentration $3x10^5$ CFU/g of fresh material, second one was left untreated while the third was treated with lactic acid (linear application 5 – 15 g/kg DM). Silages were maintained at 25 ± 2 °C and sampled at the beginning and on 15^{th}, 48^{th}, 98^{th}, 182^{nd}, 274^{th} and 364^{th} day of ensiling. Silage conservation characteristics (DM, lactic acid (LA), titratable acidity (TA), pH, crude protein (CP), sCP, NH_3, total zein) where monitored. At the beginning and the end of ensiling period gamma zein content and silage ruminal degradability was evaluated. At the end of ensiling total bacterial count, lactic acid and yeast count was determined. At the

beginning of ensiling the corn grain hardness was evaluated in green material of hybrid tested with Stenvert hardness test and true density. Effects of time, silage additive and hybrid genotype together with their interactions on silages were tested as a split-plot design using the PROC MIXED procedure in SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Means with different superscript letter groups were obtained with postfitting statistical PROC PLM. The differences of green material endosperm texture and microbial count were performed separately as a split-plot completely randomized design and differences between means were assessed for significance using the Tukey test. The correlation parameters where determined using PROC CORR and linear regression between the dry matter and starch degradability rate with PROC REG in SAS 9.4. Differences and interactions were considered significant when $P < 0.05$.

Grain hardness is important corn characteristic that plays a role in the final product quality and nutritional value of corn. It is highly connected with the ratio of horny and floury endosperm in corn grain and with total zein content (Dombrink-Kurtzman and Bietz, 1993; Pratt et al., 1995). Stenvert hardnes test parameters (time of grinding, volume of grinded sample and coarse to fine particle ratio, W_t C/F) showed the highest hardness in Bc 513 pc and lowest in Bc 344. Hybrids differed significantly in time of grinding and W_t C/F. Bc 513 pc had longer time of grinding (3.94 sec) in contrast with Bc 344 (3.50 sec) and Bc 462 (3.75 sec) and higher W_t C/F than other two hybrids (Bc 513 pc: 1.96; Bc 344: 1.46; Bc 462: 1.48). True density analysis showed similar results to Stenvert hardness test; Bc 513 pc had highest values (1.36 g/ml) in contrast to Bc 344 (1.26 g/ml) and Bc 462 (1.31 g/ml) ($P < 0.001$). Harder corn grains have higher true density than soft corn grain (Wu, 1992; Radosavljević et al., 2000). Results proved the highest hardness in Bc 513 pc and lowest in Bc 344. Bc 462 is more similar to Bc 513 pc (corn type popcorn) than Bc 344, and is regarded as somewhat harder corn than Bc 344. The total zein content was in accordance with observed differences in hardness between hybrids tested, Bc 513 pc had highest total zein content (59.96 % CP) and Bc 344 lowest (48.75 % CP) total zein content (Bc 462: 55.13 % CP) ($P < 0.001$).

The silage fermentation profiles obtained with these 3 hybrids are in accordance with other high moisture corn silages ensiled at the black layer (Ferraretto et al., 2014). Dry matter value showed significant but numerically low change during ensiling (69.11 – 71.04 %). The hybrid tested had no influence on lactic acid content, pH value or titratable acidity in silages. However, the use of inoculant was associated with higher lactic acid content (12.63 g/kg DM; $P < 0.001$), faster pH reduction (6.45 – 4.03; $P < 0.001$) and higher titratable acidity (0.57 meq/g DM; $P < 0.05$) in tested silages, consistent with the ability of LAB to promote fermentation. Application of lactic acid resulted with similar trend in silages (lactic acid, LA: 8.55 g/kg DM; control, LA: 7.14 g/kg DM; lactic acid, pH: 6.45 – 4.17; control, pH: 6.45 – 4.35; lactic acid, TK: 0.51 meq/g DM; control, TK: 0.51 meq/g DM). Both types of silage additives used in this study improved silage fermentation characteristics when compared to control silages. In all silages regardless of the hybrid or additive tested increase in lactic acid content to 182^{nd} day of ensiling was observed (1.01 – 15.89 g/kg DM; $P < 0.001$), after which small reduction in LA content up to 364^{th} day was observed (274^{th}: 11.60 g/kg DM; 364^{th}: 9.10 g/kg DM). In substrate deficiency, primarily glucose, lactic acid bacteria (including *Lactobacillus plantarum*) metabolize lactic acid to acetic acid (Lindgren, 1990). In the case of negative yeast or clostridia activity, parallel to lactic acid reduction the increase in pH should be observed (McDonald et al., 1991; Weinberg and Muck, 1996). However that was not the case in this study. Crude protein content in silages was significantly different between hybrid tested, with highest values observed in Bc 513 pc and lowest in Bc 344 (Bc 513 pc: 133 g/kg DM; Bc 344: 105.6 g/kg DM; Bc 462: 109.8 g/kg DM) and is in accordance with total zein content observed for hybrids tested, with highest values observed for Bc 513. Although the triple interaction influence (corn hybrid×silage additive×ensiling period) observed for ammonium ($P < 0.001$) and sCP ($P < 0.05$) content in silages implies different hybrid responses to additive application during ensiling, the same trend was observed. The sCP and ammonium content showed increase during ensiling (sCP: 17.9 – 47.0 % CP; ammonium:

0.38 – 3.73 % CP; $P < 0.001$) and are evidence of proteolysis in silages (Winters et al., 2000; Johnson et al., 2002; Slottnerr and Bertilsson, 2006).

Electrophoretic separation and mass spectrometry identification of gamma zein extract of tested silages showed thirteen distinctive spots of zein proteins. Of three gamma zein types, 16-kDa and 27-kDa gamma zeins were detected. 50-kDa gamma zein is expressed usually in undetectable quantities on molecular level (Woo et al., 2001). At the end of ensiling, densitometry of electrophoretically separated proteins showed reduction of both gamma zein proteins. 27-kDa zein was reduced at undetectable level in all silages. Inoculant application resulted with higher degradability of 16-kDa gamma zein proteins in silages of corn hybrids with harder endosperm type. Lactic acid application resulted with higher degradability of 16-kDa gamma zein proteins in softer corn hybrid (Bc 344) silages. In all silages degradation of 16-kDa zein was lowest in control silages regardless of the hybrid used. Other zein detected were alpha zeins, which showed reduction at the end of ensiling. However the reduction was less expressive than in the case of gamma zeins. Gamma zeins are located on the surface of protein bodies and in small spots at the core of protein bodies (Holding and Larkins, 2006) which can explain higher degradability of gamma zeins compared to alpha zeins. Interestingly, increase in total zein content was observed during ensiling regardless of the hybrid tested or additive used and is opposite to proteolytic activity observed in silages (increase in ammonium and sCP contents) and observed reduction in gamma zein and alpha zein. Analytical method used for zein quantification proved to be efficient for defining difference between hybrids tested, but inefficient for defining zein degradation rate during ensiling (Hoffman et al., 2011).

High moisture corn is highly used feed in ruminant and monogastic animals nutrition as it reduces costs of drying during corn grain storage and it allows earlier harvest of corn grain during unfavourable weather. Additionally, high moisture corn silage preparation allows corn utilization from harvest to harvest, during whole year and it has positive effect on corn grain nutritional value. Ensiling boosts ruminal starch degradability (Philippeau et Michalet-Doreau, 1998; Firkins, 2001; Ferraretto et al., 2013). High moisture corn silages had higher starch and dry matter degradation parameters at the end of ensiling when compared with green material (effective degradability of dry matter: from 0.59 to 0.77; effective degradability of starch: from 0.53 to 0.78; $P < 0.001$). All the starch degradation parameters showed improvement at the end of ensiling; Lag phase was shorter (from 7.37 to 5.43 hours; $P < 0.001$), rapidly degradation fraction was higher (from 0.28 to 0.54; $P < 0.001$) as well as the rate of starch degradation (from 0.051 h^{-1} to 0.098 h^{-1}; $P < 0.001$). Similar trend was observed in dry matter degradation. Strong linear regression of rate of dry matter degradation and starch degradation observed by us implies that dry matter degradation is highly related to starch degradation in high moisture corn silages (Philippeau et al., 2000; Correa et al., 2002; Ngonyamo-Majee et al., 2008). Inoculant application had positive effect on degradation of dry matter and starch, but overall this effect was minimal. The hybrid effect on dry matter degradability or starch degradability showed somewhat better parameters for softer corn hybrid (Bc 344) although the difference was minimal compared to harder corn hybrid (Bc 462).

The study confirmed the hypothesis of a greater degradation of 16-kDa *gamma* zein in silages at the end of one year ensiling and in hybrids with harder than softer grain, as well in silages with additives. Inoculant application had more significant influence on harder grain hybrids; and lactic acid on softer hybrid. The greater 16-kDa gamma zein degradation was connected with higher ruminal degradation of starch and dry matter. Results showed that harder hybrid (Bc 462) had similar ruminal degradability as softer hybrid (Bc 344) with the somewhat better fermentation characteristics and better 16-kDa gamma zein degradation thus implying better production characteristics for more vitreous corn.

Key words: gamma zeins, silage, inoculant, lactic acid, ruminal degradability, fermentation characteristics

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja 3

2. PREGLED LITERATURE 4

2.1. Građa i kemijska svojstva zrna kukuruza 4

2.1.1. Klasifikacija kukuruza – tipovi i hibridi 6

2.2. Fizikalne karakteristike zrna kukuruza – tvrdoća zrna 7

2.3. Silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 9

2.3.1. Kvaliteta silaža 11

2.3.2. Utjecaj siliranja na sadržaj zeina 13

2.4. Nutritivna vrijednost silaža – probavljivost silaža 14

2.4.1. Metode određivanja probavljivosti 16

2.5. Skladišni proteini zrna kukuruza – zeini 19

2.5.1. Nomenklatura zeina 20

2.5.2. Sinteza zeina i proteinskih tijela 22

2.6. Proteomika 25

2.6.1. Spektrometrija masa 27

2.6.1.1. Tehnike ionizacije 29

2.6.1.2. Analizatori masa 31

2.6.1.3. Detektori 34

2.6.2. Identifikacija proteina i kvantifikacija 35

2.6.3. *De novo* analiza proteina 38

2.6.4. 2-D elektroforeza 40

2.6.5. Detekcija proteina 42

2.6.6. Izolacija proteina iz gela 44

3. MATERIJALI I METODE RADA 45

3.1. Poljski pokus 45

3.2. Priprema silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 47

3.3. Instrumentacija i kemikalije za analize 48

3.3.1. Popis laboratorijske opreme, instrumentacije i potrošnog materijala 48

2.6.3. Popis kemikalija 50

3.4. Fizikalne analize kukuruza 52

3.5. Kemijske analize kvalitete visoko vlažnog zrna kukuruza 53

3.5.1. Kemijske analize u prosušenom i samljevenom dijelu uzorka 54

3.5.2. Kemijske analize u svježem uzorku silaža 56

3.5.3. Kemijske analize vodenog ekstrakta silaža 56

3.6. Analiza buražne *in vitro* razgradivosti suhe tvari i škroba silaže 57
3.7. Mikrobiološka analiza silaža na kraju siliranja 61
3.8. Statistička analiza 62
3.9. Analiza proteoma *γ*-zeina 63
3.9.1. Ekstrakcija zeina 63
3.9.2. Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu 63
3.9.3. 2-D elektroforeza 64
3.9.4. Snimanje gelova i kvantifikacija proteina na pojedinim željenim lokacijama 67
3.9.5. Spektrometrija masa 68
3.9.5.1. Izolacija proteina iz gela i njihova derivatizacija 68
3.9.5.2. Analiza peptida spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF 70
3.9.5.3. Identifikacija proteina 71
4. REZULTATI 72
4.1. Parametri kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 73
4.1.1. Utjecaj hibrida kukuruza na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 73
4.1.2. Utjecaj dodataka silaži na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 74
4.1.3. Utjecaj perioda siliranja na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 75
4.1.4. Utjecaj interakcije hibrida i perioda siliranja na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 77
4.1.5. Utjecaj interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 84
4.1.6. Utjecaj interakcije hibrida kukuruza i dodataka silaži na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 90
4.1.7. Utjecaj interakcije hibrida kukuruza, dodataka silaži i perioda siliranja na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 94
4.1.8. Korelacije između osnovnih parametara kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 104
4.2. Promjene *γ*-zeina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza 105
4.2.1. Detektirani zeinski proteom u hibridima kukuruza 105
4.2.2. Promjene γ-zeina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja 107
4.2.3. Promjene detektiranih *α*-zeina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja 109
4.3. Razgradivost suhe tvari i škroba u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza nakon godine dana siliranja 112

4.3.1. Utjecaj hibrida, dodataka silaži, perioda siliranja i njihovih interakcija na razgradivost suhe tvari silaža 112
4.3.2. Utjecaj hibrida, dodataka silaži, perioda siliranja i njihovih interakcija na sadržaj i razgradivost škroba silaža 116
4.3.3. Mikrobni parametri silaža nakon 364 dana siliranja 119
4.3.4. Korelacije između parametara razgradivosti suhe tvari i škroba te osnovnih parametara kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 120
4.3.5. Odnos brzina razgradivosti škroba i suhe tvari – linearna regresija 122
5. RASPRAVA 123
5.1. Razlike ispitivanih hibrida − tvrdoća 123
5.2. Kvaliteta silaža visoko vlažnog zrna kukuruza 125
5.3. Detektirane frakcije zeina 130
5.3.1. Razlike u detektiranim zeinima uvjetovane hibridima kukuruza te njihova povezanost s tvrdoćom zrna 132
5.3.2. Razgradnja zeina – siliranje i tretman siliranja 133
5.4. Razgradivost silaža 135
6. ZAKLJUČCI 143
7. POPIS LITERATURE 144
ŽIVOTOPIS 158

KRATICE

a: brzo razgradiva frakcija; **b**: sporo (potencijalno) razgradiva frakcija; **c**: brzina razgradivosti; **C:** krupne čestice; **ER:** efektivna razgradivost; **F:** sitne čestice; **IEF:** izoelektrično fokusiranje; **LC**: tekućinska kromatografija; **MALDI-TOF/TOF**: matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem s tandem analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta iona; **MK**: mliječna kiselina; **MS**: spektrometrija masa; **NH_3**: amonijak; **ST:** suha tvar; **SP**: sirovi protein; **TK**: titracijska kiselost; **TP**: topljivi protein; **W_t C/F**: odnos krupnih i sitnih čestica; **2-DE**: dvodimenzionalna elektroforeza;

TABLICE

Tablica 1. Aminokiselinski udjeli u najzastupljenijim zeinima
Tablica 2. Srednja temperatura zraka i padaline u Maksimiru tijekom vegetacijske sezone ispitivanih hibrida kukuruza 2013. godine.
Tablica 3. Sastav pufera za inkubaciju prilikom određivanja razgradivosti suhe tvari i škroba.
Tablica 4. Dnevni obrok krava.
Tablica 5. Nekompletirani pufer za izoelektrično fokusiranje.
Tablica 6. Kompletirani pufer za izoelektrično fokusiranje.
Tablica 7. Uvjeti za izoelektrično fokusiranje proteina.
Tablica 8. Osnovni pufer za ekvilibraciju.
Tablica 9. Otopina za poliakrilamidni gel.
Tablica 10. Radni pufer.
Tablica 11. Uvjeti za SDS-elektroforezu.
Tablica 12. Parametri rada MALDI-TOF/TOF.
Tablica 13. Parametri tvrdoće zrna ispitivanih hibrida kukuruza.
Tablica 14. Utjecaj hibrida kukuruza na osnovne parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.
Tablica 15. Utjecaj dodataka silaži na osnovne parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.
Tablica 16. Utjecaj perioda siliranja na osnovne parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

Tablica 17. Utvrđene korelacije između osnovnih parametara kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

Tablica 18. Identificirani zeinski proteini s pripadajućim lokacijama na 2-DE gelu (spot).

Tablica 19. Utvrđene razlike između ispitivanih hibrida u specifičnim zeinima detektiranim nakon ekstrakcije i separacije 2-D elektroforezom.

Tablica 20. Utvrđene promjene u sadržaju *γ*-zeina između silaža hibrida Bc 462 s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja.

Tablica 21. Utvrđene promjene u sadržaju *γ*-zeina između silaža hibrida Bc 344 s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja.

Tablica 22. Utvrđene promjene u sadržaju *γ*-zeina između silaža hibrida Bc 513 pc s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja.

Tablica 23. Utvrđene promjene u sadržaju *α*-zeina između silaža hibrida Bc 462 s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja.

Tablica 24. Utvrđene promjene u sadržaju *α*-zeina između silaža hibrida Bc 344 s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja.

Tablica 25. Utvrđene promjene u sadržaju *α*-zeina između silaža hibrida Bc 513 pc s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja.

Tablica 26. Utjecaj hibrida kukuruza na parametre razgradivosti suhe tvari silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

Tablica 27. Utjecaj dodataka silaži na parametre razgradivosti suhe tvari silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

Tablica 28. Utjecaj perioda siliranja na parametre razgradivosti suhe tvari silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

Tablica 29. Utjecaj hibrida kukuruza na sadržaj i parametre razgradivosti škroba silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

Tablica 30. Utjecaj dodataka silaži na sadržaj i parametre razgradivosti škroba silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

Tablica 31. Utjecaj perioda siliranja na sadržaj i parametre razgradivosti škroba silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

Tablica 32. Utjecaj hibrida na mikrobne parametre silaža visoko vlažnog zrna kukuruza nakon godine dana siliranja.

Tablica 33. Utjecaj dodataka silaži na mikrobne parametre silaža visoko vlažnog zrna kukuruza nakon godine dana siliranja.

Tablica 34. Utvrđene korelacije između parametara razgradivosti suhe tvari i osnovnih parametara kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

Tablica 35. Utvrđene korelacije između parametara razgradivosti suhe tvari i osnovnih parametara kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

SLIKE

Slika 1. Skenirajući elektronski mikrograf stanica endosperma u razvijajućem zrnu kukuruza s obilježenim proteinskim tijelima (pt, bijele zrnaste nakupine), škrobnim zrncima (š, kružnog oblika) i staničnom stijenkom (c).

Slika 2. Shematski prikaz razvoja proteinskog tijela u fazama s prikazanim lokacijama pojedinih tipova zeina (gledati s lijeva na desno). Najmanja proteinska tijela sadržavaju samo *γ*-zeine i *β*-zeine. Tijekom daljnjih faza sinteze *α*-zeini i *δ*-zeini penetriraju u agregate *γ*-zeina i *β*-zeina.

Slika 3. Shema prikaza tehnologija u proteomici gdje se pri svakom koraku analize proteina i peptida primjenjuje određena separacijska ili identifikacijska tehnika.

Slika 4. Shema MS instrumenta s osnovnim funkcionalnim dijelovima (izvor ionizacije, analizator i detektor).

Slika 5. Shema MALDI ionizacije.

Slika 6. Prikaz ionizacije ESI-MS u pozitivnom načinu rada.

Slika 7. MALDI-TOF instrument u dvije različite izvedbe (linearna i izvedba s ionskim ogledalom).

Slika 8. Nomenklatura prekursor iona peptidnih fragmenata s najčešćim kvalitativnim strukturama fragmenata.

Slika 9. *De novo* sekvencioniranje triptičkog peptida djelomično obilježenog s ^{18}O na C-terminalnom kraju (y ioni obilježeni): (A) cijeli spektar; (B) detaljno prikazana regija manjih masa s vidljivom razlikom između obilježenih y iona (+ 2 Da pomak izotropnih parova) i neobilježenih b iona

Slika 10. Tri osnovna tipa obilježavanja gelova nakon 2-D elektroforeze, usporedba osjetljivosti metoda. Prikaz gelova za 400 µg mitohondrijskih proteina s homolognim spotovima označenim s strelicama. (A) bojanje koloidalnom *commasie* bojom; (B) bojanje srebrom; (C) bojanje fluorescentnom bojom *Spyro Orange* (detektirano s fluorescentnim laserskim skenerom).

Slika 11. Mlin čekičar tijekom Stenvert-Pomeranzove metode određivanja tvrdoće zrna: (A) cijeli mlin s menzurom za određivanje volumena samljevenih zrna; (B) ukupni volumen samljevenih zrna u menzuri.

Slika 12. Shema pripreme i analize silaža visoko vlažnog zrna kukuruza tri različita hibrida (Bc 462, Bc 344 i Bc 513 pc) siliranih s trima tipovima dodataka [dva dodatka silaži (inokulant i mliječna kiselina) i kontrolne silaže bez dodataka] s obilježenim periodom siliranja (vremenskim točkama uzrkovanja: 0., 15., 48., 98., 182., 274. i 364. dan). U svakoj vremenskoj točki, silaže su uzorkovane u peteroplikatu te su određeni parametri

kvalitete silaža. Crvenom zvjezdicom obilježena su uzorkovanja u kojima su dodatno određeni *γ*-zeini i *α*-zeini te razgradivost silaža.

Slika 13. Uzimanje buražnog sadržaja sondom.

Slika 14. Umetanje IPG trake na gel koji je polimerizirao.

Slika 15. Izrezivanje proteina iz gela.

Slika 16. MALDI-TOF/TOF MS/MS spektar identificiranog peptida triptičkog digesta 16 kDa *γ*-zeina s definiranom masom prekursor iona i slijedom aminokiselina definiranih iz masa konsekutivnih signala.

Slika 17. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na sadržaj suhe tvari u silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u prvoj i drugoj vremenskoj točki između silaža pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 18. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na sadržaj mliječne kiseline u silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,01$) te sa značajnom razlikom u trećoj, četvrtoj i sedmoj vremenskoj točki između silaža pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 19. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na titracijsku kiselost u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,01$) te sa značajnom razlikom u drugoj, šestoj i sedmoj vremenskoj točki između pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 20. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na pH u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u prvoj, drugoj, trećoj i sedmoj vremenskoj točki između pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 21. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na sadržaj sirovog proteina u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,05$) te sa značajnom razlikom u svim vremenskim točkama između pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 22. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na udio topljivog proteina u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,01$) te sa značajnom razlikom u svim vremenskim točkama između pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 23. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na udio amonijaka u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u prvoj, drugoj, trećoj i petoj vremenskoj točki između pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 24. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na udio zeina u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u svim vremenskim točkama između pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 25. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na sadržaj suhe tvari u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,05$) te sa značajnom razlikom u točki tri, pet i sedam između suhe tvari pojedinih dodataka ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 26. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na sadržaj mliječne kiseline u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u sadržaju mliječne kiseline u pojedinim tretmanima (s različitim silažnim dodacima) u svim vremenskim točkama osim u prvoj točki ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 27. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na titracijsku kiselost u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u titracijskoj kiselosti u pojedinim tretmanima (s različitim silažnim dodacima) u prvoj, drugoj i četvrtoj točki ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 28. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na pH u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u pH u pojedinim tretmanima (s različitim silažnim dodacima) u svim točkama osim u prvoj točki ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 29. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na udio topljivog proteina u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u udjelu topljivog proteina u pojedinim tretmanima (s različitim silažnim dodacima) u svim točkama osim u prvoj točki ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 30. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na udio amonijaka u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u udjelu amonijaka u pojedinim tretmanima (s različitim silažnim dodacima) u svim točkama osim u prvoj točki ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 31. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na udio zeina u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u udjelu zeina u pojedinim tretmanima (s različitim silažnim dodacima) u svim točkama osim u prvoj točki ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 32. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i dodataka silaži na sadržaj mliječne kiseline u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,05$) te s naznačenom razlikom u sadržaju mliječne kiseline u pojedinim tipovima silažnih dodataka ili hibridima ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 33. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i dodataka silaži na pH u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te s naznačenom razlikom u pH u pojedinim tipovima silažnih dodataka ili hibridima ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 34. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i dodataka silaži na udio amonijaka u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,01$) te s

naznačenom razlikom u udjelu amonijaka u pojedinim tipovima silažnih dodataka ili hibridima ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 35. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i dodataka silaži na udio zeina u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,01$) te s naznačenom razlikom u udjelu amonijaka u pojedinim tipovima silažnih dodataka ili hibridima ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 36. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza, dodataka silaži i perioda siliranja na sadržaj mliječne kiseline (MK) u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te s naznačenim razlikama u sadržaju mliječne kiseline ovisno o tipu silažnih dodataka ili hibrida u pojedinim vremenskim točkama ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 37. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza, dodataka silaži i perioda siliranja na titracijsku kiselost (TK) u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te s naznačenim razlikama u titracijskoj kiselosti ovisno o tipu silažnih dodataka ili hibrida u pojedinim vremenskim točkama ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 38. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza, dodataka silaži i perioda siliranja na udio topljivih proteina u sirovom proteinu (TP) u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,05$) te s naznačenim razlikama u TP ovisno o tipu silažnih dodataka ili hibrida u pojedinim vremenskim točkama ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 39. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza, dodataka silaži i perioda siliranja na udio amonijaka u sirovom proteinu (NH_3) u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te s naznačenim razlikama u NH_3 ovisno o tipu silažnih dodataka ili hibrida u pojedinim vremenskim točkama ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 40. Prikaz lokacija izrezanih proteinskih zatamnjenja (spotova) u kojima su detektirani zeini na kontrolnom 2-DE gelu (Bc 462) – prikazan je samo dio 2-DE gela sa zeinima.

Slika 41. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na efektivnu razgradivost suhe tvari u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,05$) te s naznačenim razlikama u efektivnoj razgradivosti suhe tvari između silaža hibrida u pojedinim vremenskim točkama ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 42. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na brzinu razgradivosti suhe tvari u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te s naznačenom razlikom u brzini razgradivosti suhe tvari između silaža hibrida Bc 462 i silaža ostalih dvaju hibrida u 364. danu ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 43. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na brzinu razgradivosti suhe tvari u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te s naznačenim razlikama u brzini razgradivosti suhe tvari između silaža s dodatkom inokulanta i mliječne kiseline u 364. danu ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 44. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na brzinu razgradivosti škroba u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,05$) te s naznačenim razlikama u brzini razgradivosti škroba između silaža s dodatkom inokulanta i silaža ostalih dvaju tretmana u 364. danu ($P < 0,05$; označeno s *).

Slika 45. Odnos brzina razgradivosti škroba i suhe tvari [jednadžba regresije: y = 0,592 (± 0,043) + 0,026 (± 0,003), n = 66, RMSE = 0,01, R^2 = 0,75, $P < 0.001$].

1. UVOD

Kukuruz je najčešće korištena žitarica za siliranje (McDonald i sur., 1991) i smatra se najboljim izvorom energije za mikrobe buraga i krave među žitaricama. Siliranje zrna kukuruza s višom vlagom je način da se od berbe do berbe očuva zrno kukuruza i koristi u hranidbi mliječnih krava i goveda, svinja pa čak i peradi (Fellner i sur., 2001; Svečnjak i sur., 2007; Hoffman i sur., 2011; Diaz i sur., 2013). Dodatno smatra se da je siliranje kukuruza relativno jednostavna i jeftinija metoda od sušenja, a dodatno poboljšava nutritivnu vrijednosti kukuruza (Yousif i Tinay, 2000).

Poboljšanje nutritivne vrijednosti kukuruza proizlazi iz pretpostavke da tijekom stajanja silaže kukuruza dolazi do razgradnje proteina zeina i porasta probavljivosti škroba u buragu (Philippeau i Michalet-Doreau, 1998). Naime zeini izgrađuju proteinsko-škrobnu matricu unutar endosperma zrna kukuruza (Lawton i Wilson, 2003) koja zbog puno sporije razgradnje ograničava probavu škroba u buragu (Philippeau i Michalet-Doreau, 1998; Correa i sur., 2002). Razgradnja zeina tako omogućava bolji pristup mikrobima buraga i enzimima granulama škroba. U hranidbi mliječnih krava glavni izvor energije je škrob (Lopes i sur., 2009). Manipuliranjem karakteristikama škroba, kojim on postaje više ili manje dostupan fermentaciji u buragu, bitno se utječe na proizvodnju mlijeka i mesa te zdravlje životinja. Odstajala silaža visoko vlažnog zrna kukuruza u usporedbi sa suhim zrnom ima višu i bržu probavljivost škroba u buragu pa junad brže raste, a krave daju jednako ili više mlijeka. No istovremeno je moguća pojava acidoza i s njome povezanih poremećaja (San Ementario i sur., 2000; Wu i sur., 2001).

Mehanizam razgradnje zeina, kompleksnih proteina koji se sastoje od četiri definirane skupine proteina [alfa (α), beta (β), gama (γ) i delta (δ) zeina], tijekom siliranja nije još potpuno razjašnjen. Hoffman i suradnici (2011) uveli su pretpostavku da su za razgradnju proteinskih tijela i disocijaciju granula škroba najvažniji γ-zeini. No način na koji siliranje utječe na pojedine γ-zeine još nije istražen. Naime skupina γ-zeina sastoji se od tri različita tipa proteina: 16 kDa, 27 kDa i 50 kDa γ-zeina.

Uporaba različitih dodataka silaži i hibrida kukuruza prilikom siliranja ima za cilj optimalnom fermentacijom očuvati hranjivost i održivost silirane mase (Prigge i sur., 1976; McDonald i sur., 1991; Dawson i sur., 1998; Taylor i Kung, 2002; Hoffman i sur., 2011; Kung i sur., 2014). Osim toga siliranje visoko vlažnog zrna u odnosu na sušenje povisuje probavljivost škroba u buragu (Ferraretto i sur., 2013).

Prije ovog istraživanja, nije se pratilo kako jednogodišnje stajanje silaža hibrida različite tvrdoće zrna siliranih inokulantom ili mliječnom kiselinom djeluje na intenzitet fermentacije, kvalitetu silaža, razgradivosti γ-zeina u silaži i škroba u buragu.

Razlike u količini *γ*-zeina u periodu od godine dana stajanja silaža visoko vlažnog zrna kukuruza ispitane su pomoću separacijske tehnike dvodimenzionalne gel elektroforeze (2-DE). Proteini su kvantificirani denzitometrijskom analizom zatamnjenja u 2-DE gelu, a identifikacija separiranih proteina napravljena je pomoću spregnute tehnike spektrometrije masa nakon CAF-/CAF+ derivatizacije (CAF-/CAF+, *engl.* chemically activated fragmentation negative/chemically activated fragmentation positive).

1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

Na temelju pregleda literature formirane su sljedeće hipoteze:

- dodatak inokulanta povećat će proteolitičku i kemijsku razgradnju zeina s naglaskom na 16 kDa i 27 kDa *γ*-zeinima

- dodatak mliječne kiseline povećat će kemijsku razgradnju zeina s naglaskom na 16 kDa i 27 kDa *γ*-zeinima

- očekuje se manja razgradivost zeina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza koje karakterizira viši udio zeina

- razgradnja 16 kDa i 27 kDa *γ*-zeina dovodi do više buražne razgradivost škroba visoko vlažnog zrna kukuruza.

Na temelju postavljenih hipoteza cilj istraživanja je odrediti utjecaj hibrida različitog udjela i profila zeina te konzerviranja (dodavanje mliječne kiseline, spontano siliranje i siliranje s inokulantom) na razgradnju 16 kDa i 27 kDa *γ*-zeina tijekom jednogodišnjeg stajanja silaže i, posljedično, na visinu *in vitro* buražne razgradivosti škroba. Dodatno, odrediti u periodu od godine dana stajanja dinamiku pokazatelja kvalitete siliranja (suha tvar, mliječna kiselina, titracijska kiselost, pH, sirovi protein, udio topljivog proteina, udio amonijaka te zeina) koji indirektno ukazuju i na promjene proteolitičke aktivnosti tijekom siliranja silaže visoko vlažnog zrna kukuruza.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Građa i kemijska svojstva zrna kukuruza

Kukuruz (*Zea mays* L.) žitarica je od iznimne važnosti za prehranu ljudi i hranidbu životinja (Holding i Larkins, 2006) s ukupnom svjetskom proizvodnjom od 1 021 616 583,00 tona u 2014. godini (Faostat, 2016). Jednogodišnja je biljka iz porodice trava (*Gramineae*) koja podrijetlo vuče iz Srednje Amerike, točnije iz Gvatemale i Meksika, a u Europi je kultivirana nakon otkrića Novog svijeta krajem 15. stoljeća. U našim krajevima kukuruz se počeo uzgajati sredinom 16. stoljeća, ali se ne zna je li na ove prostore proširen preko Italije ili Turske (Gotlin, 1967). U Republici Hrvatskoj kukuruz se uzgaja na 252 567,00 hektara s proizvodnjom od 2 046 966,00 tona u 2014. godini te je prva žitarica po zasijanoj površini (Državni zavod za statistiku, 2015). Većina kukuruza uzgaja se za proizvodnju stočne hrane, bilo kao suho zrno, bilo kao silaža na koju otpada 1 015 614,00 tona u 2014. godini (Državni zavod za statistiku, 2015).

Proizvodnja zrna kukuruza za stočnu hranu proizlazi iz njegovih izvrsnih nutritivnih karakteristika. U prosjeku zrno kukuruza u usporedbi s ostalim žitaricama sadrži u najvećoj mjeri škrob (64,1% ST) i u znatno manjoj mjeri proteine (8,1% ST) lošeg aminokiselinskog sastava. Dodatno, zrno sadržava i dosta sirove masti (3,7% ST), malo sirovih vlakana (2,2% ST), šećera (1,6% ST), sirovi pepeo (1,3% ST), minerale, pigmente i ostale nutritivno vrijedne tvari. Kukuruz je jedna od energijom najbogatijih žitarica kojom se mogu hraniti sve vrste i kategorije domaćih životinja. Škorb daje 82% energije zrna kukuruza pa njegova svojstva bitno određuju visinu i brzinu opskrbe životinja glukozom (Kotarski i sur., 1992; Grbeša, 2004; Singh i sur., 2010).

Škrob se sastoji od linearnog i većeg razgranatog polimera: amiloze i amilopektina. Molekule D-glukoze u amilozi povezane su α-1,4-glikozidnom vezom, dok su u amilopektinu molekule D-glukoze povezane α-1,4-glikozidnom vezom u linearnom dijelu i α-1,6-glikozidnom vezom na mjestu granjanja molekule (bočni lanci). Udio amilopektina i amiloze varira ovisno o tipu kukuruza. Za razliku od celuloze (β-glikozidne veze), enzimi tankog crijeva životinje (i čovjeka) mogu razgraditi α-1,4-glikozidnu vezu škroba. Zato se škrob koji nije probavljen u buragu može dalje razgraditi unutar tankog crijeva (McAllister i Cheng, 1996). Molekule škroba u zrnu kukuruza lokalizirane su unutar stanica endosperma u obliku polukristaliziranih granula različitih oblika (u obliku leće, poliedara ili

sferične) i veličina (od 1 do 38 μm), ovisno o svojoj lokalizaciji unutar endosperma (Kotarski i sur., 1992).

Udio sirovog proteina u kukuruzu varira između 6 i 12% suhe tvari zrna. Ovisno o topljivosti u otapalima, definirana su četiri osnovna tipa proteina u zrnu kukuruza: albumini – topivi u vodi, globulini – topljivi u otopinama soli, glutelini – topljivi u bazičnim otapalima i zeini – topljivi u alkoholima (Shukla i Cheryan, 2001). Svaki od četiri tipa proteina nalazi se u specifičnim dijelovima zrna. Zeini se većinom nalaze u endospermu, glutelini na prijelazu endosperma u klicu, a albumini i globulini se većinom nalaze u klici. U endospermu se nalazi oko 75% ukupnog proteina zrna kukuruza, dok je ostatak raspodjeljen između ostalih dijelova zrna. Hibrid, stadij zrelosti zrna, gnojidba dušikom i vremenske prilike tijekom sazrijevanja određuju udio sirovog proteina, zeina i tvrdoću zrna (Blumenthal i sur., 2008; Holding i Larkins, 2009). Općenito, protein kukuruza karakterizira loš aminokiselinski sastav zbog niskog udjela esencijalnih aminokiselina lizina (Lys) i triptofana (Trp), što smanjuje nutritivnu vrijednost kukuruza (Kriz, 2009).

Zrno kukuruza sastoji se od tri glavne regije: klice, endosperma i vanjskih dijelova (perikarpa i aleurona). Perikarp (engl. *pericarp*) je gornji dio zrna koji štiti ostatak zrna od oštećenja (McAllister i Cheng, 1996). On se sastoji od 10 do 12 slojeva stanica u kojima se nalaze pigmenti koji daju boju perikarpu i zrnu kukuruza. Prosječni udio perikarapa u zrnu kukuruza je 5% i sastoji se isključivo (90%) od vlakana (Gotlin, 1967).

Klica (engl. *germ*) sadržava embrij sa *scutellom*. *Scutella* je primarni listić koji se nikada prilikom germinacije ne razvije u list, već služi kao zaštitna membrana koja dijeli klicu od okolnog endosperma. U suhoj masi zrna klica čini 10 do 12% mase. Klica je bogata uljem, proteinom, šećerom i pepelom. U klici se nalazi od 81 do 85% ulja, od 72 do 83% minerala, od 61 do 75% šećera i od 18 do 28% proteina zrna kukuruza (Li i sur., 1996; White i Johnson, 2003). Globulini (GLB) su najzastupljeniji proteini u klici. Karakterizira ih dobra topljivost u otopinama soli, dok su u vodi netopivi. Definirana su dva osnovna tipa globulina, GLB 1 i GLB 2, koji pokazuju niski nivo sličnosti u sekvencijama te u molekulskim masama, 63 kDa i 45 kDa. Oba tipa proteina primarno služe kao izvor dušika tijekom germinacije (Holding i Larkins, 2009).

Endosperm čini najveći dio zrna: u suhoj masi zrna ima ga od 80 do 85%. Endosperm zrna žitarica može se još podijeliti na manje strukture, ako se gleda od klice prema perikarpu dijeli se na: najudaljeniji dio ili aleuronski sloj, periferni dio ili subaleuronski sloj te na caklavi i brašnasti endosperm. Vanjski dio endosperma najčešće je caklav, a dio endosperma bliže klici je brašnast. Endosperm kukuruza većinom se sastoji od škroba, od 86 do 89% (Li i sur., 1996). Stanice endosperma osim škroba sadržavaju proteine i lipide. Membrane stanica i stanične stijenke stanica sastoje se od polisaharida (β-glukana i arabinoksilana), proteina i fenolnih kiselina. Jedini dijelovi

endosperma bez škroba su stanice u aleuronskom dijelu koje sadržavaju autolitičke enzime, inhibitore amilaza i proteaza, vodotopive vitamine, minerale i specifična tijela koja sadržavaju proteine i lipide (Kotarski i sur., 1992). Granule škroba u subaleuronskom sloju i caklavom endospermu su okružene proteinskim tijelima s kojima izgrađuju takozvanu proteinsko-škrobnu matricu koju u ovom dijelu endosperma karakterizira deblji i kompaktniji proteinski dio. U proteinsko-škrobnoj matrici nalaze se još i neškrobni ugljikohidrati, koje zajedno s proteinima karakterizira loša topivost u vodi i visoka otpornost prema hidrolitičkim enzimima (Kotarski i sur., 1992). Brašnasti endosperm karakteriziraju puno veće, sferične granule škroba s puno tanjim proteinskim slojem i slabo razvijenom matricom. U ovom dijelu endosperma granule škroba su dostupnije djelovanju hidrolitičkih enzima. Endosperm često ima praznine, primarno brašnasti endosperm, što ga čini strukturalno slabijom strukturom zrna (Duvick, 1961). Udio caklavog i brašnastog endosperma varira između različitih linija kukuruza te je primarni faktor koji određuje tvrdoću zrna.

2.1.1. Klasifikacija kukuruza – tipovi i hibridi

Kukuruz je najviše genetski varijabilna kultivirana biljka na svijetu. Glavne podjele različitih tipova kukuruza temeljene su na obliku, građi te kemijskom sastavu zrna (prema Gotlin i sur.):

- zubane (*Zea mays* L. *indendata Sturt*),
- tvrdunce (*Zea mays* L. *indurata Sturt),*
- šećerac (*Zea mays* L. *saccharata Sturt),*
- kokičar (*Zea mays* L. *everta Sturt),*
- mekunac (*Zea mays* L. *amylacea Sturt),*
- voštanac (*Zea mays* L. *ceratina Sturt),*
- pljevičar (*Zea mays* L. *tunicata Sturt),*
- poluzuban (*Zea mays* L. *semidendata Sturt*),
- škrobni šećerac (*Zea mays* L. *amylosaccharata Sturt*).

U proizvodnji hrane za životinje najčešće se koriste zubani i tvrdunci. Današnji rašireni europski hibridi nastali su križanjem europskih tvrdunaca i američkih zubana (Tenaillon i Charcosset, 2011). Dva hibrida kukuruza koja su ispitana u ovom istraživanju su polutvrdunac (Bc 462) i kvalitetni zuban (Bc 344). Treći hibrid kukuruza koji je isto tako ispitan u istraživanju, kokičar (Bc 513 pc), češće se koristi u ljudskoj prehrani. Bc 513 pc je uključen u istraživanje zbog svog visokog sadržaja zeina.

Zubane odlikuje zrno u obliku konjskog zuba. Oblik može biti više ili manje izražen ovisno o veličini udubljenja na vrhu zrna. Udubljenje nastaje kao posljedica nejednolikog gubitka vode iz brašnastog i caklavog endosperma tijekom sazrijevanja zrna. Caklavi endosperm najčešće zauzima bočne dijelove zrna, dok je čitav centralni i vršni dio endosperma brašnastog tipa. Ovaj tip kukuruza ima najveći sadržaj škroba s nešto slabijom fizikalnom kvalitetom zrna (nižom tvrdoćom) te se često koristi u hranidbi životinja (Gotlin, 1967; Krička, 2012).

Tvrdunci imaju tvrda, okruglo-ovalna i sjajna zrna s većim udjelom caklavog endosperma u zrnima. Brašnasti endosperm nalazi se samo u centralnim dijelovima zrna. Ovaj tip kukuruza ima zrna boljih fizikalnih karakteristika koja sadrže veći udio sirovih proteina te se više koristi u prehrani ljudi (Gotlin, 1967).

Kokičar ima zrna izrazite tvrdoće u kojima je endosperm gotovo potpuno izgrađen od caklavog endosperma, osim malog dijela oko klice koji se sastoji od brašnastog endosperma. Ovaj tip kukuruza ima dva definirana oblika zrna: jedan mala, okrugla biserasta zrna te drugi s izduženim zrnima rižastog oblika. Ovaj tip kukuruza koristi se i u prehrani ljudi i u hranidbi životinja (Gotlin, 1967; Krička i sur., 2012).

2.2. Fizikalne karakteristike zrna kukuruza – tvrdoća zrna

Tvrdoća zrna važan je parametar u kvaliteti zrna kukuruza, prema nekim autorima najvažnija agronomska osobina kukuruza (Wu i sur., 2010). Često se definira i kao caklavost zrna, ili omjer caklavog (tvrdog; engl. *hourny, vitreous*) i brašnastog (mekog; engl. *floury, soft*) endosperma zrna kukuruza (Paulsen i sur., 2003), što nije u potpunosti razjašnjeno. U pravilu caklavost i pokazatelji tvrdoće zrna kukuruza pokazuju visoku pozitivnu međusobnu povezanost, što ukazuje na to da je veća tvrdoća zrna rezultat veće caklavosti zrna (Kljak i sur., 2011), ali hibridi kukuruza veće caklavosti ne moraju uvijek imati i visoku tvrdoću.

Direktno određivanje caklavosti zrna, kao što je disekcija zrna, je vremenski zahtjevno te neprikladno u analizama velikog broja uzoraka. Danas se koriste različite indirektne metode koje pokazuju visoku korelaciju s tvrdoćom, kao što su: određivanje prave gustoće zrna (npr. piknometrom), hektolitarska masa, flotacijski indeks, indeks veličine čestica, Stenvert-ova metoda određivanja tvrdoće, NIR spektroskopija (engl. *near infrared spectroscopy*) itd. (Pratt i sur., 1995). Vlaga zrna ima značajan, obrnuto proporcionalan utjecaj na tvrdoću (Lawton i Faubion, 1989). Prilikom određivanja tvrdoće

uzoraka zrna sa sličnim vrijednostima vlage utjecaj vlage na rezultat tvrdoće postaje zanemariv (Li i sur., 1996).

Indeks veličine čestica (engl. *Particle Size Index*, PSI) samljevenih zrnja kukuruza česta je metoda u analizama tvrdoće zrna kukuruza. Sastoji se od dva osnovna koraka: u prvom se zrna kukuruza melju mlinom, a u drugom se samljevena masa frakcionira uz upotrebu sita određenih veličina pora. Sama metoda ima različite izvedbe ovisno o: tipu mlina koji se koristi (npr. mlin čekičar ili mlinovi s diskovima), porama na situ mlina (< 1 mm, 1 mm, 2 mm ili veće pore) te veličinama pora na sitima i broju sita koji se koriste za frakcioniranje samljevene mase. Prednost ove metode proizlazi iz upotrebe više sita pomoću kojih se, osim što se može odrediti srednja geometrijska veličina čestica, određuje i varijabilnost frakcija čestica samljevenih zrna. Dodatno je moguće izračunati omjer krupnih i sitnih čestica čija vrijednost raste s porastom tvrdoće zrna (Pomeranz i sur., 1985; Fox i Manley, 2009).

Tvrdoća zrna kukuruza može se procijeniti iz gustoće zrna (Fox i Manley, 2009). Metoda za određivanje gustoće zrna, takozvana prava gustoća, uključuje upotrebu piknometra. Gustoća zrna određuje se usporedbom masa određenog volumena otopine ili zraka sa i bez zrna u njoj. Zrna s većom gustoćom se smatraju tvrđima (Fox i Manley, 2009). Wu (1992) je ispitivao gustoću zrna četrnaest različitih hibrida kukuruza te je ustanovio porast u gustoći od 1,1839 g/mL do 1,3523 g/mL kako je rasla tvrdoća zrna. Meka zrna su imala najnižu gustoću, a tvrda zrna su imala najveće vrijednosti gustoće.

Stenvertova analiza zrna kukuruza česta je i visoko učinkovita analiza za definiranje tvrdoće zrna kukuruza (Li i sur., 1996). U Stenvertovoj analizi tvrdoće definiraju se tri osnovna parametra: vrijeme mljevenja zrna, ukupni volumen samljevenog zrna i maseni ili volumni omjer krupnih i sitnih čestica (Pomeranz i sur., 1985). Stenvertovo vrijeme mljevenja pokazatelj je otpora zrna prema mljevenju te raste s tvrdoćom zrna. Ukupni volumen od 20 g samljevenog zrna govori o indeksu zbijenosti (pakiranja) zrna koji raste s padom tvrdoće zrna. Treći parametar Stenvertove analize tvrdoće zrna izražen je kroz odnos masa krupnih čestica i sitnih čestica. Krupne čestice (C) su čestice promjera većeg od 0,7 i manjeg od 2 mm. Sitne čestice (F) su čestice promjera manjeg od 0,5 mm. Odnos masa krupnih i sitnih čestica raste s tvrdoćom zrna te se označava s Wt C/F (Pomeranz i sur., 1985). Blandino i sur. (2010) su u svom radu s trinaest različitih hibrida kukuruza uzgojenih na pet različitih lokacija ustanovili visoku korelaciju između Stenvertova vremena mljevenja i odnosa tvrdog i mekog endosperma kao i odnosa krupnih i sitnih čestica te odnosa tvrdog i mekog endosperma. Zaključili su da su vrijeme mljevenja i odnosi krupnih i sitnih čestica vrlo dobri pokazatelji tvrdoće zrna kukuruza.

2.3. Silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

Siliranje je metoda konzerviranja žitarica s visokim udjelom vlage uz pomoć bakterija mliječne kiseline koje fermentiraju lako dostupne ugljikohidrate, monomere i dimere heksoza te pentoze do organskih kiselina, u najvećem dijelu mliječne kiseline. Pozitivna posljedica proizvodnje organskih kiselina je snižavanje pH, što za rezultat ima inhibiciju nepoželjnih mikroorganizama i konzerviranje žitarica za kasniju uporabu (McDonald i sur. 1991; Weinberg i Muck 1996; Weinberg, 2003). Priprema siliranja obuhvaća najčešće sjeckanje ili mljevenje zelene mase (ovisno o tipu silaža) koja se zatim sprema u silose ili neki oblik zrakonepropusnog skladišnog prostora (McDonald i sur., 1991).

Siliranje se dijeli na četiri faze: aerobnu fazu, frazu fermentacije, stabilnu fazu i fazu izuzimanja silaža. U aerobnoj fazi nakon zatvaranja silaža kisik je još uvijek prisutan u silažnoj masi, aktivni su biljna respiracija i proteaze, kao i aerobni te fakultativno aerobni mikroorganizmi poput kvasaca, plijesni i enterobakterija. Aerobna faza traje dok se ne potroši kisik u silažnoj masi i u pravilu se pH vrijednost silaže kreće oko 6. U fazi fermentacije uspostavljeni su anaerobni uvjeti u silažnoj masi te bakterije mliječne kiseline postaju dominantni mikroorganizmi. Proizvedene organske kiseline utječu na pad pH u silažama. Pad pH-vrijednosti ovisi o tipu zelene mase koja se silira, kao i o upotrijebljenim silažnim dodacima. Kukuruz se smatra idealnim supstratom za siliranje: ima visok udjel suhe tvari, sadrži optimalnu količinu lako razgradivih ugljikohidrata te nizak puferni kapacitet koji označava sposobnost odupiranju promjeni pH. Što je manji puferni kapacitet, to se zelena masa slabije opire promjeni pH (McDonald i sur., 1991). Faza fermentacije traje od nekoliko dana do nekoliko tjedana, a kraj faze predstavlja uspostavljanje niskog stabilnog pH. Za silaže visoko vlažnog zrna kukuruza to je pH između 4,0 i 4,5 (Prigge i sur., 1976; Hoffman i sur., 2011; Diaz i sur., 2013; Kung i sur., 2014; Ferraretto i sur., 2014). Stabilna faza siliranja je faza u kojoj se pretpostavljaju minimalne promjene u sadržaju i kvaliteti silaža ako su očuvani anaerobni uvijeti (Weinberg i Muck, 1996). U fazi izuzimanja silaža je izložena zraku, čime se potiče aktivnost aerobnih mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje silaža. Silaže koje su sklonije kvarenju su silaže koje sadržavaju više dostupnih ugljikohidrata u čijem su se siliranju koristili dodaci koji su uzrokovali usmjerenu fermentaciju, te silaže s višim udjelom suhe tvari. U taj tip silaža ubraja se i silaža kukuruza: cijele biljke i visoko vlažnog zrna (McDonald i sur 1991; Weinberg i Muck 1996).

Dodaci silaži koriste se s ciljem da se osigura da bakterije mliječne kiseline dominiraju tijekom fermentacije kako bi se zelena masa optimalno konzervirala. Upotreba dodataka počiva na nekoliko osnovnih pretpostavki: dodatak silaži mora biti lagan i siguran za uporabu, mora imati pozitivan efekt na konzerviranje i nutritivnu vrijednost kao i aerobnu stabilnost silaža te istovremeno ne smije biti štetan za životinju i imati negativan efekt na fermentaciju u buragu (McDonald i sur., 1991; Henderson, 1993). Dva su osnovna tipa podjele dodataka silaži: s obzirom na biokemijski tip i s obzirom na funkciju. Ako se gleda biokemijski tip, onda su osnove skupine biološki dodaci i kemijski dodaci. U biološke dodatke ulaze enzimi i bakterijski inokulanti (Weinberg i Muck, 1996). Podjela dodataka s obzirom na funkciju uključuje ove tipove: dodaci koji potiču fermentaciju, dodaci koji inhibiraju fermentaciju, inhibitori aerobne razgradnje, nutrijenti i adsorbensi (McDonald i sur., 1991).

Bakterijski inokulanti počeli su se upotrebljavati za siliranje već početkom dvadesetog stoljeća u Francuskoj (McDonald i sur., 1991). Inokulanti bakterija mliječne kiseline najkorišteniji su tip dodataka silaži, ne samo zbog sigurnosti i jednostavnosti rukovanja, nego i zbog izvrsnih proizvodnih karakteristika (McDonald i sur., 1991; Henderson, 1993; Weinberg i Muck, 1996). Kriterije koje bakterijska kultura ili mješavina istih mora zadovoljiti da bi bila svrstana u inokulante su: kratko generacijsko vrijeme prilikom rasta na silaži, kompetitivnost u odnosu na epifitne mikroorganizme biljke, intenzivna proizvodnja mliječne kiseline i brz pad pH (poželjniji su homofermentativni sojevi od heterofermentativnih), adaptacija na kiselost u silaži, rast na materijalima s visokim udjelom suhe tvari te rast pri temperaturama oko 50 °C (Whittenbury, 1961. a citirano u McDonald i sur., 1991). Dodatno je u klasifikaciju pridodana i poželjna smanjena proteolitička aktivnost. Što je brži pad pH, to je više smanjena proteoliza (Henderson, 1993). Sojevi rodova *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Pediococcoccus* najčešće su korišteni inokulanti (Hill, 1989).

Lactobacillus plantarum, gram-pozitivni fakultativno heterofermentativni soj bakterija mliječne kiseline jedan je od najčešćih inokulanata u proizvodnji silaža (Weinberg i Muck, 1996). Homofermentativne bakterije tijekom fermentacije proizvode primarno mliječnu kiselinu, dok heterofermentativni sojevi proizvode i druge spojeve kao što su octena kiselina, etanol i ugljikov dioksid te često imaju veće gubitke suhe tvari u silažnoj masi od homofermentativni sojeva. Razdioba na ova dva tipa metabolizma u bakterijama mliječne kiseline nije uvijek statična (McDonald i sur., 1991). *Lactobacillus plantarum* fermentira heksoze primarno do mliječne kiseline, ali pentoze može fermentirati do mliječne te octene kiseline. Pritom se proizvode oba izomera mliječne kiseline s nešto višim udjelom D-mliječne kiseline. *Lactobacillus plantarum* je najčešće izolirani mikroorganizam u silažama. Osim dobrih karakteristika siliranja (brzi pad pH, nikakvi ili minimalni gubitci

suhe tvari), siliranje *Lactobacillus plantarumom* za rezultat *in vivo* pokusa ima povećanu proizvodnju mlijeka i unos hrane kod mliječnih krava te porast tjelesne mase i unosa hrane kod tovljenih životinja (Weinberg i Muck, 1996). Ti rezultati su povezani s probiotičkim karakteristikama *Lactobacillus plantarum* te smanjenom proteolizom u silažama siliranim s ovim inokulantom (Weinberg i Muck, 1996; Contreras-Govea i sur., 2013).

Aditivi bazirani na organskim i anorganskim kiselinama, kao i njihovim solima, koriste se za trenutačno snižavanje pH te tako utječu na aktivnost nepoželjnih mikroorganizama u silažnoj masi. U pravilu su mikroorganizmi koji uzrokuju kvarenje silaža, primjerice klostridiji, osjetljivi na nizak pH, dok su poželjni mikroorganizmi, kao što su bakterije mliječne kiseline, rezistentni na nizak pH (Hill, 1989). Utjecaj aditiva baziranih na kiselinama na mikroorganizme ovisi o aktivnim komponentama aditiva, kao i o koncentraciji aplikacije. Kiseline posjeduju višu aktivnost od soli istih kiselina, ali njihova uporaba zahtijeva veći oprez jer su korozivne i često štetne za zdravlje (McDonald i sur., 1991; Henderson, 1993). Od organskih kiselina najčešće se upotrebljava mravlja kiselina. Ova kiselina posjeduje antimikrobna svojstva i primarno se koristi za sterilizaciju zelene mase prije dodatka inokulanata s bakterijama mliječne kiseline. Sličnu uporabu imaju i propionska te octena kiselina. Utjecaj kiselina na bakterije mliječne kiseline i općenito na mikroorganizme u silažnom materijalu ovisi o tipu i koncentraciji kiseline. Mliječna kiselina, osim što snižava pH i inhibira nepoželjne sekundarne fermentacije koje provode klostridiji, ima i opću antimikrobnu aktivnost zbog disocijacije nedisociranih kiselina unutar stanice mikroorganizama (Crowley i sur., 2013). Mliječna kiselina već se stoljećima koristi kao konzervans, a prvi put je otkrivena u kiselom mlijeku 1780. godine. Lavosier je 1789. godine dao ime ovom spoju *acide latique*, dok je Pasteur 1857. godine zaključio da mliječna kiselina ne pripada mlijeku, nego je proizvod fermentacije nekih mikroorganizama (Wee i sur., 2006). Najveći nedostatak uporabe kiselina je njihova visoka cijena s obzirom da su potrebne znatne količine kiselina kako bi se konzervirala zelena masa (Hill, 1989).

2.3.1. Kvaliteta silaža

Kvaliteta silaža i njihova nutritivna vrijednost ovise o samom zelenom materijalu koji se silira, ali i o procesu samog siliranja te upotrijebljenim dodacima. Kukuruz se smatra izvrsnim supstratom za siliranje zbog visokog sadržaja lako dostupnih ugljikohidrata, niskog pufernog kapaciteta i optimalnog udjela suhe tvari prilikom siliranja (McDonald i sur., 1991). Biokemijske promjene koje se događaju tijekom siliranja su kompleksne, a

iako bakterije mliječne kiseline dominiraju fermentacijom (u dobro siliranim silažama) ili neka druga skupina mikroorganizama (kao npr. klostridiji tijekom sekundarne fermentacije), prisutna je i aktivnost drugih mikroorganizama u silažnoj masi, pogotovo u prvim danima siliranja kada je prisutan rezidualni kisik. S obzirom na kvalitetu krajnjeg proizvoda, silaže se dijele na dobro silirane silaže u kojima se primarno događala fermentacija pomoću bakterija mliječne kiseline ili loše silirane silaže u kojima su dominantnu ulogu imali klostridiji ili enterobakterije.

pH-vrijednost jedna je od najosnovnijih parametara kvalitete silaža (McDonald i sur., 1991). U silažama visoko vlažnog zrna kukuruza pH-vrijednost u dobro siliranim silažama kreće se između 4,0 i 4,5 (Prigge i sur., 1976; Taylor i Kung, 2002; Hoffman i sur., 2011; Diaz i sur., 2013; Kung i sur., 2014; Ferraretto i sur., 2014), iako konačna pH-vrijednost ovisi o upotrijebljenim dodacima prilikom siliranja, hibridima kukuruza upotrjebljenim za siliranje te općenito o tehnološkim postavkama procesa siliranja. U radu Diaz i sur. (2013) opisane su pH-vrijednosti visoko vlažnog klipa kukuruza: silaže s dodatkom inokulanta s homofermentativnim bakterijama mliječne kiseline imale su pH-vrijednost 4,03, dok su silaže s dodatkom heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline imale nesignifikantno niži pH od 3,99 te nije utvrđena signifikantna razlika između silaža s ova dva dodatka i kontrolnih silaža koje su imale pH-vrijednost od 4,06. No u istom istraživanju silaže s dodatkom amonijaka imale su pH zamjetno viši od 7,56. Kung i sur. (2014) dobili su signifikantno viši pH (4,20) na kraju siliranja u silažama s dodatkom proteaza nego u kontrolnim silažama visoko vlažnog zrna kukuruza (3,95). Dodatak inokulanta koji je sadržavao *Propionibacterium acidipropionici* za rezultat je imao signifikantno niži pH u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza (4,17) nego u silažama bez dodataka (4,32) na kraju siliranja (Dawson i sur., 1998).

pH-vrijednost silaže ovisi o koncentraciji proizvedenih organskih kiselina. Kiselina koja ima najveći utjecaj na pH-vrijednost, jer se najviše proizvodi tijekom siliranja, je mliječna kiselina (McDonald i sur., 1991). Sadržaj mliječne kiseline u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza na kraju faze fermentacije kreće se od 7 do 20 g/kg ST, iako apsolutne vrijednosti često izlaze iz definiranih granica ovisno o samom silažnom procesu i njegovim karakteristikama (Prigge i sur., 1976; De Brabander i sur., 1992; Dawson i sur., 1998; Taylor i Kung, 2002; Kung i sur., 2014). Silaže visoko vlažnog zrna kukuruza imaju tri do četiri puta manji sadržaj mliječne kiseline od silaža cijele biljke kukuruza. Filya (2003) u istraživanju na silažama cijele biljke kukuruza s dodatkom *Lactobacillus buchneri i Lactobacillus plantarum,* dobio je 32 g/kg ST mliječne kiseline u silažama. Taylor i Kung (2002) dobili su u silažama visoko vlažnog kukuruza siliranim uz dodatak *Lactobacillus buchneri* i *Lactobacillus plantarum* sadržaj mliječne kiseline od 8,6 g/kg ST. Silaže cijele biljke kukuruza bile su silirane 60 dana, a silaže visoko vlažnog zrna kukuruza 92 dana.

Iako je evidentna signifikantna razlika u sadržajima mliječne kiseline između silaža cijele biljke kukuruza i silaža visoko vlažnog zrna, njihova pH-vrijednost se ne razlikuje zamjetno jer je proizvodnja amonijaka u silažama visoko vlažnog zrna proporcionalno niža.

Amonijak je produkt deaminacije aminokiselina te, iako ga neki autori predstavljaju kao pokazatelj proteolize, on je više pokazatelj deaminacije aminokiselina/proteina. Proizvodnja amonijaka u silažama primarno je rezultat aktivnosti mikroorganizama u silažnoj masi (Ohsima i McDonald, 1978; McDonald i sur., 1991). Sadržaj amonijaka u dobro siliranim silažama visoko vlažnog zrna kukuruza ne prelazi 5% te je primarno produkt deaminacije serina (Ser), arginina (Arg) i amida i redukcije nitrata pomoću bakterija mliječne kiseline (Ohsima i McDonald, 1978; Hoffman i sur., 2011; Ferraretto i sur., 2014). Previsoka proizvodnja amonijaka tijekom siliranja mogući je znak kontaminacije silaže proteolitičkim klostridijima i enterobakterijama (Ohsima i McDonald, 1978; McDonal i sur., 1991).

Proteoliza u silažama kombinirani je efekt aktivnosti mikrobnih proteaza i proteaza biljke (Ohsima i McDonald, 1978). Glavni pokazatelj proteolize je sadržaj topljivog proteina koji u pravilu raste tijekom siliranja (Ferraretto i sur., 2014). Iako su prvi radovi ukazivali na povećanu proteolitičku aktivnost na početku siliranja koja bi se praktički zaustavila u stabilnoj fazi i to zbog snižavanja pH i deaktivacije biljnih proteaza (Ohsima i McDonald, 1978; McDonal i sur., 1991), nova saznanja govore o porastu topljivog proteina na početku siliranja, ali i o tome da se proteolitička aktivnost unutar silažne mase ne zaustavlja, nego je prisutna i tijekom stabilne faze, samo u puno manjem obimu (Der Bedrosian i sur., 2012; Ferraretto i sur., 2014).

Pojedini parametri kvalitete silaža ukazuju na tip fermentacije i efikasnosti siliranja zelene mase te ukazuju na potencijalnu nutritivnu vrijednost silaže.

2.3.2. Utjecaj siliranja na sadržaj zeina

Zeini, gradivni proteini proteinsko-škrobne matrice, imaju važan utjecaj na nutritivnu vrijednost suhog i siliranog zrna kukuruza. Ti hidrofobni proteini grade proteinska tijela koja predstavljaju fizičku barijeru za mikroorganizme buraga i enzime (McAllister i sur., 1993). Zrno kukuruza veće caklavosti ima nižu probavljivost od zrna manje caklavosti koje sadrži manje zeina (McAllister i sur., 1993; Philippeau i sur., 2000; Correa i sur., 2002; Ngonyamo-Majee i sur., 2008; Lopes i sur., 2009; Ali i sur., 2014). Siliranje i fermentacija zrna kukuruza za rezultat imaju razgradnju proteina (Messman i Weiss, 1994) pa tako i zeina. Djelovanje organskih kiselina, koje su produkti fermentacije u silažnoj masi, te

paralelna aktivnost biljnih i mikrobnih proteaza glavni su faktori koji utječu na razgradnju zeina. (McDonald i sur., 1991; Lawton, 2002). Bakterije mliječne kiseline koje dominiraju fermentacijom u dobro siliranim silažama imaju čitav niz ekstracelularnih proteaza i intracelularnih peptidaza (Kunji i sur., 1996). Philippeau i Michalet-Doreau (1998) su pretpostavili da razgradnja zeina ima primaran utjecaj na probavljivost škroba pa tako i na nutritivnu vrijednost siliranog zrna kukuruza. Hoffman i suradnici (2011) su dalje upotpunili ovu pretpostavku davajući najveću važnost *γ*-zeinima koji se nalaze na površini proteinskih tijela i, po nekim pretpostavkama, koji su odgovorni za interakcije s granulama škroba (Holding i Larkins, 2006). Iako mehanizam razgradnje proteinskih tijela još uvijek nije razjašnjen baš kao i njegov utjecaj na granule škroba, pretpostavka je da se razgradnjom zeina događa najvjerojatnije disocijacija granula škroba s proteinsko-škrobne matrice te one postaju dostupnije za razgradnju pomoću mikroorganizama (Philippeau i Michalet- Doreau, 1998; Hoffman i sur., 2011).

2.4. Nutritivna vrijednost silaža – probavljivost silaža

Škrob je glavna energetska komponenta žitarica koje imaju važno mjesto u hranidbi mliječnih krava i intenzivno hranjenih goveda. S obzirom na probavljivost, ukupni škrob dijeli se na tri frakcije: brzo probavljivi škrob, sporo probavljivi škrob i neprobavljivi škrob (Singh i sur., 2010). Prvo mjesto razgradnje škroba u preživača je burag (engl. *rumen*) u kojem se događaju hidroliza i fermentacija škroba uslijed aktivnosti buražnih mikroorganizama, pri čemu se proizvode organske kiseline. Intenzitet i brzina razgradnje škroba u buragu ovisi o tipu žitarice, procesiranju žitarice, obroku te buražnoj mikroflori. Preniska razgradnja škroba u buragu može dovesti do nepotpune probavljivosti škroba u cijelom probavnom traktu životinje te do proizvodnih gubitaka. Previsoka razgradnja škroba u slučaju kada životinja ne uspijeva neutralizirati velike količine proizvedenih organskih kiselina proizvodnjom sline ili apsorpcijskim kapacitetima probavnog trakta vrlo lako može dovesti do redukcije unosa hrane vezanog uz subakutnu acidozu ili do još ozbiljnijih zdravstvenih posljedica za životinju uslijed akutne acidoze (Ørskov, 1986; Kotarski i sur., 1992; Huhtanen i Sveinbjörnsson, 2006). Manipuliranje karakteristikama hranjivih tvari kojima one postaju više ili manje dostupne fermentaciji u buragu od primarnog je interesa za proizvodnju i zdravlje životinja.

U hranidbi žitaricama narušavanje konzistencije perikarpa zrna je neophodno kako bi se omogućilo iskorištavanje hranjivih tvari. Tako prilikom hranidbe preživača cijelim

zrnom kukuruza već samo žvakanje i preživanje narušavaju perikarp i omogućavaju razgradnju škroba (McAllister i Cheng, 1996). U hranidbi goveda cijelim zrnima kukuruza često se događaju veliki proizvodni gubitci jer se čak do 30% zrna pojavi u fecesu (Ørskov, 1986). Obrada zrna (kao na primjer mljevenje pa i siliranje) narušava konzistenciju perikarpa, zaštitne ovojnice zrna, čime stijenke stanica endosperma i proteinsko-škrobna matrica s proteinskim tijelima postaju glavne fizičke barijere za probavljivost škroba (McAllister i sur., 1993; McAllister i Cheng, 1996). Zeini, proteini koji formiraju proteinska tijela netopiva u vodi, pripadaju skupini proteina koji su teže razgradivi i pokazuju nisku razgradivost pri djelovanju peptidaza pepsina te tripsina/kimotripsina (Hamaker, 1987).

Correa i sur. (2002) utvrdili su izrazito visoku pozitivnu korelaciju (r = 0,98) između buražne razgradivosti suhe tvari i škroba kukuruza. Zaključili su da je buražna razgradivost suhe tvari zrna kukuruza dobar pokazatelj razgradivosti škroba koju je analitički dosta zahtjevno odrediti što je i zbog visokog udjela škroba u zrnu kukuruza i očekivano (do 80%; Kotarski i sur., 1991). Na razgradivost suhe tvari zrna kukuruza siliranog ili suhog zrna primarni utjecaj ima razgradivost škroba (Philippeau i sur., 1999; Ngonyamo-Majee i sur., 2008).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da siliranje ima pozitivan učinak na probavljivost škroba. Suho zrno kukuruza ima nižu buražnu i ukupnu probavljivost škroba od škroba silaža visoko vlažnog zrna kukuruza (Philippeau i Michalet-Doreau, 1998; Firkins, 2001; Ferraretto i sur., 2013). Stajanje silaža prikazano kroz starost silaža ima pozitivni utjecaj na buražnu probavljivost i razgradivost škroba. Newbold i sur. (2006) su *in situ* utvrdili porast ruminalne razgradivosti škroba od 53,2% u 2. mjesecu stajanja silaže do 69,0% u 10. Mjesecu stajanja silaže. Sličan rezultat imali su i Stock i sur. (1991) koji su zabilježili porast od 20,4% probavljivosti škroba *in vitro* između silaža visoko vlažnog zrna starih 120 dana i 365 dana. Ferrearetto i sur. (2014) su proveli meta-analizu 6131 uzorka visoko vlažnog zrna kukuruza dostavljenih u komercijalne laboratorije u periodu od jedne godine (od listopada jedne do kolovoza naredne godine; u kojem je mjesec dostavljenog uzorka predstavljao starost silaže) te su utvrdili porast buražne *in vitro* probavljivosti škroba od 9%. Drugi autori su slično utvrdili porast ruminalne probavljivosti škroba, kao i suhe tvari u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza ili silažama cijele biljke kukuruza u odnosu na nesiliranu masu koristeći *in situ* (Galyean i sur., 1981; Nocek, 1987; Jensen i sur., 2005; Peyart i sur., 2014), *in vivo* (McKnight i sur., 1973; De Brabander i sur., 1992) ili *in vitro* (Ferraretto i sur., 2015a; Ferraretto i sur., 2015b) metode određivanja.

Razgradnja škroba silaža visoko vlažnog zrna kukuruza, osim fizioloških statusa životinje, pod značajnim je utjecajem karakteristika same silaže, a to su: veličina čestica (Ekinci i Broderick, 1997; Ferraretto i sur., 2013), sadržaj suhe tvari (Correa i sur., 2002;

Ngonyamo-Majee i sur., 2009) te tip endosperma (McAllister i sur., 1993; Philippeau i sur., 2000; Correa i sur., 2002; Ngonyamo-Majee i sur., 2008; Lopes i sur., 2009; Ali i sur., 2014).

Smanjenje veličina čestica silaže sa 4,33 na 1,66 mm imalo je pozitivan učinak na buražnu probavljivost silaža u mliječnih krava te je utvrđena povećana probavljivost svih parametara silaže: suhe tvari, organske tvari, škroba pa čak i vlakana (Ekinci i sur., 1997). Povećanje aktivne površine čestica silaže kroz smanjenje veličine čestica mljevenjem omogućava optimizaciju mikrobne i enzimske razgradnje (Huntington, 1997) jer omogućava bolje prianjanje mikroorganizama na površinu čestica i veću dodirnu površinu između enzima i supstrata (McAllister i Cheng, 1996).

Kako raste sadržaj suhe tvari i zrelost biljke kukuruza, tako raste i caklavost zrna (Correa i sur., 2002; Ngonyamo-Majee i sur., 2009). Caklavost zrna ili udio caklavog endosperma, povezana je sa sadržajem skladišnih proteina zeina (Paiva i sur., 1991; Dombrink-Kurtzman i Bietz, 1993; Landry i Delhaye, 2007). Proteinsko-škrobna matrica u zrnu najvažniji je pojedinačni ograničavajući faktor razgradnje škroba jer zeini, proteini koji grade proteinska tijela a nalaze se unutar matrice, ograničavaju dostupnost granula škroba mikroorganizmima u buragu (McAllister i sur., 1993). Različiti tipovi endosperma zrna kukuruza sadrže različite udjele zeina. Caklavi endosperm sadržava više zeina te je slabije probavljiv, dok brašnasti endosperm sadrži manje zeina i bolje je probavljiv (Paiva i sur., 1991; McAllister i sur., 1993; Philippeau i sur., 2000; Correa i sur., 2002; Ngonyamo-Majee i sur., 2008; Lopes i sur., 2009; Ali i sur., 2014).

2.4.1. Metode određivanja probavljivosti

Kako bi se odredio odnos hranjivih tvari u obroku preživača za optimalnu fermentaciju u buragu i općenito optimizirao odgovor životinje i probavljivost hranjivih tvari ne samo u buragu nego u cijelom probavnom traktu životinje, trebaju se utvrditi karakteristike buražne fermentacije svake hranjive tvari obroka. Do danas je razvijeno nekoliko metoda za određivanje probavljivosti hranjivih tvari koje su dale različite rezultate. Metode *in vivo* su metode koje daju najrealnije podatke, no vremenski i financijski su zahtjevne. Iz tog razloga uvedene su *in situ* i *in vitro* metode. Da bi *in situ* ili *in vitro* metoda bila primjenjiva, ona mora imati dobru korelaciju s *in vivo* metodama određivanja, određenu razinu točnosti i reproducibilnosti te predstavljati uštedu u vremenskom i financijskom smislu (Nocek, 1988).

In vivo metode koje prate probavljivost hranjivih tvari u nekim dijelovima probavnog trakta životinje bazirane su na obilježavanju hranjive tvari koja se prati u probavnom traktu markerima te upotrebom kanula postavljenih u sirište (engl. *abomasum*) ili dvanaesnik (engl. *duodenum*) za uzorkovanje digesta i praćenje markera (Huhtanen i Sveinbjörnsson, 2006). Ako se prati probavljivost u cijelom probavnom traktu, najjednostavnije metode su uzorkovanje svog fecesa ili upotreba markera. Problem *in vivo* metoda određivanja jest heterogena raspodjela markera između čestica različitih veličina i problemi prilikom uzorkovanja, kao što je separacija digesta na tekuću i krutu fazu kod upotrebe T-kanula. Faichney (1975) je uveo upotrebu dvostrukog markera, jednog koji prati tekuću fazu digesta i drugog koji prati krutu fazu, nakon čega se rezultati za obje faze računski ili eksperimentalno objedinjuju kako bi udio markera u obroku i digestu bio jednak. Kromov oksid (Cr_2O_3), neprobavljiva neutralna vlakna (INDF, engl. *indigestible neutral detergent fibre*) i rijetki metali kao što je iterbij (Yb) neki su od markera koji se uspješno koriste u *in vivo* metodama za određivanje probavljivosti (Udén i sur., 1980; Ahvenjarvi i sur., 2001; Siddons i sur., 1985).

In vitro metode uključuju upotrebu enzima ili upotrebu buražnog soka kao reagensa u reakcijskoj smjesi koja sadrži ispitivanu hranjivu tvar. Mjeri se razgradnja ispitivane tvari ili sinteza mogućih produkata razgradnje ispitivane tvari. Postoje razne enzimske tehnike određivanja (Cone, 1991) koje u pravilu pokazuju niže vrijednosti u usporedbi s *in situ* metodom. Naime prilagodba enzimskog pripravka na uvjete u reakcijskoj smjesi je ograničena ne samo na udjele pojedinih enzima, nego i na potrebu uvođenja dodatnih enzima koja se normalno događa u mikroorganizmima ovisno o promjeni uvjeta u stanici i njenom okolišu. U slučaju razgradnje škroba evidentne su razlike između mehanizama razgradnje enzimima i mikroorganizmima. Buražni mikroorganizmi razgrađuju škrob s vanjske strane granula, dok enzimi započinju razgradnju u točkastoj lokaciji na vanjskoj strani granule, nakon čega slijedi razgradnja iz unutrašnjosti prema vanjskoj površini granule (Cone, 1991). Enzimske metode pokazale su se prikladnima za mjerenje relativnih razlika probavljivosti hranjivih tvari, no ne i za mjerenje apsolutnih vrijednosti probavljivosti (Nocek, 1988).

Tilly-Terryjeva (1963) metoda najčešće je korištena *in vitro* metoda za određivanje probavljivosti škroba (Noeck, 1988; Huhtanen i Sveinbjörnsson, 2006). Metoda se može provoditi u jednom stupnju kada se simulira samo buražna probavljivost ili u dva stupnja kada se imitiraju buražna i postburažna probavljivost škroba. U prvom stupnju inkubira se hranjiva tvar s buražnim sokom, dok se u drugom simulira postburažna razgradnja preostale hranjive tvari upotrebom pepsina i slabe kiseline (Tilly i Terry, 1963). Kontinurani i polukontinuirani sustavi kao što je Ankom Daisy^{II} inkubator sve se češće upotrebljavaju za mjerenje probavljivosti suhe tvari, vlakana te ostalih hranjivih tvari (Adesogan, 2005;

Ferreira i Mertens, 2005; Tagliapietra i sur., 2012). Uporabu ovakvih sustava među prvima su opisali Czerkawski i Breckenridge (1977), iako je njihov sustav bio zamjetno drugačiji od današnjeg Ankom Daisy^{II} inkubatora. Prilikom inkubacije buražnim sokom treba paziti na: odnos mase hranjive tvari koja se analizira i mase buražnog soka, odnos buražnog soka i pufera, sastav pufera, tip mlina za pripremu uzorka, veličinu pora na situ mlina te na obrok životinje donora buražnog soka (Huhtanen i Sveinbjörnsson, 2006). Dva najčešća pufera koji se upotrebljavaju u inkubacijama su umjetna slina ili McDougallov pufer (McDougall, 1948) te pufer definiran u radu Van Soesta i Robertsona (1985). Puferi osiguravaju uvjete za fermentaciju koji nisu osigurani buražnim sokom, kao što su na primjer održavanje stabilnog pH ili redoks-potencijala (Huhtanen i Sveinbjörnsson, 2006).

In situ metoda za određivanje razgradivosti hranjivih tvari (suhe tvari, organske tvari, škroba, vlakana i proteina) jedna je od najčešće upotrebljavanih metoda za određivanje probavljivosti, pogotovo za mjerenje buražne razgradivosti škroba (Huhtanen i Sveinbjörnsson, 2006). Bazirana je na inkubaciji hranjivih tvari u najlonskim vrećicama u buragu životinje kroz određeni vremenski period. Obrada i izračun parametara probavljivosti temelje se na modelu Orskova i McDonalda (1979) koji su definirali razgradivost u vremenu (t) kroz tri parametra: udio brzo razgradive frakcije (a), udio sporo razgradive frakcije (b) i brzina razgradivosti (c). Model je prikazan kroz osnovnu jednadžbu:

$$razgradivost\ (t) = a + b\ x\ (1 - e^{c \times t}) \quad (1)$$

Važan utjecaj na model ima brzo razgradiva frakcija koja je definirana kao frakcija beskonačne ili potpune razgradivosti (Sniffen i sur., 1992). Brzo razgradiva frakcija se često definira i kao topljiva frakcija, iako je ona zapravo prije frakcija malenih čestica koje se ispiru iz vrećica a ne razgrade (ili otope) prilikom inkubacije (Huhtanen i Sveinbjörnsson, 2006). Sporo razgradiva ili potencijalno razgradiva frakcija je frakcija čija se brzina razgradivosti mjeri (c) modelom Orskova i McDonalda. Razgradnja ove frakcije opisana je kinetikom prvog reda. Nerazgradiva frakcija opisana je kao razlika do 100% ili 1 od zbroja brzo i sporo razgradive frakcije (Noeck, 1988; Peyrat i sur., 2014).

$$nerazgradiva\ frakcija = 1 - (a + b) \quad (2)$$

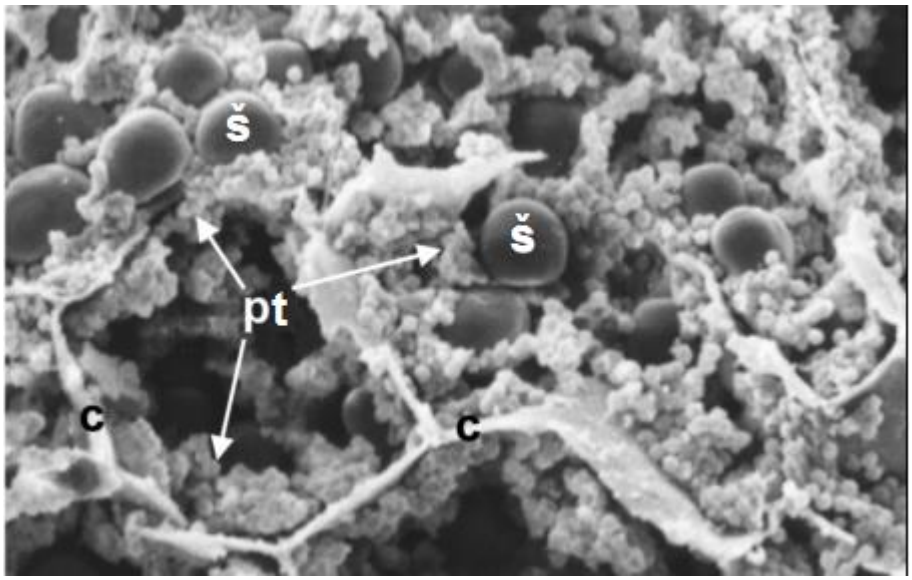
Poroznost vrećica utječe na krajnji rezultat. Tothi i suradnici (2003) zabilježili su višu brzinu razgradivosti škroba u vrećicama s veličinom pora od 36 μm nego u vrećicama veličine pora 15 μm. Optimalna poroznost vrećice je kompromis između veličine koja dopušta ulaz buražnog soka sa stanicama mikroorganizama i zadržavanja nerazgrađenih čestica hranjive tvari (škroba) u vrećici. Osim poroznosti, važan utjecaj na krajnji rezultat imaju i veličina čestice tvari koja se ispituje, odnos mase (veličine) uzorka i površine

vrećice, obrok životinje te sama životinja (Nocek, 1988). Osnovni problem *in situ* metode jest što se ona temelji na pretpostavci da je materijal koji nestaje iz najlonske vrećice isti onaj koji je i fermentiran u buragu, što nije u potpunosti točno (Huhtanen i Sveinbjörnsson, 2006).

2.5. Skladišni proteini zrna kukuruza – zeini

Skladišni proteini u žitaricama nazivaju se prolamini. Naziv je generiran iz karakteristike ovoga tipa proteina koji sadrži visoke udjele aminokiselina prolina (Pro) i glutamina (Gln). Prolamini kukuruza nazivaju se zeini. Naziv je uveo John Gorham 1821. godine prilikom istraživanja indijanskog kukuruza. Zeini su najveća proteinska frakcija u zrnima kukuruza i čine 50 – 70% ukupnog proteina (Holding i Larkins, 2009). U pravilu zeini nisu topivi u vodi ali jesu u vodenim otopinama alkohola (volumni udio 60% izopropanola, 70% etanola ili 95% metanola u smjesama vode i alkohola), uree (otopine visokih koncentracija) ili bazičnim otopinama (pH ≥ 11). Karakteristike topljivosti zeina proizlaze iz njegovog aminokiselinskog sastava kojeg karakterizira visoki udio nepolarnih aminokiselina, kao i iz struktura koje grade nakupine zeina. Zeini su bogati glutaminskom kiselinom i glutaminom (Glu/Gln, 21 – 26%, *w*), leucinom (Leu, 20%, *w*), prolinom (Pro, 10%, *w*) i alaninom (Ala, 10%, *w*). Zeine isto tako karakterizira i nedostatak esencijalnih aminokiselina lizina (Lys) i triptofana (Trp) što ih definira kao tip proteina niže nutritivne vrijednosti (Shukla i Cheryan, 2001).

Unutar zrna kukuruza, zeini se nalaze u takozvanim proteinskim tijelima, kružnim proteinskim agregatima (veličine 1 do 2 μm) koji obavijaju škrobna zrnca (veličine 5 – 35 μm) u citoplazmi stanica endosperma. Zeini su skupina proteina koja se sastoji od četiri različita tipa proteina koji se razlikuju u svojim veličinama, topljivosti i naboju. Nakupine zeina sporo su topljive u otopinama alkohola u koje se često dodaju reducirajuće tvari kako bi se razorili disulfidni mostovi između agregacija zeina i omogućila bolja topljivost istih. Povišenje temperature te smanjenje veličina čestica endosperma prilikom ekstrakcije povećava iskorištenje zeina (Boston i Larkins, 2009). Definirana su četiri različita tipa zeina: alfa (α), beta (β), gama (γ) i delta (δ) zeini.



Slika 1. Skenirajući elektronski mikrograf stanica endosperma u razvijajućem zrnu kukuruza s obilježenim proteinskim tijelima (pt, bijele zrnaste nakupine), škrobnim zrncima (š, kružnog oblika) i staničnom stijenkom (c) (prilagođeno iz: Holding i Larkins, 2006).

2.5.1. Nomenklatura zeina

Nomenklatura zeina uvelike je bazirana na topljivosti različitih frakcija zeina u otapalima te je do danas imala nekoliko važnih promjena. Osborn (1897) je uveo jednu od prvih ekstrakcija proteina koja se koristi još i danas. Po njemu definirana ekstrakcija proteina zrna kukuruza uključuje naredna otapala: vodu (albumini), 5%-tni natrijev klorid (globulini), 70%-tni etanol (prolamini) i 5%-tnu natrijevu lužinu (glutelini). Prva klasifikacija zeina bazirala se na razlici u topljivosti proteina između 95%-tnog etanola ili 85%-tnog izopropanola s jedne strane koji su otapali *α*-zeine, te 60%-tnog etanola koji je otapao *β*-zeine s druge strane(McKinney, 1958; citirano u Boston i Larkins, 2009). Paulis i Wall (1971) te Landry i Moreaux (1970) razvili su još učinkovitije metode razdvajanja zeina od ostalih tipova proteina. Nakon odvajanja albumina i globulina, zeini su ekstrahirani u dva koraka: samo s vodenom otopinom etanola u prvom, a u drugom koraku s vodenom otopinom etanola i reducirajućeg spoja, najčešće *β*-merkaptoetanola. Obje skupine ekstrahiranih proteina imale su različitu strukturu polipeptidnih lanaca, iako su istovremeno imali sličan sastav aminokiselina.

Današnju klasifikaciju zeina uveo je Essen (1986), a bazira se na različitoj topljivosti zeina u otopinama s i bez reducirajućih spojeva u više koraka. Početni ekstrakt zeina, dobiven ekstrakcijom uzorka samljevenog zrna kukuruza smjesom 60% izopropanola i 1%

β-merkaptoetanola, separiran je u narednim koracima na nove frakcije. Prva topljiva frakcija definirana kao SF1 (engl. *soluble fraction*) ekstrahirana je samo u 60%-tnom izopropanolu, druga topljiva frakcija (SF2) ekstrahirana je smjesom 60% izopropanola i 1% *β*-merkaptoetanola, a treća topljiva frakcija (SF3) ekstrahirana je puferom (30 mM natrijeva acetatnog pufera, pH 6,0). Svaka frakcija sadržavala je specifične polipeptide: SF1 polipeptide molekulskih masa između 22 i 24 kDa, SF2 polipeptide molekulskih masa od 17 do 18 kDa te SF3 polipeptide od 27 kDa. Svakoj skupini pridodan je novi naziv: SF1 su definirani kao *α*-zeini, SF2 kao *β*-zeini, a SF3 kao *γ*-zeini (Essen, 1987). Nakon karakterizacije polipeptida molekulske mase 10 kDa (Kirihara i sur., 1988) koji pripada skupini zeina, Larkins i suradnici (1989) su ga klasificirali kao *δ*-zein. Ovako definirane skupine zeina kasnije su još popunjene novo okarakteriziranim polipeptidima, ali bez promjena u klasifikaciji.

Najveća skupina zeina su *α*-zeini koji čine oko 70% ukupnih zeina u zrnu kukuruza, iako udio varira ovisno o tipu endosperma zrna. Definirana su dva tipa *α*-zeina, 22 kDa i 19 kDa. Aminokiselinski sastav *α*-zeina u skladu je s općim karakteristikama zeina: sadržava visoke udjele aminokiselina Gln i Pro kao i hidrofobnih aminokiselina Ala i Leu. Esencijalne aminokiseline Lys i Trp su prisutne u zanemarivim količinama (tablica 1.). Glavna strukturna komponenta *α*-zeina su tandem-sekvence od dvadeset aminokiselina (ponavljaju se jedna iza druge) koje su omeđene s Gln sa svake strane. U 22 kDa *α*-zeinu definirano je deset ponavljanja sekvence, a u 19 kDa α-zeinu devet ponavljanja sekvence. Sekundarna struktura ponavljanja je najvjerojatnije α-zavojnica. Pozicija polarnih aminokiselina u polipeptidnom lancu je konzervirana te se smatra da te aminokiseline imaju važnu ulogu u postizanju nativne konformacije i agregacije *α*-zeina unutar proteinskih tijela (Garrat i sur., 1993; Boston i Larkins, 2009).

Druga skupina zeina po zastupljenosti u endospermu zrna kukuruza su γ-zeini s udjelom od 20 do 25% (Wu i Messing, 2010). Ovaj tip zeina bogat je cisteinima (Cys) i disulfidnim mostovima. Razlikujemo tri tipa *γ*-zeina: 50 kDa, 27 kDa i 16 kDa *γ*-zeine. Najzastupljenija frakcija je 27 kDa *γ*-zein, a najmanje zastupljen je 50 kDa *γ*-zein, često na granici detekcije (Woo i sur, 2001). Sva tri tipa *γ*-zeina imaju šest konzerviranih regija bogatih aminokiselinom Cys unutar polipeptidnog lanca. Kao i kod *α*-zeina, ovaj tip zeina ima nizak sadržaj aminokiselina Lys i Trp (tablica 1.). U 27 kDa i 50 kDa γ-zeinima na N-terminalnom kraju nalazi se regija ponavljajuće sekvence koja nije prisutna u 16 kDa γ-zeinu. Ponavljajuća sekvenca u 27 kDa γ-zeinu je heksapeptid PPPVHL, dok se u 50 kDa γ-zeinu ponavljajuća sekvenca sastoji od ponavljajućih Gln (Boston i Larkins, 2009; Holding i Larkins, 2009).

Tablica 1. Aminokiselinski udjeli u najzastupljenijim zeinima (prilagođeno iz: Holding i Larkins, 2006).

	19 kDa *α*-zein (%)	22 kDa *α*-zein (%)	27 kDa *γ*-zein (%)	27 kDa *γ*-zein (%)	10 kDa *δ*-zein (%)
Asn	4,5	5,3	0,0	0,6	2,0
Asp	0,5	0,0	0,0	0,0	0,7
Thr	3,2	2,8	4,4	3,7	4,0
Ser	7,3	6,9	3,9	5,5	6,7
Gln	19,5	20,7	14,7	18,9	10,0
Glu	0,5	0,8	1,0	1,8	0,0
Pro	10,0	8,9	25,0	15,2	13,3
Gly	0,9	0,8	6,4	9,1	2,7
Ala	13,6	13,8	4,9	7,9	10,0
Cys	0,9	0,4	7,4	7,3	4,0
Val	2,7	6,9	7,4	4,9	3,3
Met	0,5	2,0	0,5	1,8	20,7
Ile	4,5	4,5	2,0	0,6	2,0
Leu	19,5	17,1	9,3	8,5	13,3
Tyr	3,6	2,8	2,0	4,9	0,7
Phe	5,5	3,3	1,0	4,3	4,0
His	0,5	1,2	7,8	2,4	2,0
Lys	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7
Arg	1,4	1,6	2,5	1,8	0,0
Trp	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0

Druga dva tipa zeina su zamjetno niže zastupljena u endospermu kukuruza. Nova klasifikacija svrstava 15 kDa β-zein u skupinu *γ*-zeina zbog utvrđene homologije između 15 kDa β-zeina i *γ*-zeina (Woo i sur., 2001). O strukturi zadnje skupine zeina, *δ*-zeinima, postoje još mnoge nepoznanice. Poznato je da su oba tipa *δ*-zeina, 18 kDa i 10 kDa *δ*-zeini, hidrofobni proteini bogati metioninom (Met), a samim time i sumporom (tablica 1.). Iako su različitih molekulskih masa, posjeduju međusobno visoko konzervirane sekvence. Razlikuju se međusobno u samo 53 aminokiselina dugom dodatnom insertu bogatom aminokiselinom Met u središnjem dijelu lanca koji je prisutan samo u 18 kDa *δ*-zeinu (Boston i Larkins, 2009; Holding i Larkins, 2009).

2.5.2. Sinteza zeina i proteinskih tijela

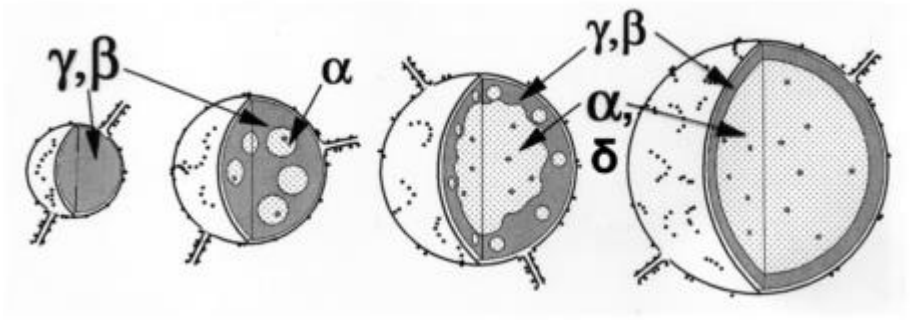
Sinteza zeina u endospermu započinje oko 9 dana nakon polinacije te se nastavlja tijekom razvoja endosperma a i kasnije, iako u smanjenom obujmu uslijed programirane smrti stanica endosperma (Young i Gallie, 2000). U žitaricama sinteza skladišnih proteina,

pa tako i zeina, događa se na hrapavom endoplazmatskom retikulumu. Hrapavi endoplazmatski retikulum središnje je mjesto u stanici gdje se odvija agregacija zeina i formiranje proteinskih tijela. Kontrola sinteze proteinskih tijela u stanicama događa se na nekoliko razina: na vremenskoj i prostornoj regulaciji ekspresije gena koji kodiraju za zeine, na razini transkripcije te ovisno o specifičnim interakcijama između različitih tipova zeina (Woo i sur., 2001; Kim i sur., 2002).

Najmanja proteinska tijela koja se nalaze u stanicama endosperma neposredno ispod perikarpa, sadržavaju samo *γ*-zeine i *β*-zeine koji su međusobno povezani disulfidnim mostovima. Tijekom daljnjih faza sinteze *α*-zeini i *δ*-zeini penetriraju u agregate *γ*-zeina i *β*-zeina (takozvanu jezgru ili središnji dio proteinskih tijela). Kako se povećava sinteza i udio primarno *α*-zeina, a onda i *δ*-zeina u proteinskim tijelima, tako rastu i proteinska tijela do maksimalnog promjera od 1 do 2 μm (slika 2.) (Holding i Larkins, 2009). Unutar proteinskih tijela svaki tip zeina ima određenu poziciju i funkciju. Najzastupljenija skupina zeina, *α*-zeini, nalazi se u jezgri proteinskih tijela zajedno s *δ*-zeinima. Nakupljanje *α*-zeina unutar proteinskih tijela ima definirani uzorak s 19 kDa *α*-zeinima koji se nalaze unutar cijele jezgre te 22 kDa *α*-zeinima koji se nalaze u sloju na granici između jezgre i omotača sastavljenom od *γ*-zeina (Holding i sur., 2007). Omotač proteinskih tijela koji sadrži *γ*-zeine i *β*-zeine ima važnu ulogu u zadržavanju proteinskih tijela na endoplazmatskom retikulumu (Coleman i sur., 1996; Bagga i sur., 1997) i vrlo vjerojatno u ograničavanju veličine proteinskih tijela (Holding i Larkins, 2009). Osim u omotaču, prisutne su i sitne točkaste nakupine *γ*-zeina i *β*-zeina u jezgrama proteinskih tijela primarno načinjene od 16 kDa *γ*-zeina i 15 kDa *β*-zeina koji ulaze u protein-protein interakcije s *α*-zeinima i *δ*-zeinima te ih tako zadržavaju unutar proteinskih tijela zbog čega imaju važnu ulogu u ekspanziji proteinskih tijela (Holding i Larkins, 2006; Guo i sur., 2013). Ostala dva *γ*-zeina ne ulaze u interakciju s *α*-zeinima, već se smatra da 27 kDa *γ*-zein ima važnu ulogu u inicijaciji proteinskih tijela te je njegova količina u uskoj vezi s brojem proteinskih tijela u stanicama endosperma (Guo i sur., 2013).

Veličina proteinskih tijela i njihov sastav, kao i raspored specifičnih zeina te sadržaj ukupnih zeina, sudjeluju u definiranju tipa endosperma zrna kukuruza. Paiva i sur. (1991), u istraživanju distribucije zeina u mekim (brašnastim) i tvrdim (rožnatim, caklavim) dijelovima endosperma odredili su da tvrdi endosperm sadržava više zeina od brašnastog, bez obzira na genotip kukuruza. Isti odnos utvrdili su i drugi autori (Dombrink-Kurtzman i Bietz, 1993; Landry i Delhaye, 2007). Dodatno, u proizvodnim uvjetima restrikcije dušikom koji za rezultat imaju smanjenu sintezu zeina zrna kukuruza su mekša (Tsai i sur., 1978). Razlikuju se dva tipa endosperma kukuruza: brašnasti endosperm sadrži manja (ili nezrela proteinska tijela) koja obavijaju veće sferične granule škroba. Nezrela proteinska tijela imaju manju jezgru te proporcionalno manje *α*-zeina i *δ*-zeina. Caklavi endosperm

ima zrela proteinska tijela sa zamjetno većim jezgrama i većim sadržajem *α*-zeina i *δ*-zeina koja obavijaju granule škroba. U pravilu caklavi endosperm ima manje škroba od brašnastog (Duvick, 1961).



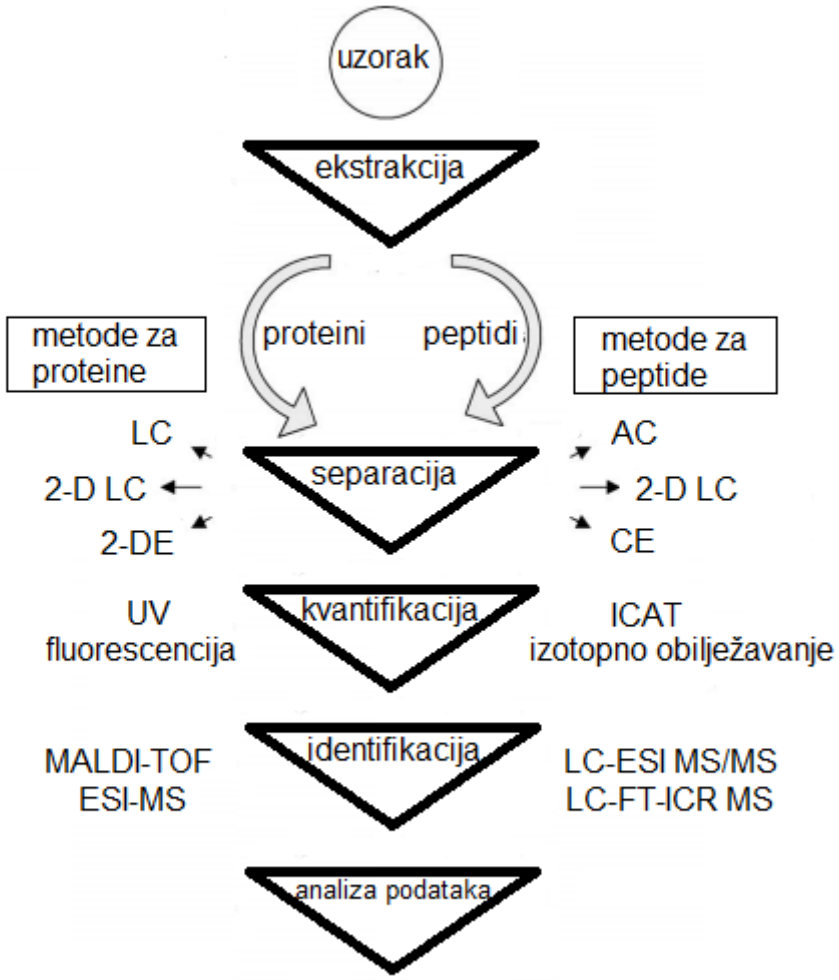
Slika 2. Shematski prikaz razvoja proteinskog tijela u fazama s prikazanim lokacijama pojedinih tipova zeina (gledati s lijeva na desno). Najmanja proteinska tijela sadržavaju samo *γ*-zeine i *β*-zeine. Tijekom daljnjih faza sinteze *α*-zeini i *δ*-zeini penetriraju u agregate *γ*-zeina i *β*-zeina (prilagođeno iz: Holding i Larkins, 2006).

Razne mutacije u genima koji kodiraju zeine za rezultat imaju promjenu u tvrdoći endosperma zrna, ali omogućavaju i uvid u mehanizme regulacije ove važne karakteristike zrna kukuruza. Takozvani o2 mutanti mutacijom u *OPAQUE 2* genu, koji kodira za aktivator transkripcije 22 kDa *α*-zeina, imaju reduciranu sintezu 22 kDa *α*-zeina ali i 19 kDa *α*-zeina, što rezultira zrnima kukuruza sa smanjenom tvrdoćom zbog sinteze manjih proteinskih tijela s reduciranom jezgrom (Holding i Larkins, 2009). Novija generacija o2 mutanata, takozvani QPM (engl. *Quality Protein Maize*) kukuruz, ima 2 do 3 puta povećanu sintezu 27 kDa *γ*-zeina, što za rezultat ima obnovu tvrdoće endosperma koja je kod o2 mutanata bila narušena (Lopez i Larkins, 1991; Wu i sur., 2010). Druga skupina mutanata su fl2 (engl. *floury 2*) mutanti koji sintetiziraju abnormalne 22 kDa *α*-zeine koji stvaraju nefunkcionalna proteinska tijela. Još je nekoliko poznatih mutanata kao što su: De-B30 (engl. *defective endosperm B30*) s nefunkcionalnim 19 kDa *α*-zeinom, Mc (engl. *Mucorate*) s nefunkcionalnim 16 kDa *γ*-zeinom i drugi tipovi mutanata (Holding i Larkins, 2009).

2.6. Proteomika

Proteomika je znanstvena disciplina čiji je naziv oblikovan nedavne 1995. godine, a proučava građu proteina i funkcionalnost istih unutar stanice, tkiva ili organizama (Graves i Haystead, 2002). Kao grana biologije koja se bavi proučavanjem proteoma, ona spoznaje strukturu i funkciju proteina kroz karakterizaciju i kvantifikaciju ukupnog komplementa proteina kodiranih s genoma u proučavanim ciklusima života stanice, tkiva ili organizma (Butorac, 2015). Prva istraživanja unutar proteomike bila su primarno usmjerena prema razvijanju proteinskih baza podataka. No proteomika obuhvaća profiliranje proteinske ekspresije, identifikaciju proteina i njihovih modifikacija, protein-protein interakcije, funkcionalne karakteristike i strukture individualnih proteina, kao i mogućih kompleksa u kojima se oni nalaze. Analiza proteoma je u mnogočemu složenija od analize genoma. Dok je genom stanice nepromjenjiv te gotovo identičan za sve tipove stanica određenog organizma, proteom je visoko kompleksan i promjenjiv te se za sada ne može definirati fiksni proteom za određeni tip stanice, tkiva ili organizam. Fiziološko stanje stanice, tkiva ili organizma utječe na tip proteina, njihovu ekspresiju, modifikacije, subcelularne lokacije (Aebersold i Goodlett, 2001; Graves i Haystead, 2002). Na sintezu proteina stanice uvelike utječu i vanjski faktori kao što su: neposredno stanično okruženje, nutritivni status, temperatura, lijekovi te drugi faktori (Naverova i Eyk, 2005). Različiti proteomi stanica tako mogu sadržavati i više tisuća, pa čak i više desetaka tisuća različitih proteina s dinamičkim veličinama ekspresije u minimalno pet redova veličine (Aebersold i Goodlett, 2001).

Općenito analiza proteina i peptida obuhvaća nekoliko osnovnih koraka: priprema uzorka, separacija proteina ili peptida, njihova identifikacija te analiza podataka i interpretacija rezultata (slika 3.). Priprema uzorka predstavlja prvi korak u analizi proteina i njene karakteristike uvelike utječu na krajnji rezultat analize. Ona obuhvaća ekstrakciju iz bioloških uzoraka, odvajanje od matriksa i koncentriranje proteina. Metode koje se najčešće koriste u ovom koraku su: precipitacija, ekstrakcija na čvrstoj fazi, imunoprecipitacija te ultrafiltracija (Horvatić i Cindrić, 2008). Multidimenzionalne metode separacije općenito imaju prioritet nad jednodimenzionalnim metodama zbog superiornije mogućnosti razdvajanja proteina (Neverova i Eyk, 2005). Najčešće korištene tehnike u identifikaciji i analizi proteina i peptida uključuju korištenje spektrometrije masa (MS), bilo u kontinuiranim (engl. *on-line*), bilo u diskontinuiranim (engl. *off-line*) tehnikama rada.



Slika 3. Shema prikaza tehnologija u proteomici gdje se pri svakom koraku analize proteina i peptida primjenjuje određena separacijska ili identifikacijska tehnika. Objašnjenje kratica: AC – afinitetna kromatografija; LC – tekućinska kromatografija; 2-D LC – dvodimenzionalna tekućinska kromatografija; 2-DE – dvodimezionalna gel elektroforeza; CE – kapilarna elektroforeza; ICAT – obilježavanje stabilnim izotopima (kemijsko obilježavanje); MS – spektrometrija masa; LC-ESI MS/MS – kontinuirani sustav tekućinske kromatografije, ionizacije elektroraspršivanjem i tandemne spektrometrije masa; LC-FT-ICR – kontinuirani sustav tekućinske kromatografije i analizatora ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju; MALDI-TOF MS – matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta iona - spektrometrija masa (prilagođeno iz: Neverova i Eyk, 2005).

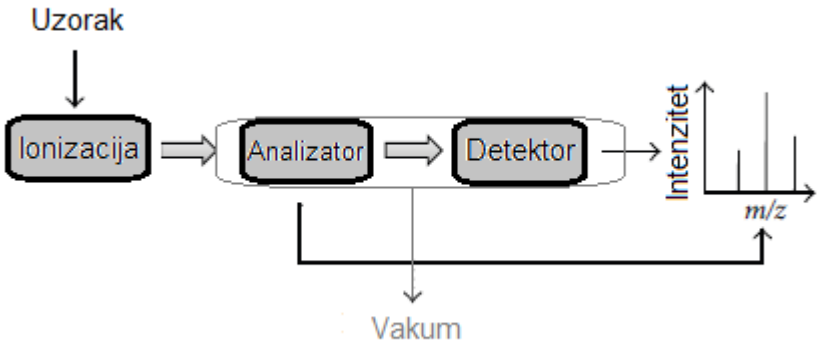
Dva su osnovna pristupa u analizama proteina i peptida. Odozdo nadolje pristup (engl. *top-down*) predstavlja analizu primarnog slijeda aminokiselina i posttranslacijskih modifikacija intaktnog proteina unutar instrumenta. Ovaj princip zahtijeva točno mjerenje

masa i često su takve metode podložne gubitku informacija o strukturi proteina. Određivanje mase cijelog proteina u takvom je rangu veličina da će promjene u proteinu koje rezultiraju u maloj promjeni ukupne mase proteina moguće ući u područje greške metode i ostati će nedektirane. Naime MS detekcija je u pravilu uspješnija za manje molekule negoli za veće. Drugi raširenij pristup analize proteina je odozdo nagore (engl. *bottom-up*). On označava enzimsku ili kemijsku razgradnju proteina na manje peptidne fragmente ili peptide (bilo u gelu, bilo u otopini) te naknadnu detekciju nekom od MS tehnika. Dobivene mase pojedinačnih fragmenata zatim se uspoređuju s fragmentima dobivenim *in silico* za predmetni protein. Podaci dobiveni odozdo nagore pristupom mogu dati uvid u strukturu proteina i mogućih posttranslacijskih modifikacija. Isto tako, odozdo nagore princip s prvim korakom digestije proteina te drugim korakom analize MS primarni je princip identifikacije proteina i poznat je pod engleskim akronimom *peptide mass fingerprinting*, PMF (Neverova i Eyk, 2005; Galić i Cindrić, 2008) te se koristi u takozvanoj *shotgun* proteomici (Shi i sur., 2004).

Baze podataka proteinskih sekvenci zauzimaju važan dio u analizama proteina i peptida. Razvoj baza podataka, zajedno s razvojem MS tehnika te razvojem programa za pretragu peptidnih sekvenci unutar baza podataka izrazito je unaprijedio analizu proteina i peptida te samu proteomiku.

2.6.1. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (MS, engl. *mass spectrometry*) jedna je od primarnih analitičkih metoda za identifikaciju i kvantifikaciju proteina i peptida. MS je metoda kojom se nakon ionizacije kvalitativno i kvantitativno analiziraju nastali ioni (Horvatić i Cindrić, 2008) uz pomoć spektrometra masa. Spektrometri masa rade na principu pretvaranja molekula analita u ionizirano (nabijeno) stanje, nakon čega slijede separacija nastalih iona i fragmenata koji su nastali ionizacijom na temelju odnosa njihove mase i naboja (*m/z,* engl. *mass to charge ratio*) te detekcija broja iona i fragmenata pri svakoj izmjerenoj *m/z* (Figeys, 2005; Pitt, 2009). Tako su osnovne komponente svakog spektrometra masa (slika 4): ionski izvor, analizator masa koji mjeri i separira m/z ioniziranog analita te sustav za detekciju (Aebersold i Mann, 2003). S obzirom na to da su nastali ioni izrazito reaktivni i kratkoga života, dijelovi instrumenta poput ionske optike (za transfer iona unutar instrumenta), analizatora i detektora nalaze se pod visokim vakuumom (Banerjee i Mazundar, 2012). Postoji nekoliko različitih tehnika ionizacije i analizatora iona koji se koriste, a njihovim kombiniranjem dobivamo različite izvedbe spektometara masa (tzv. hibridni spektrometri masa).



Slika 4. Shema MS instrumenta s osnovnim funkcionalnim dijelovima (izvor ionizacije, analizator i detektor) (prilagođeno iz: Banerjee i Mazumdar, 2012).

Revolucionarna tehnološka otkrića u ionizacijskim tehnikama od kraja osamdesetih godina dvadesetog stoljeća intenzivirala su MS upotrebu u proteomici. Dvije ionizacijske tehnike koje se najčešće koriste za analizu proteina i peptida su: ionizacija elektroraspršivanjem (ESI, engl. *electrospray ionization*) i matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI, engl. *matrix assisted laser desorption/ionization*). Ionizacija peptida vrši se kako bi se ioni preveli u plinsku fazu. Proteini i peptidi su teško hlapive i toplinski nestabilne biološke molekule koje zahtijevaju ionizaciju kako bi prešle u plinovito stanje bez degradacije ili uz minimalnu degradaciju (Yates i sur., 2009). ESI i MALDI se nazivaju tzv. mekim tehnikama ionizacije (engl. *soft ionization methods*) jer rezultiraju minimalnim fragmentiranjem analita, tako da čak i nekovalentne veze u određenim uvjetima rada MS mogu ostati sačuvane (Aebersold i Goodlett, 2001). Tehnikom ESI nastaju i višestruko nabijeni ioni, dok tehnikom MALDI nastaju uglavnom jednostruko nabijeni ioni. Njihova osjetljivost kreće se između femtomola i pikomola te ovisi o prirodi uzorka, načinu priprave i čistoći uzorka (Galić i Cindrić, 2008). MALDI-MS se najčešće koristi za analiziranje jednostavnijih proteinskih/peptidnih smjesa, dok je ESI-MS većinom dio integriranog LC-MS sustava te se koristi za analizu kompleksnih smjesa (Aebersold i Mann, 2003).

Najčešće korišteni analizatori masa u proteomici su: analizator masa koji mjeri vrijeme leta (TOF, engl. *time of flight*), ionska stupica (IT, engl. *ion trap*), kvadrupol (Q, engl. *quadrupole*) i analizator ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju (FT-ICR, engl. *Fourier transform ion cyclotron resonance*). Sva četiri tipa analizatora različiti su u dizajnu i performansama, kao i područjima detekcije. Isto tako izvedbe MS instrumenata su različite, pa imamo instrumente sa zasebnim analizatorima,

ili u nekim slučajevima analizatori mogu stajati zajedno te se onda govori o tandem-MS instrumentima (Aebersold i Mann, 2003).

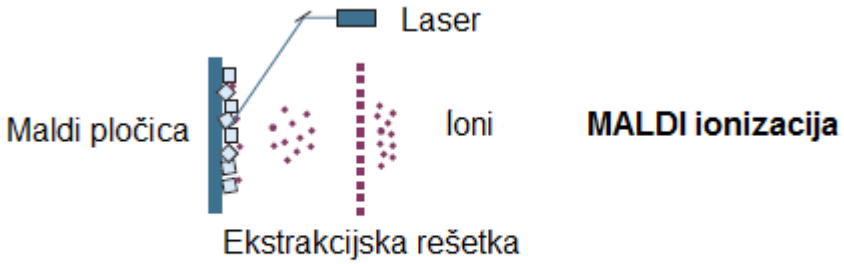
MS omogućava identifikaciju proteina, određivanje aminokiselinskog slijeda, identifikaciju i određivanje položaja poslijetranslacijske modifikacije, određivanje interakcija između proteina i iona metala kao i njihovu stehiometriju, afinitet i konformacijske promjene, određivanje mutacija te provjeru strukture i čistoće proteina dobivenih genetičkim inženjerstvom (Galić i Cindrić, 2008).

2.6.1.1. Tehnike ionizacije

Matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem

Prvu upotrebu MALDI ionizacije (slika 5.) u istraživanju bioloških makromolekula predstavio je Koichi Tanaka 1988. godine. MALDI tehnika ionizacije uključuje upotrebu matrice. Analit se prvo izmiješa s prezasićenom otopinom matrice koja pomaže pri ionizaciji te se nanese na metalnu MALDI ploču. Matrica istovremeno apsorbira energiju lasera te ionizira molekule analita služeći kao donor ili akceptor protona (Horvatić i Cindrić, 2008). Ionizacija analita iz suhe, kristalne matrice odvija se u vakuumu svjetlosnim pulsom lasera (1-10 ns) koji je podešen na valnu duljinu apsorpcije matrice. Brz prijenos energije stvara ionizacijski oblak i prevodi analit iz krutog u plinovito stanje. Nastali ioni analita su pod utjecajem jakog električnog polja (20 – 30 kV), što izaziva akceleraciju nabijenih iona i njihovo usmjeravanje do otvora analizatora masa (Marvin i sur., 2003; Yates i sur., 2009). MALDI spektri su jednostavni za interpretiranje jer primarno rezultiraju s jednostruko nabijenim ionima (Aebersold i Goodlett, 2001). MALDI se najčešće povezuje s analizatorima TOF ili FTIR-ICR (Horvatić i Cindrić, 2008).

Čistoća uzorka važna je u svim MS analizama. Onečišćenja mogu smanjiti ili u potpunosti prigušiti intenzitet iona, grade adukte s ionima analita te tako utječu na osjetljivost instrumenta, ali i točnost ako ioni adukta nisu dovoljno dobro odijeljeni od iona analita (Galić i Cindrić, 2008). Kako MALDI nije kompatibilan s tekućinskim kontinuiranim sustavima, prilikom pročišćavanja uzoraka za MALDI i prije nakapavanja uzoraka na pločicu koristi se separacija mikrokolonama npr. Zip-Tip nastavcima ili separacija LC sustavima s naknadnim nakapavanjem eluata na MALDI pločicu. Zip-Tip nastavci sadržavaju malu masu nepokretne faze širokih pora (npr. C18) na vrhu nastavka. Uzorak se nanese na nastavak i ispire gradijentnim ispiranjem nepokretne faze, što rezultira eluatima analita bez soli.



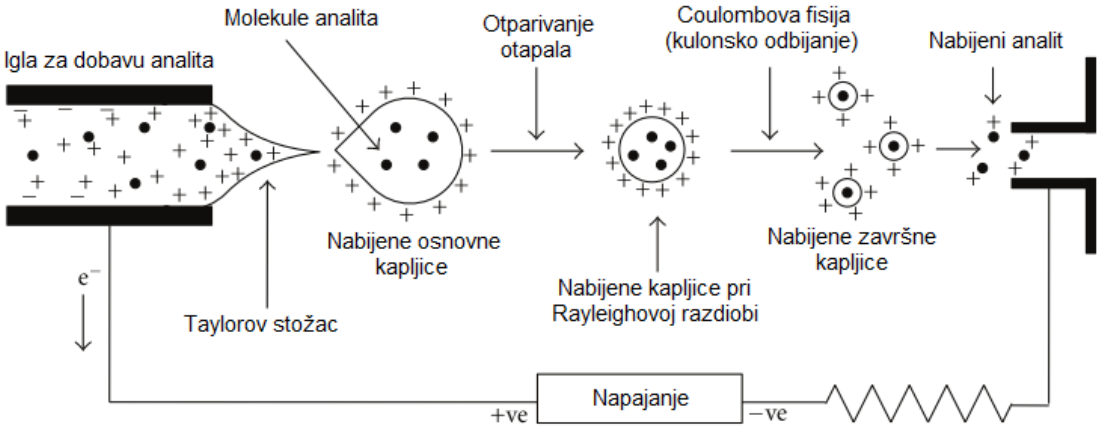
Slika 5. Shema MALDI ionizacije (prilagođeno iz: Aebersold i Mann, 2003).

Ionizacija elektroraspršivanjem

ESI tehniku (slika 6.) predstavio je 1989. godine John B. Fenn. Elektroionizacija je postignuta relativno visokim naponom od 2 – 6 kV pri atmosferskom tlaku, pri čemu se analit ionizira prevođenjem iz tekućine u plinsko stanje. U pozitivnom načinu ionizacije (proton-donor, ponekad metal-donor) ionizacijska igla ima pozitivni potencijal, dok u negativnom (proton-akceptor) ionizacijska igla ima negativni potencijal. Ionizacija analita se vrši između vrha ionizacijske igle za dobavu tekućeg analita i završnog konusa za uzorkovanje iona koji su međusobno udaljeni 1-10 cm u ovisnosti o geometriji ionskog izvora. Jako električno polje usmjerava tekućinu koja formira električno nabijen aerosol u obliku stošca na vrhu igle poznat kao Taylorov stožac. Na vrhu stošca stvaraju se kapljice analita i otapala te nešto uparenog otapala koji putuju u analizator masa. Kolektorska elektroda privlači nabijene kapljice i daje im dodatno ubrzanje. Putem do analizatora masa kapljice otparavaju uslijed struje dušika (plina za sušenje), temperature i električnog potencijala. Plin za sušenje i grijana kapilara utječu na osjetljivost sistema te smanjuju pojavu ionskih nakupina. Nakon što se kapljice toliko smanje da su svi ioni na površini kapljice, uslijed djelovanja sve jačih kulonskih sila kapljice se u potpunosti otparuju ili se razbijaju na manje kapljice. Analit tada desolvira i prelazi u plinsku fazu. Otvor iza kojeg se nalaze visok vakuum i analizator privlači tako formirane ione (Cindrić i sur., 2009; Yates i sur., 2009; Banerjee i Mazundar, 2012). Danas postoje različite izvedenice ESI sustava kao što su: pneumatski potpomognuti elektrosprej, ultrasonični raspršivač, elektrosonični sprej te nanoelektrosprej. Nanoelektrosprej je najčešći jer se može koristiti za izrazito niske koncentracije (nanomol/mL) i niske volumene uzorka. Dok standardni ESI rezultira s početnim kapljicama analita od 1 – 2 μm promjera, nanoelektrosprej stvara

kapljice manje od 200 nm u promjeru tj. stvara kapljice 100 – 1000 puta manjeg volumena (Banerjee i Mazundar, 2012). Kako ESI rezultira učestalijom tvorbom višestruko nabijenih iona pri *m/z* vrijednostima većima od 1000, moguće su i analize intaktnih proteina.

ESI je učestalo korištena tehnika ionizacije i to najčešće u integriranim LC/MS sustavima jer se ovom tehnikom analit prevodi iz tekuće u plinsku fazu pri atmosferskom tlaku. Osim s LC sustavima, ESI je kompatibilna i sa sustavima kapilarne elektroforeze kao što je kapilarna zonska elektroforeza (CZE, engl. *capillary zone electrophoresis*).



Slika 6. Prikaz ionizacije ESI-MS u pozitivnom načinu rada (prilagođeno iz: Banerjee i Mazumdar, 2012).

2.6.1.2. Analizatori masa

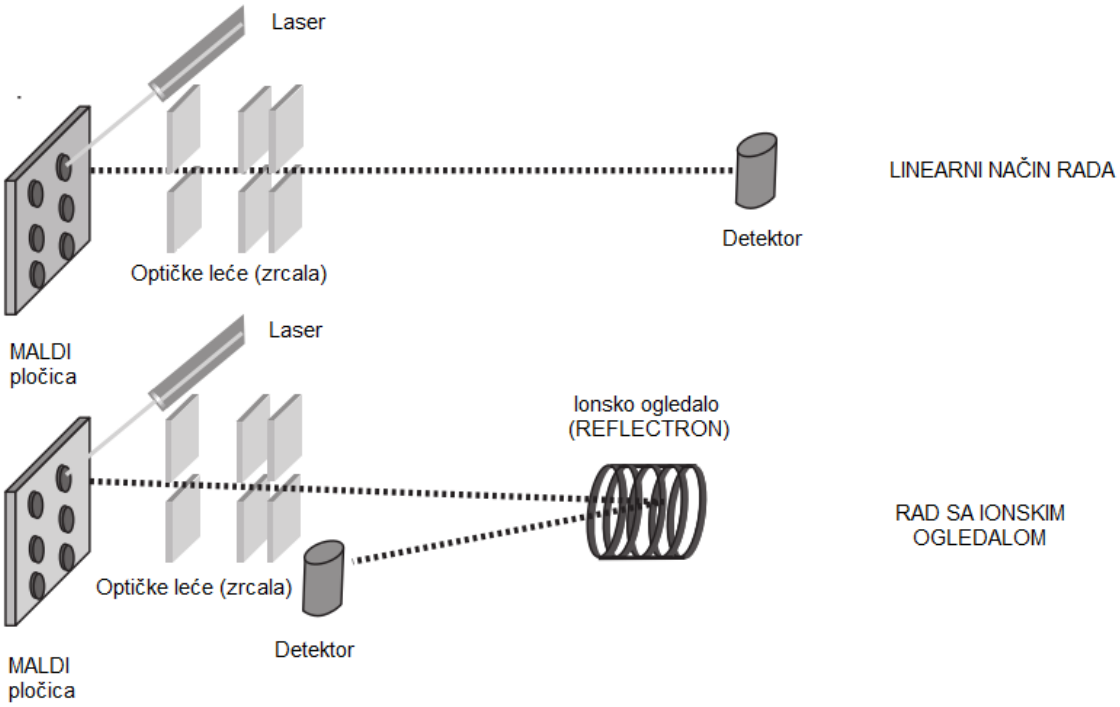
Analizatori masa centralni su dio spektrometra masa, oni su mjesto separacije iona na temelju njihovih *m/z*. Različiti analizatori kompatibilni su s različitim tehnikama ionizacije i s različitim detektorima. Tako su TOF, IT i FT-ICR kompatibilni s MALDI ili pulsnom ionizacijom, dok su kvadrupol (Q) i magnetski/električni sektor analizatori kompatibilni s ESI ili kontinuiranom ionizacijom. Analizatori rade na temelju dva osnovna zakona fizike: Lorentzovu zakonu i Newtonovu drugom zakonu (Banerjee i Mazumdar, 2012).

Analizator vremena leta

Analizator vremena leta razdvaja ione na temelju različite brzine svakog pojedinog iona. Brzina iona ovisi o masi iona. MALDI ionizacijom (slika 7.) nastaju jednostruko nabijeni ioni koji imaju istu kinetičku energiju, ali ne i masu. Zbog različite mase, pri ulazu u TOF analizator ioni imaju i različitu brzinu: manji ioni imaju veću brzinu, a veći manju. Analizator ispušta ione, pri čemu se aktivira detektor. Prilikom leta do detektora ioni lete onom brzinom koju su imali pri ulasku u analizator, a ponekad mogu letjeti i do nekoliko metara prije detekcije. Vakuum u tubi sprečava moguće kolizije između iona te ioni dolaze na detektor u različitim vremenskim intervalima. Vrijeme leta iona je u direktnoj vezi s m/z iona. U pravilu dulje tube TOF analizatora imaju bolju osjetljivost. Tako neki analizatori imaju ugrađeno ionsko ogledalo (engl. *reflectron*) koje omogućava dulji put iona (Figeys 2005; Cindrić i sur., 2009).

Ionska stupica

Ionska stupica posjeduje kombinaciju elektroda za formiranje električnog polja za akumulaciju iona. Pomoću ionskog vodiča u obliku optičkih zrcala kontrolira se ulazak iona u električno polje. Određivanje m/z iona odvija se u dva koraka: u prvom se ioni akumuliraju u električnom polju, a u drugom se propuštaju prema detektoru. Ioni koji su ušli u ionsku stupicu nisu stacionarni, nego se kreću po orbitama. Veličina orbite ovisi o m/z iona. Promjenom radiofrekvencije električnog polja stvara se nestabilnost u orbitama pojedinih iona te oni izlaze iz električnog polja. Ioni koji imaju niže m/z izlaze pri nižim radiofrekvencijama, dok ioni koji imaju više m/z izlaze pri višim frekvencijama. Za kalibraciju vrijednosti radiofrekvencija za izlaz pojedinog iona koriste se analiti s definiranim masama (Figeys, 2005)



Slika 7. MALDI-TOF instrument u dvije različite izvedbe (linearna izvedba i izvedba s ionskim ogledalom) (prilagođeno iz: Figeys, 2005).

Analizator ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju

FT-ICR je u svojoj osnovi također ionska stupica, pri čemu Fourier transformacija sadržava supervodljivi magnet koji stvara jako magnetsko polje za akumulaciju iona. Ioni se unutar polja gibaju po orbitama, dok svaka *m/z* određuje orbitalno ciklotronsku frekvenciju iona. Apliciranjem električnog polja na ciklotronsku frekvenciju iona pobuđuje se njegovo gibanje prema većoj orbiti do ICR orbitalnog promjera. Osnova rada FT-ICR je pobuda iona do ICR orbitalnog promjera, samo nekoliko milimetara manjeg od elektroda za detekciju koje mjere izmjenični napon induciran od strane gibanja iona nakon isključivanja pobude. FT-ICR tako istovremeno predstavlja ionski izvor, analizator masa i detektor (Figeys, 2005; Cindrić i sur., 2009).

Kvadrupol

Prvi analizator korišten u MS analizama proteina bio je trostruki kvadrupol analizator. Kvadrupol se sastoji od četiri elektrode na istim udaljenostima koje zajedno opisuju valjak i stvaraju električno polje. Elektrode su dijagonalno elekrički povezane tako da dvije nasuprotne elektrode imaju pozitivan napon, a druge dvije negativan napon. Parovi elektroda su spojeni i radiofrekventnim potencijalom izmjenične struje. Električno polje tako može biti stalno (stalna struja), izmjenično (izmjenična struja), različitih amplituda i frekvencija. Kombinacije postavki polja rezultiraju time da kvadrupol može istovremeno biti: filter masa (pri različitim kombinacijama stalne struje i radiofrekvencija), vodič iona (korištenje samo radiofrekvencija) ili optički element (korištenje samo stalne struje). Ioni koji ulaze u kvadrupol imaju različite *m/z* i u ovisnosti o primijenjenoj struji i polju mogu zadržati stabilnu putanju i proći analizator ili dotaknuti elektrode te postati neutralne molekule. Trostruki kvadrupol je izvedba analizatora u kojoj su tri kvadrupola jedan za drugim povezani linearno, pri čemu prvi i treći služe kao filteri *m/z* ili vodiči iona, dok je drugi po redu u pravilu samo vodič iona, ali modificiran tako da omogućuje uvođenje plina kako bi se omogućila kolizijom inducirana disocijacija iona. Takva izvedba instrumenta koristi se u tehnikama tandemne spektrometrije za određivanje primarne sekvence peptida (Figeys, 2005; Cindrić i sur., 2009).

2.6.1.3. Detektori

Faradayeva čaša predstavlja najjednostavniji tip detektora. To je vodljiva časa koja prilikom ulaska iona u detektor neutralizira ione, pri čemu se proizvede struja koja se mjeri. Ovaj tip detektora primjenjiv je pri većem ionskom toku. Pri nižem toku, koji je češći, koristi se elektronski multiplikator. Taj tip detektora koristi dinodu, metalnu ili poluvodljivu ploču koja emitira sekundarne elektrone prilikom udarca iona o ploču. Dinoda se nalazi pod visokim naponom (red veličine kV). Sekundarni elektroni se ubrzavaju prema sekundarnoj dinodi koja je pod pozitivnim potencijalom. U više koraka sve je veći broj emitiranih elektrona s konačnom vrijednosti od 10^6. Proizvedena struja se prevodi u signal koji se prevodi u intenzitet detektiran na MS spektru (y-ordinata na spektru). Nekoliko izvedbi elektronskog multiplikatora su: cjevasti elektronski multiplikator (CEM, engl. *channel electron multipliers*), mikrocjevasti ili višecjevaste ploče (MPC, engl. *multichannel*

plates). FT-ICR spektrometar masa nema ugrađen detektor, već analizator služi istovremeno i kao detektor (Banerjee i Mazumdar, 2012).

2.6.2. Identifikacija proteina i kvantifikacija

Najčešće korištena metoda identifikacije i kvantifikacije proteina je metoda otiska prsta (PMF, engl. *peptide mass fingerprinting*) koja uključuje cijepanje proteina specifičnim proteazama ili specifično kemijsko cijepanje, pri čemu se specifični nastali peptidi određuju bilo MALDI-MS ili ESI-MS. Cijepanje s jednom od najčešće korištenih proteaza, tripsinom, rezultira peptidima koji imaju aminokiselinu Arg ili Lys na C-terminalnom kraju peptida. Na N-terminalnom kraju peptida iz triptičkog digesta (osim s prvog peptida) nalazi se aminokiselina koja slijedi iza Arg ili Lys. Takva digestija proteina rezultira točno određenim peptidima s točno određenim m/z. Priprema uzorka za MALDI-MS uključuje diskontinuiranu analizu u kojoj su proteini prvo separirani na 2-D gel elektroforezi, pa zatim izrezani iz gela i pocijepani sa specifičnim proteazama te identificirani. Kod koncepta ESI-MS odozdo nagore prvo se vrši cijepanje proteina, iza kojeg slijedi kromatografsko odjeljivanje te identifikacija. Taj se oblik identifikacije, za razliku od koncepta MALDI-MS odozdo nagore, može raditi kontinuirano. Jedna i druga metoda uključuju usporedbu eksperimentalno određenih masa peptida s teoretski izračunatim masama peptida dobivenih *in silico* cijepanjem proteinskih sekvenci iz baza podataka (SwissProt, NCBI, itd.). Razvijeni su različiti bioinformatički programski programi za usporedbu sekvenci i identifikaciju proteina, a dostupni su na mrežnim stranicama (npr. ProteinProspector, Mascot, GlobaLynx itd). Programi generiraju takozvane pogotke (engl. *score*) koji ukazuju na slaganje ili neslaganje između eksperimentalnih i *in silico* generiranih peptida. S obzirom na jedinstvenost cijepanja specifičnim proteazama, ponekad je dovoljno svega nekoliko točno izmjerenih masa peptida da bi se identificirao protein. Poteškoće koje proizlaze iz PMF identifikacije proteina su: ona zahtijeva da je sekvenca proteina već prisutna u bazi podataka; ponekad je identifikacija homolognih proteina nemoguća ako postoji mala razlika u sekvencama; proteinske izoforme je nemoguće razlikovati ako jedinstvene regije nisu prisutne u peptidnoj masi, postranslacijske modifikacije mogu dati krive rezultate, a ako smjesa proteina nije dobro separirana (tj. ako su prisutna tri ili više proteina u uzorku), identifikacija može izostati. Zato se u analizama proteina sve više koriste tandemne spektrometrije masa u kojima se

dalje fragmentiraju ioni (Aebersold i Goodlett, 2001; Aebersold i Mann, 2003; Galić i Cindrić, 2008).

Fragmentacija peptida

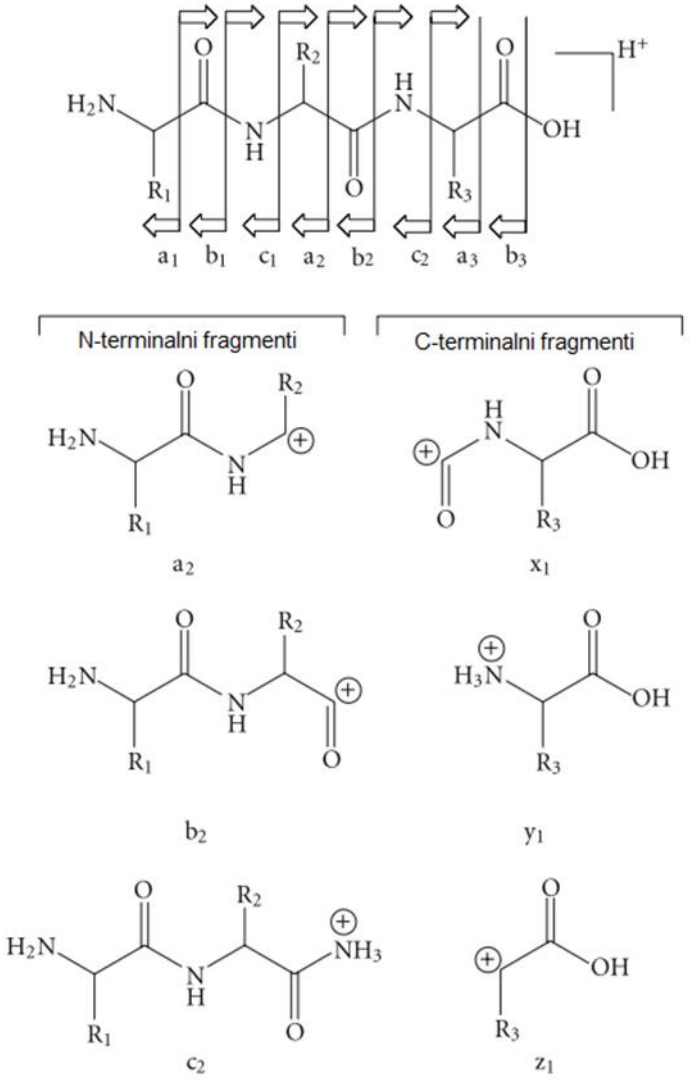
Tandemna spektometrija mase (MS/MS) je tehnika u kojoj se ioni nakon prve MS analize podvrgavaju fragmentaciji te daljnjim MS analizama, čime se dobiva uvid u primarnu strukturu peptida. Fragmentirani ioni mogu se separirati na temelju *m/z* u vremenu ili u prostoru, a izvedba ovisi o uvjetima ionizacije i vrsti instrumenta. Fragmentacija iona prekursora se događa u kolizijskoj ćeliji preko povećanja unutarnje energije iona prekursora. Povećanje energije rezutira homolitičkim i heterolitičkim cijepanjem veza unutar prekursora te novim fragmentiranim ionima. Različiti su načini fragmentacije iona: kolizijom inducirana disocijacija (CID, engl. *collision-induced disociation*), površinski inducirana disocijacija (SID, engl. *surface induced dissociation*), foton inducirana disocijacija (IRMPD, engl. *infrared multiphoton dissociation*), ultraljubičasta fotodisocijacija (UVPD, engl. *ultraviolet photodissociation*), elektronom inducirana disocijacija (EID, engl. *electron-induced dissociation*) i druge. Najčešće upotrebljavana tehnika fragmentacije je CID.

Fragmentni ioni nastali fragmentacijom protoniranog iona prekursora dijele se na ione koji su nastali cijepanjem jedne ili više veza okosnice peptidnog lanca te na ione koji su nastali cijepanjem okosnice peptidnog lanca i bočnog ogranka. Okosnica može biti pocijepana na tri mjesta: C-C, C-N, N-C, čime nastaje šest tipova fragmentiranih iona, ovisno o tome na kojem se terminalnom kraju nalazi pozitivan naboj. Fragmenti koji imaju pozitivan naboj na N-terminalnom kraju su a, b i c. Fragmenti x, y i z imaju pozitivan naboj na C-terminalnom kraju. Indeks pored fragmenta označava broj aminokiselina u fragmentiranom ionu (slika 8.). Razlika u masi između dva redna iona istog tipa omogućava određivanje aminokiseline (Galić i Cindrić, 2008; Banerjee i Mazumdar, 2012).

Identifikacija proteina korištenjem podataka iz MS/MS spektara daje točniju identifikaciju jer osim podataka o molekulskoj masi dobivenoj iz MS spektara producira i informaciju o primarnoj strukturi proteina. Doduše, eksperimentalni MS/MS spektri nisu dovoljno kvalitetni za generiranje "prave" primarne strukture koja je u pravilu generirana *de novo* sekvencioniranjem ili Edmanovom odgradnjom. Eksperimentalno određeni MS/MS spektri se zapravo uspoređuju s podacima već prisutnima u bazama podataka

(NCBI, PDB, SwissProt) uz pomoć različitih bioinformatičkih programa (Mascot, ProteinPospector).

Dva su osnovna pristupa u MS/MS identifikaciji proteina. Prvi pristup generira specifične *tagove* tj. kratke sekvence od tri do četiri aminokiseline iščitane iz spektra. Prilikom pretrage homolognih sekvenca, ako se uzmu u obzir i masa i sekvenca peptida nakon digestije sa specifičnom proteazom, onda pretraga uz pomoć *taga* može dati vrlo dobru specifičnost za određeni protein. Drugi, puno češći pristup, jese usporedba eksperimentalno određenog MS/MS spektra s programski generiranim MS/MS spektrima potencijalne peptidne sekvence (Cottrell, 2011).



Slika 8. Nomenklatura prekursor iona peptidnih fragmenata s najčešćim kvalitativnim strukturama fragmenata (prilagođeno iz: Banerjee i Mazumdar, 2012).

2.6.3. *De novo* analiza proteina

Usporedba eksperimentalnih vrijednosti *m/z* peptida s teoretski izračunatim vrijednostima smještenim u bazi podataka predstavlja jedan od dva načina identifikacije proteina i peptida. Drugi način identifikacije koji se primjenjuje pod akronimom *de novo* analiza proteina obuhvaća određivanje primarnog slijeda aminokiselina u proteinima bez prethodnog saznanja o sekvenci proteina. Unutar područja *de novo* analize proteina najzastupljenije metode su Edmanova odgradnja i *de novo* sekvencioniranje.

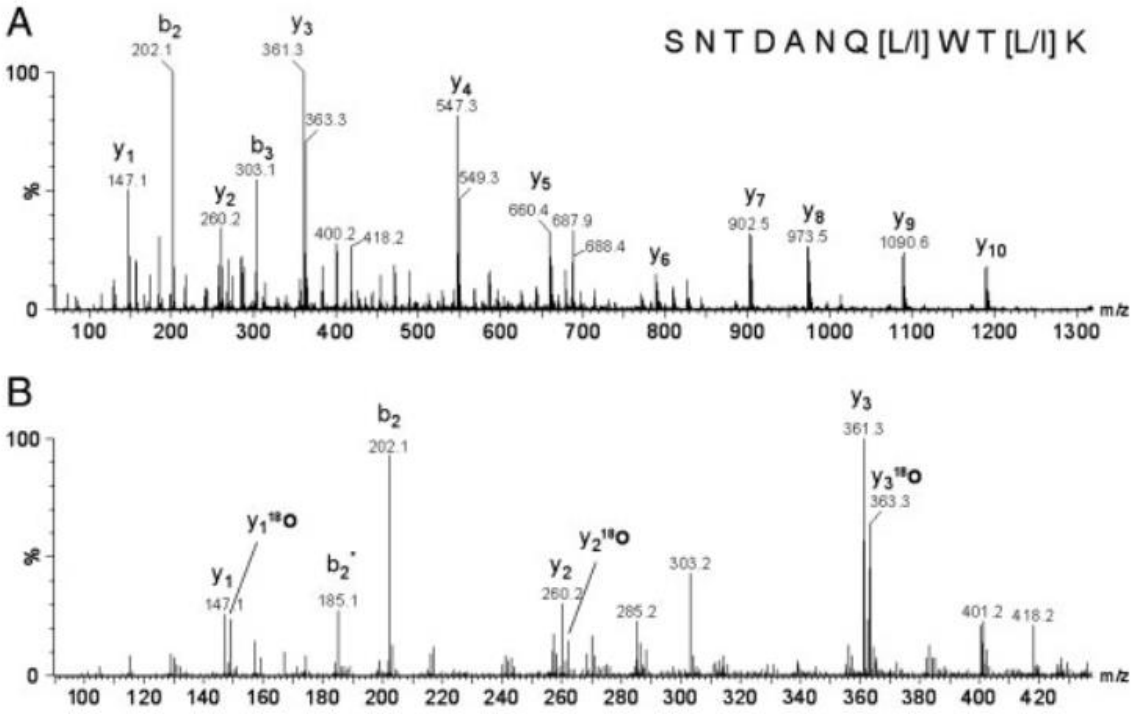
Edmanova odgradnja

Edmanova odgradnja je metoda koja predstavlja stupnjevitu kemijsku degradaciju kraćih peptidnih fragmenta (Aebersold i Goodlett, 2001). Peptidi se kemijski obilježavaju vezanjem fenilizotiocijanata na slobodnu amino-skupinu na N-terminalnom kraju iza kojeg slijedi odcjepljivanje obilježene aminokiseline te njeno određivanje (Edman, 1950). Određivanje aminokiselina najčešće se radi tekućinskom kromatografijom. Odcijepljene aminokiseline određuju se ovisno o vremenu zadržavanja aminokiselina na LC koloni. Razgradnja može ići do preko 20 puta te je tako moguće odrediti slijed amoinokiselina i do preko 20 u nizu.

De novo sekvencioniranje

Određivanje aminokiselinskog slijeda peptida zahtijeva interpretaciju složenih MS/MS spektara. Da bi se olakšala interpretacija, peptidi se prvo kemijski derivatiziraju određenim reagensima. Fragmentacija takvih derivatiziranih peptida daje isključivo ili pretežno jedan tip fragmentiranih iona, čime se znatno olakšava interpretacija MS/MS spektara. Iz razlika masa konsekutivnih iona istog tipa određuje se slijed aminokiselina (Galić i Cindrić, 2008). Najčešće je derivatizacija usmjerena prema N-terminalnom kraju peptida s ciljem povećanja signala fragmentiranih iona s C-terminalnog kraja, y-iona. Modifikacija aminogrupe s N-terminalnog kraja vrši se najčešće pomoću derivata sulfonične kiseline, kao što su 5-formamilbenzen-1,3-disulfonična kiselina (CAF-/CAF+, engl. *chemically activated fragmentation negative/chemically activated fragmentation positive*) ili 4-sulfofenil izotiocijanat (SPITC). Izotopno obilježavanje ^{18}O na C-terminalnom kraju također olakšava interpretaciju spektara. Najčešći način izotopnog obilježavanja je

triptička digestija u $H_2{}^{18}O$, čime se dobivaju ^{18}O obilježeni peptidi na C-terminalnom kraju, a što je vidljivo s porastom +2 Da izotopnih parova y-iona (slika 9.).



Slika 9. *De novo* sekvencioniranje triptičkog peptida djelomično obilježenog s ^{18}O na C-terminalnom kraju (y-ioni obilježeni): (A) cijeli spektar; (B) detaljno prikazana regija manjih masa s vidljivom razlikom između obilježenih y-iona (+ 2 Da pomak izotropnih parova) i neobilježenih b-iona (prilagođeno iz: Seidler i sur., 2010).

Točnost i osjetljivost spektrometara masa znatno ovisi o kvaliteti separacije. Kako su proteini identificirani na temelju m/z njihovih peptida i fragmenata, za točnu identifikaciju potrebna je visoko učinkovita separacija. Isto tako kvalitetna separacija omogućuje detekciju i niže zastupljenih proteina koje u loše separiranim proteinskim smjesama skrivaju signali više zastupljenih proteina (Yates i sur., 2009). Dvije su osnovne separacijske metodologije prisutne u MS. Prva uključuje elektroforetsku separaciju proteina u poliakrilamidnom gelu (engl. *gel based*) a druga tekućinske metode: kromatografijske i elektroforetske (engl. *gel free*). Obje separacijske metode prethode MS analizi (Shi i sur., 2004).

2.6.4. 2-D elektroforeza (2-DE)

Ova dvodimenzijska separacijska tehnika razvijena je 1975. godine u dva zasebna istraživanja (Klose, 1975; O'Farrell, 1975). Prednost 2-D gel elektroforeze je u tome što ona omogućava separaciju, vizualizaciju i kvantifikaciju više tisuća proteina istovremeno. Isto tako ova metoda omogućava analizu intaktnih proteina, njihovu ekspresiju te također izoforme i posttranslacijske modifikacije proteina (Azarkan i sur., 2007). Separacija proteina u 2-D elektroforezi bazirana je na dva fiziološka svojstva proteina: izoelektričnoj točki i molekulskoj masi. Iako je u pravilu redoslijed razdvajanja proteina postignut prvo po izoelektričnoj točki, pa onda po molekulskoj masi, mogući je i obrnuti redoslijed (Nakamura i sur., 1992).

Priprema uzorka

Priprema uzorka za 2-D elektroforezu predstavlja važan korak u dobivanju stabilnog i ponovljivog proteoma. Idealno, priprema uzorka bi trebala biti takva da kvantitativno ekstrahira sve proteine, a da ne naruši nativni oblik istraživanog proteoma, te da eliminira sve biološke molekule koje bi mogle interferirati prilikom analize. Kako je prvi korak 2-D elektroforeze izoelektrično fokusiranje, prilikom ekstrakcije proteina naboj proteina ne bi smio biti promijenjen. Pri tome je najbolje koristiti pristup s minimumom soli, deterdženata i površinski aktivnih tvari (npr. trebalo bi izbjegavati upotrebu nabijenih deterdženata kao što je SDS). Optimalne metode za izolaciju proteina iz stanica stoga su fizikalne metode poput, mehaničkog razbijanja stanica ili razaranja stanica ultrazvučnim valovima (Figeys, 2005). Nakon razaranja stanica, odvajanje staničnih proteina od ukupnog netopljivog staničnog lizata najjednostavnije se radi centrifugiranjem. Za odvajanje nukleinskih kiselina koriste se enzimski protokoli te protokoli koji uključuju trikloroctenu kiselinu ili smjesu fenol:kloroform:izoamilalkohol. Nukleinske kiseline nisu jedine molekule koje interferiraju s proteinima. Polisaharidi s nabojem (ionske interakcije), polifenoli, soli te hidrofobni spojevi još su neki od spojeva koji bi trebali biti eliminirani prije izoelektričnog fokusiranja proteina. Pročišćavanje uzoraka od soli obično se vrši taloženjem proteina, filtriranjem kroz membrane ili pročišćavanjem na čvrstom nosaču. Danas postoje različiti tipovi protokola za ekstrakciju proteina prije izoelektričnog fokusiranja, pri kojima se ne narušava nativno stanje proteina (Figeys, 2005; Rabilloud i Lelong, 2011).

Izoelektrično fokusiranje

Prva izoelektrična fokusiranja su se radila pomoću loše reproducibilnih nosača-amfolita vezanih pH gradijenta. No razvoj komercijalnih gel-traka s gradijentnim pH, takozvanih IPG traka (engl. *immobilized pH gradient*) sredinom osamdesetih godina 20. stoljeća imao je znatan efekt na reproducibilnost 2-DE. Komercijalne IPG trake su najčešće dehidrirani gelovi koji se nalaze između dvije plastične zaštitne trake. Prvi korak izoelektričnog fokusiranja predstavlja rehidratacija trake puferom koji sadrži proteom. Ovaj korak treba osigurati jednoličnu raspodjelu uzorka po traci i reducirati mogućnost taloženja proteina koja su moguća ukoliko je uzorak nejednoliko raspoređen po gelu. Slabo električno polje pospješuje transfer proteina u gel. Nakon hidratacije trake postupno se primjenjuje jače električno polje koje dovodi do pomaka proteina do pH-vrijednosti koja predstavlja izoelektričnu točku proteina (pI). Proteini koji su pozitivno nabijeni (u području gela ispod njihove pI vrijednosti) pomiču se prema katodi dok ne dosegnu svoju pI točku u kojoj više nemaju naboj. Negativno nabijeni proteini kreću se prema anodi do svoje pI točke. Svaki protein tako postaje koncentriran i fokusiran u svojoj pI točki. Prilikom izoelektričnog fokusiranja treba paziti na: voltažu, moguću ionizaciju tiola i izoelektrično taloženje. Ukoliko je uzorak kontaminiran solima, tada pri primjeni visokog napona može doći do neželjenog naglog zagrijavanja sustava. Soli pokazuju veću pokretljivost u električnom polju nego proteini, pa se zato na početku primjenjuje slabi napon (15 V/cm, otprilike 3h) pri kojem soli dosežu svoj pH-položaj u gelu te se onda pokreće jači napon. Ionizacija tiola je problem koji se događa pri bazičnom pH. Tiolna grupa cisteina i fenolna grupa tirozina ioniziraju oko pH 10. Zbog njihovog minimalnog utjecaja pri pH < 8 i njihovih niskih udjela u proteinima, oni u pravilu nemaju utjecaj na pI proteina. No ako se provodi izoelektrično fokusiranje pri pH > 9, onda cisteinske bočne lance treba zaštiti formiranjem disulfida. No ipak je glavni problem izoelektričnog fokusiranja taloženje proteina. U pravilu su proteini najmanje topljivi u pI točki, pogotovo pri niskoj ionskoj jakosti. pI je točka u kojoj nema elektrostatskog odbijanja između molekula proteina čime proteini postaju izrazito osjetljivi na taloženje. To je pogotovo izraženo kod proteina koji imaju nisku topljivost, kao što su membranski proteini koji još uvijek nisu uspješno separirani 2-D elektroforezom (Figeys, 2005; Rabilloud i Lelong, 2011).

Ekvilibracija proteina

Uloga ovog međukoraka između prve i druge dimenzije 2-D elektroforeze je maskiranje naboja proteina SDS-om kako bi oni bili mobilni u drugoj dimenziji. Isto tako se

reduciraju i disulfidni mostovi, nakon čega se slobodne sulfidne skupine alkiliraju kako bi se spriječilo nastajanje disulfidnih mostova tijekom separacije u poliakrilamidnom gelu (Rabilloud i Lelong, 2011).

SDS-elektroforeza *(SDS-PAGE)*

Razdvajanje proteina u drugoj dimenziji temelji se na razlikama u molekulskoj masi proteina, pri čemu manji proteini imaju veću mobilnost te putuju dalje kroz gel. Poliakrilamidni gel za drugu dimenziju u pravilu se priprema prilikom fokusiranja u prvoj dimenziji. Vezanje IPG trake na vrh poliakrialmidnog gela jedan je od najvažnijih koraka u drugoj dimenziji. IPG i poliakrilamidni gel moraju biti u potpunom kontaktu kako bi se omogućio kvantitativni prijenos proteina s IPG trake na gel. Električni napon omogućuje kretanje proteina u gelu (Figeys, 2005).

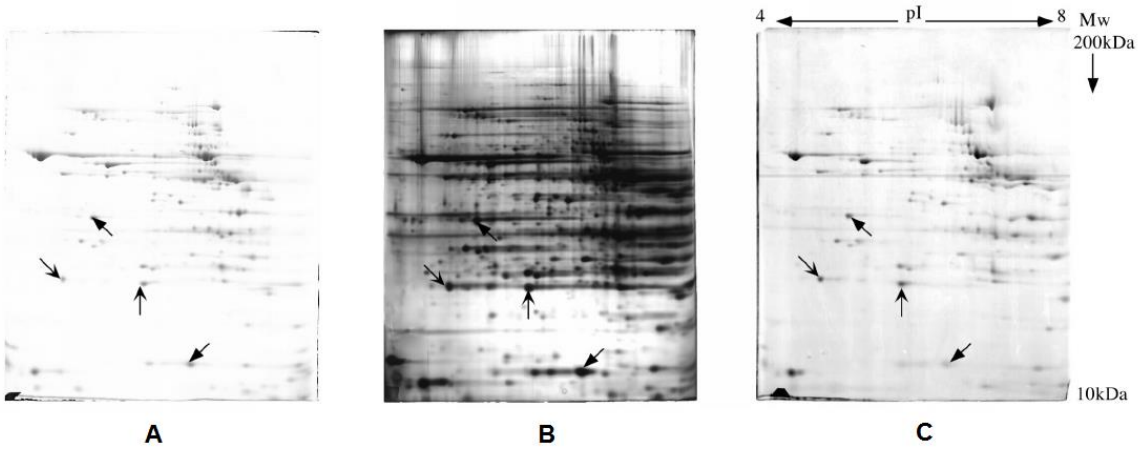
2.6.5. Detekcija proteina

Trenutačno je 2-DE jedina separacijska tehnika u proteomici koja omogućuje međukorak kvalitativne analize proteoma prije MS analize. Samo proteini koji su detektirani na gelu idu dalje na MS analizu, a moguće je odabrati zatamnjenja koja želimo dalje analizirati MS tehnikama, pogotovo ako se rade usporedbe proteoma. Tri su mogućnosti detektiranja proteina na gelu: obilježavanje proteina prije separacije, obilježavanje proteina nakon prve dimenzije te bojanje proteina nakon druge dimenzije. Obilježavanje proteina prije i bojanje nakon 2-D elektroforeze primarni su postupci detekcije proteina.

Obilježavanje proteina prije separacije najčešće se provodi izotopom obilježenim aminokiselinama koje se dodaju u hranjivu podlogu. Tijekom biosinteze proteina obilježene aminokiseline se ugrađuju u proteine. Najčešće korišten obilježivač sadrži ^{35}S-metionin. Drugi uobičajeni pristup je derivatizacija proteina s kovalentno vezanim fluorescentnim bojama koje su neutralne kako ne bi imale utjecaj na pI proteina. Limit detekcije za fluorescentne boje nove generacije je u rangu ng. Nedostatak ove tehnike je potreba za posebnim fluorescentnim sustavom za detekciju i automatiziranim sakupljačem lokacija zatamnjenja za daljnje analize proteina.

Za obilježavanje proteina nakon 2-DE koristi se bojanje: organskim bojama, srebrom ili fluorescentnim bojama (slika 10.). Bojenje organskim bojama je bojanje koloidalnom

commassie bojom. Limit takve detekcije je od 25 do 50 ng. Iako bojanje *commassijem* pokazuje srednji limit detekcije, zbog linearnosti i kompatibilnosti s MS tehnikama bojanje *commassijem* je jedna od najčešće upotrebljavanih tehnika za detekciju proteina. Bojanje srebrom ima značajno niži limit detekcije (5 ng), ali je manje linearno te je kompatibilnost s MS-om puno slabija. Bojanje flourescentnim bojama u pravilu daje bolju osjetljivost nego bojanje *commassijem* i srebrom, no kao i u slučaju obilježavanja fluorescentnim bojama, prije 2-DE zahtijeva specijaliziran sustav za detekciju i procesiranje spotova (Figeys, 2005; Rabilloud i Lelong, 2011).



Slika 10. Tri osnovna tipa obilježavanja gelova nakon 2-D elektroforeze, usporedba osjetljivosti metoda. Prikaz gelova za 400 µg mitohondrijskih proteina s homolognim spotovima označenim s strelicama (prilagođeno prema: Seidler i sur., 2010).

(A) bojanje koloidnom *commasie* bojom;

(B) bojanje srebrom;

(C) bojanje fluorescentnom bojom *Spyro Orange* (detektirano s fluorescentnim laserskim skenerom).

Diferencijalni prikaz gelova

2-DE gelovi mogu imati i do 10 000 separiranih proteina. U slučaju usporedbe proteoma, zatamnjanja proteina (engl. *spots*) od jednog do drugog eksperimenta mogu se malo pomaknuti, ovisno o njihovoj pI točki i molekulskoj masi, posttranslacijskoj

modifikaciji te pripremi i sastavu uzorka. Ti pomaci stvaraju problem prilikom diferencijalne usporedbe više gelova. Upotreba različitih bioinformatičkih programa za slikanje i obradu gelova (npr. Bio-Rad VersaDoc) pomaže u rješavanju problema pomaka i interpretaciji gelova. U pravilu se odabiru takozvani marker spotovi (zatamnjenja) koji se nalaze u svim gelovima te se usporedba ostalih spotova radi u odnosu na marker spotove (Figeys, 2005).

2.6.6. Izolacija proteina iz gela

Nakon 2-D elektroforeze, a prije MS analize separiranih proteina odvija se međukorak izdvajanja proteina iz gela. Dvije su osnovne tehnike izdvajanja proteina: elektrotransfer (engl. *electrotransfer* ili *electroblotting*) i digestija u gelu (engl. *in-gel digestion*).

Elektrotransferom se proteini pod utjecajem električnog polja prenose na vezujuću membranu, kao što je nitroceluloza. Proteini iz gela putuju prema anodi gdje se nalazi vezujuća membrana na koju se onda vežu te se nakon toga obilježavaju i detektiraju. Elektrotransfer se najčešće koristi za imunoblot analize (npr. Western blot), a prikladan je i za analizu Edmanovom odgradnjom.

Digestija u gelu je metoda koja se razvila početkom devedesetih godina dvadesetog stoljeća te je danas primarna metoda za izolaciju proteina iz gelova. Nakon obilježavanja lokacija proteina nekom od tehnika detekcije proteina, proteini se izrežu iz gela i enzimatski cijepaju u izrezanim zatamnjenjima, a dobiveni peptidi se izdvajaju iz gela te pročišćavaju prije MS analize (Figeys, 2005).

3. MATERIJALI I METODE RADA

Kako bi se ispitao utjecaj dodatka inokulanta i mliječne kiseline na fazu fermentacije i stabilnu fazu tijekom siliranja visoko vlažnog zrna kukuruza i samim time njihov utjecaj na razgradnju zeina te *in vitro* razgradivost škroba, protokol je uključivao tri hibrida kukuruza različite caklavosti zrna: Bc 462 (polutvrdunac), Bc 344 (kvalitetni zuban) i Bc 513 pc (kokičar) uzgojena u *split-plot* dizajniranom pokusu. Sjeme za hibride kukuruza ispitivanih u ovom istraživanju dobiveno je od sjemenarske tvrtke Bc Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja d.d., Zagreb. Inokulant Bio-Sil dobiven je od tvrtke Fanon d.o.o., dok je mliječna kiselina kupljena od BioVit d.o.o. zastupnika Sigme-Aldrich za Hrvatsku. Znanstveno istraživanje provedeno je u Zavodu za hranidbu životinja i Zavodu za specijalnu proizvodnju bilja Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Centru za proteomiku i spektrometriju masa Laboratorija za sistemsku biomedicinu Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. Hibridi kukuruza uzgojeni su na testnom polju Maksimir Zavoda za specijalnu proizvodnju bilja. Priprema silaža te dugotrajno siliranje kao i kemijske analize kvalitete silaža odrađene su u Zavodu za hranidbu životinja. Analiza proteoma zeina odrađena je u Centru za proteomiku i spektrometriju masa.

3.1. Poljski pokus

Poljski pokus proveden je na pokušalištu Maksimir Zavoda za specijalnu proizvodnju bilja Agronomskog fakulteta u Zagrebu tijekom vegetacijske sezone 2013. godine. Tlo pokusnog polja je euterično smeđe, praškasto ilovaste teksture (Vidaček i sur., 1994). Takav tip tla pokazuje neutralnu reakciju (pH u 1 M KCl je 6,94), slabo je opskrbljeno humusom (2,0%), ali je dobro opskrbljeno s fiziološki aktivnim fosforom (41,1 mg/100 g tla) i kalijem (25,0 mg/100 g tla). Usjev kukuruza je proizveden u uvjetima intenzivne agrotehnike unutar tropolja ozima pšenica-kukuruz-soja. Osnovna gnojidba obavljena je s 400 kg NPK 7:20:30 ha^{-1} gnojiva, a zatim je obavljena osnovna obrada tla oranjem na dubinu od 30 do 35 cm. U proljeće je primijenjena predsjetvena gnojidba s 100 kg ha^{-1} uree. Predsjetvena priprema tla obavljena je zvrk drljačom nekoliko dana prije sjetve na dubinu od 6 do 9 cm. Sjetva je obavljena strojno sa sijačicama specijaliziranim za sjetvu pokusa kukuruza i to unutar optimalnog roka (22. travnja 2013). Zaštita od

korova provedena je *pre-emergence* herbicidima na bazi atrazina i metolaklora, te *post-emergence* herbicidima na bazi aktivne tvari dikamba. Tijekom vegetacije obavljene su dvije međuredne kultivacije kukuruza u V3- i V5-stadiju rasta uz koje je obavljena prihrana dušikom (175 kg KAN ha^{-1} u svakoj prihrani). Padaline i temperatura tijekom vegetativnog rasta kukuruza prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Srednja temperatura zraka i padaline u Maksimiru tijekom vegetacijske sezone ispitivanih hibrida kukuruza 2013. godine.

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

3.2. Priprema silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

Kukuruz za pripremu silaža visoko vlažnog zrna ubran je ručno u fiziološkoj zrelosti zrna s udjelom suhe tvari od oko 70%. Neposredno prije branja pojedinog hibrida svih pet repeticija uzorkovano je izravno na polju s pet određenih pozicija radi daljnjih fizikalnih analiza, pri čemu je uzeto po 10 klipova na svakoj poziciji. Prilikom branja nisu se uzimali klipovi iz dva rubna reda svake repeticije. Nakon branja, klipovi su se okrunili na eksperimentalnom kombajnu (Wintersteiger, Njemačka) Zavoda za specijalnu proizvodnju bilja. Isti dan nakon branja i krunjenja, ukupna masa zrnja svake pojedine repeticije samljevena je na mlinu čekičaru (Ino Brežice d.o.o.) sa sitom veličine pora od 8 mm. Prije aplikacije pojedinih tretmana napravljena su uzorkovanja s deset nasumičnih pozicija ukupne mase samljevenog zrnja svake repeticije radi određivanja srednje veličine čestica. Samljevena masa svake repeticije podijeljena je na tri jednaka dijela:

- U jedan dio dodana je pripremljena otopina Bio-Sil inokulanta s liofiliziranim kulturama *Lactobacillus plantarum* 8862 i 8866 (DSM, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*) u koncentraciji 300000 CFU/g svježe mase. Primijenjena koncentracija uputstvo je proizvođača inokulanta.
- Drugi dio mase zrnja siliran je bez dodatka inokulanta ili trećeg tretmana, mliječne kiseline.
- U treći dio samljevenog zrnja aplicirana je mliječna kiselina u linearnom rasponu ovisno o predviđenom vremenu uzorkovanja, u koncentracijama od 5 do 15 g/kg ST (5 g/kg ST; 7 g/kg ST; 9 g/kg ST; 11 g/kg ST; 13 g/kg ST; 15 g/kg ST) .

Navedeni tretmani svake repeticije silirani su u vakuum-vrećice (Status, 280 x 360 mm, 25 set, Status d.o.o.) koje su vakumirane na uređaju za vakumiranje i varenje (SmartVac, Status d.o.o.). Vakumiranjem se inhibirala prva aerobna faza siliranja (Weinberg i Muck, 1996). U praksi je poželjno postići što kraću aerobnu fazu. Naime duga aerobna faza ima negativne efekte na kvalitetu silaža jer potiče rast nepoželjnih aerobnih mikroorganizama te gubitak hranjivih tvari (McDonald i sur., 1991). Za svaki hibrid i tretman siliranja i za svaku vremensku točku uzorkovanja pripremljeni su peteroplikati vakumiranih silaža. Silaže su se uzorkovale u periodu godine dana siliranja, točnije 0., 15., 48., 98., 182., 274. i 364. dan (slika 12.). Tijekom siliranja silaže su stajale na sobnoj temperaturi (od 20 do 25 °C).

Nakon uzimanja uzoraka, svi uzorci su pospremljeni i čuvani na -20 °C do kemijskih analiza.

3.3. Instrumentacija i kemikalije za analize

3.3.1. Popis laboratorijske opreme, instrumentacije i potrošnog materijala

- 4800 plus MALDI-TOF/TOF, Applied Biosystems, SAD
- Anaerocult A, Merck Millipore, Njemačka
- analitička vaga AB204-S, Mettler Toledo International, Švicarska
- analitička vaga 1712 MP8, Sartorius, VB
- blok za spaljivanje, 2020 digestor, Tecator, Švedska
- centrifuga Centric 322A, Tehtnica, Slovenija
- centriuga Minispin, Eppenforf, Njemačka
- centrifuga 5415 R, Eppendorf, Njemačka
- Chromafil Xtra PET 20/25, Macherey-Nagel GmbH & Co, Njemačka
- Daisy^{II} inkubator, Ankom Technology, SAD
- Discovery Series PDQuest 7.4.0., Bio-Rad, SAD
- Eppendorf epruvete od 100-2000 µL, Eppendorf, Njemačka
- Erlenmeyerove tikvice 100-1000 mL
- filter-papir, veličina pora 0.45 nm
- filter-papir plava vrpca 391, Munktell&Filtrak GMbH, Njemačka
- kadice za elektroforezu, Life Technologies, SAD
- kivete za spektrofotometar, Eppendorf, Njemačka
- laboratorijska mješalica, New Brunswick Scientific, SAD
- lemilica, Ankom Technology, SAD
- *L*-štapić
- MALDI pločica, Applied Biosystems, SAD
- mikropipete, 0,2-5000 µL, Eppendorf, Njemačka
- mikrovalna pećnica, Electrolux, Švedska
- mlin Cyclotec, Tecator, Švedska
- mlin miničekičar MF 10 s kompaktnom glavom, IKA Werke, Njemačka
- odmjerne tikvice od 10-2000 mL
- Petrijeve zdjelice, plastične i staklene
- pH-metar, Thermo Fisher Scientific, SAD
- pH-metar, Inolab pH 720, WTW, Njemačka
- piknometar
- pinceta

- plastične Falcon epruvete od 15 i 50 mL
- propipeta
- PROTEAN IEF cell, Bio-Rad, SAD
- Protean II XI cell, Bio-Rad, SAD
- Protein Reader, Semgen Ltd., Hrvatska
- R510 *in situ* vrećice, Ankom Technology, SAD
- SAS 9.3., SAS Institute, SAD
- sita veličine pora 2,0; 0,8 te 0,5 mm
- sitotresilica AS 200 basic, Retsch, Njemačka
- spektrofotometar BioPhotometer, Eppendorf, Njemačka
- spektrofotometar Helios gamma UV-VIS, Thermo Electron Corporation, SAD
- staklene epruvete od 3 do 15 mL
- stakleni lijevak
- staklene i plastične čaše
- staklene i plastične menzure
- sustav za destilaciju, Kjeltec™ 2200, Foss Tecator, Švedska
- sustav za pročišćavanje vode, Milipore, SAD
- sušionik UFE 400, Memmert, Njemačka
- štapni homogenizator, Braun, Njemačka
- tehnička vaga JL1502-G/01, Mettler Toledo International, Švicarska
- termomikser, Eppendorf, Njemačka
- Total Starch Assay, K-TSTA, Megazyme International, Irska
- tube za spaljivanje, Foss, Danska
- vakuum-centrifuga Concentrator 5301, Eppendorf, Njemačka
- Versa Doc Imaging System 4000, Bio-Rad, SAD
- vodena kupelj, Nickel Electro, VB
- vodena kupelj WB 22, Memmert, Njemačka
- vodena kupelj G48331, Cole-Parmer, SAD
- vrećica za homogenizaciju (*engl.* stomacher bag), Bag Mixer, Interscience, Francuska
- ZipTip C4 kolone, Millipore, SAD

3.3.2. Popis kemikalija

- aceton, Kemika, Hrvatska
- acetonitril, Merck, Njemačka
- agaroza, Sigma-Aldrich, SAD
- akrilamid, Sigma-Aldrich, SAD
- albumin goveđeg seruma (BSA), Sigma-Aldrich, SAD
- amonijev hidrogenkarbonat (NH4HCO3), Sigma-Aldrich, SAD
- amonijev klorid, Kemika, Hrvatska
- amonijev persulfat (APS), Sigma-Aldrich, SAD
- amonijev sulfat, Kemika, Hrvatska
- bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Hrvatska
- bisakrilamid, Sigma-Aldrich, SAD
- borna kiselina, Kemika, Hrvatska
- n-butanol, Kemika, Hrvatska
- brom-fenol plavo, Sigma-Aldrich, SAD
- 3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-2-hidroksi-1-propansulfonat (CHAPS), Sigma-Aldrich, SAD
- α-cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina (CHCA), Sigma-Aldrich, SAD
- Coomassie brilliant blue R250, Sigma-Aldrich, SAD
- deionizirana voda kvalitete 18.2 mΩ cm i sadržaja ukupnog organskog ugljika < 5 ppb (dH_2O)
- De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) agar, Merck, Njemačka
- dikloran-glicerol 18 (DG 18) selektivni agar, Merck, Njemačka
- ditiotreitol (DTT), Sigma-Aldrich, SAD
- etanol 96 %, Kemika, Hrvatska
- fenol, Sigma-Aldrich, SAD
- *p*-fenilfenol, Sigma-Aldrich, SAD
- fosfatna kiselina, Kemika, Hrvatska
- glicerol, Kemika, Hrvatska
- glicin, Kemika, Hrvatska
- inhibitori proteaza, Roche, Švicarska
- trake za izoelektrično fokusiranje (trake IPG), 17 cm, pH 3-10 NL, Bio-Rad, SAD
- jodoacetamid (IAA), Sigma-Aldrich, SAD
- kalcijev klorid dihidrat, Sigma-Aldrich, SAD

- kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Hrvatska
- kalij-natrij tartarat, Kemika, Hrvatska
- kalijev sulfat, Kemika, Hrvatska
- kloridna kiselina 36,5%, Kemika, Hrvatska
- kloroform/izoamilalkohol, 29:1, Sigma-Aldrich, SAD
- litijev laktat, Sigma-Aldrich, SAD
- β-merkaptoetanol, Sigma-Aldrich, SAD
- metanol, Kemika, Hrvatska
- mineralno ulje, Bio-Rad, SAD
- natrijev cijanoborhidrid, Merck, Njemačka
- 5-formil-1,3-benzendisulfonična kiselina dinatrijeva sol hidrat (CAF-/CAF+ reagens), Institut Ruđer Bošković, Hrvatska
- natrijev dihidrogen fosfat, Kemika, Hrvatska
- natrijev dodecilsulfat (SDS), Sigma-Aldrich, SAD
- natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska
- natrijev karbonat, Kemika, Hrvatska
- natrijev klorid, Kemika, Hrvatska
- natrijev sulfid nonahidrat, Sigma-Aldrich, SAD
- natrijev tetraborat, Kemika, Hrvatska
- N,N,N,N-tetrametiletilendiamin (TEMED), Fluka, Njemačka
- Nesslerov reagens, Kemika, Hrvatska
- magnezijev sulfat heptahidrat, Sigma-Aldrich, SAD
- octena kiselina min. 99,5%, Kemika, Hrvatska
- pepton, Sigma-Aldrich, SAD
- Plate count agar (PCA), Merck, Njemačka
- Protease inhibitor coctail, Roche, Njemačka
- puferi pH 4 i pH 7, Kemika, Hrvatska
- sulfatna kiselina 96%, Kemika, Hrvatska
- tiourea, Sigma-Aldrich, SAD
- trifluoroctena kiselina (TFA), Merck, Njemačka
- tripsin, Merck, Njemačka
- tris(hidroksimethil)aminometan (Tris), Sigma-Aldrich, SAD
- Tween 80, Merck, Njemačka
- urea, Sigma-Aldrich, SAD

3.4. Fizikalne analize kukuruza

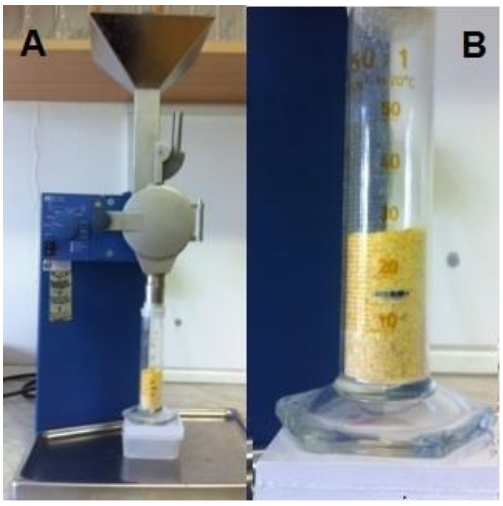
Klipovi kukuruza uzeti za fizikalne analize prosušili su se na 35 °C u sušioniku na skladišnu vlagu od 14%, nakon čega su se ručno okrunili. Dio zrnja svake repeticije pospremljen je u papirnate vrećice za kasnije analize, a dio zrnja se odmah iskoristio za određivanje fizikalnih karakteristika. Za svaki hibrid pripremljeni su uzorci u pet ponavljanja. Repeticija svakog hibrida definirana je na polju. U tako pripremljenim zrnima su određeni dostavna vlaga i prava gustoća zrna (g/mL) te parametri Stenvertove metode određivanja tvrdoće kukuruza.

Dostavna vlaga zrna određena je u skladu s normom *HRN ISO 6496:2001* (Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo, 2001) sušenjem uzoraka zrnja (10 g) u sušioniku na 103 °C kroz 24 sata. Iz odnosa mase uzorka prije i poslije sušenja izračunat je udio dostavne vlage u uzorku (%). Dostavna suha tvar (ST) izračunata je kao razlika između 100% i vrijednosti udjela dostavne vlage u uzorku.

Prava gustoća zrna određena je po metodi definiranoj u Correa i suradnici (2002) uz par modifikacija. Ukupno deset zrna, po šest iz srednjeg dijela klipa i po dva s vrha te dna klipa, u deset ponavljanja za svaku repeticiju uzeti su za određivanje gustoće. Prvo se izvagala masa praznog piknometra, zatim masa piknometra sa zrnima i masa piknometra s etanolom (96%) te na kraju masa piknometra s etanolom i zrnima. Gustoća zrna (g/mL ili g/cm^3) određena je dijeljenjem mase istisnuta etanola i mase zrna uz gustoću etanola definiranu s obzirom na temperaturu u prostoriji.

Stenvertovi parametri tvrdoće zrna određeni su Stenvert-Pomeranzovom metodom (Pomeranz i sur., 1985). U mlinu miničekičaru samljeveno je 20 g uzorka zrna kukuruza na 3600 okretaja u minuti. Mlin je opskrbljen sitom veličine pora 2 mm. Izmjereno je vrijeme potrebno da se samelje onaj volumen uzorka kukuruza koji ispunjava 17 mL menzure volumena 125 mL i promjera 25 mm (slika 11.). Određeni su isto tako i ukupni volumen samljevenog zrna kukuruza (20 g) pomoću ranije definirane menzure te odnos krupnih i sitnih čestica (W_t C/F). Odnos krupnih i sitnih čestica određen je prosijavanjem na sitotresilici sa sitima veličine pora 2,0; 0,8 te 0,5 mm. Iz odvaga čestica većih od 0,7 mm i manjih od 2,0 mm te manjih od 0,5 mm izračunat je omjer krupnih i sitnih čestica.

Srednja geometrijska veličina čestica samljevenog zrnja određena je u uzorcima kukuruza uzetim tijekom pripreme silaža visoko vlažnog zrna kukuruza, odnosno nakon mljevenja zrnja na mlinu čekičaru sa sitom veličine pora 8 mm. Uzorak samljevenog zrnja u peteroplikatu prosijan je na sitotresilici sa sitima veličine pora 2,0; 1,25; 0,6; 0,315; 0,16 mm te je računski određena srednja geometrijska veličina čestica (Baker i Herrman, 1995).

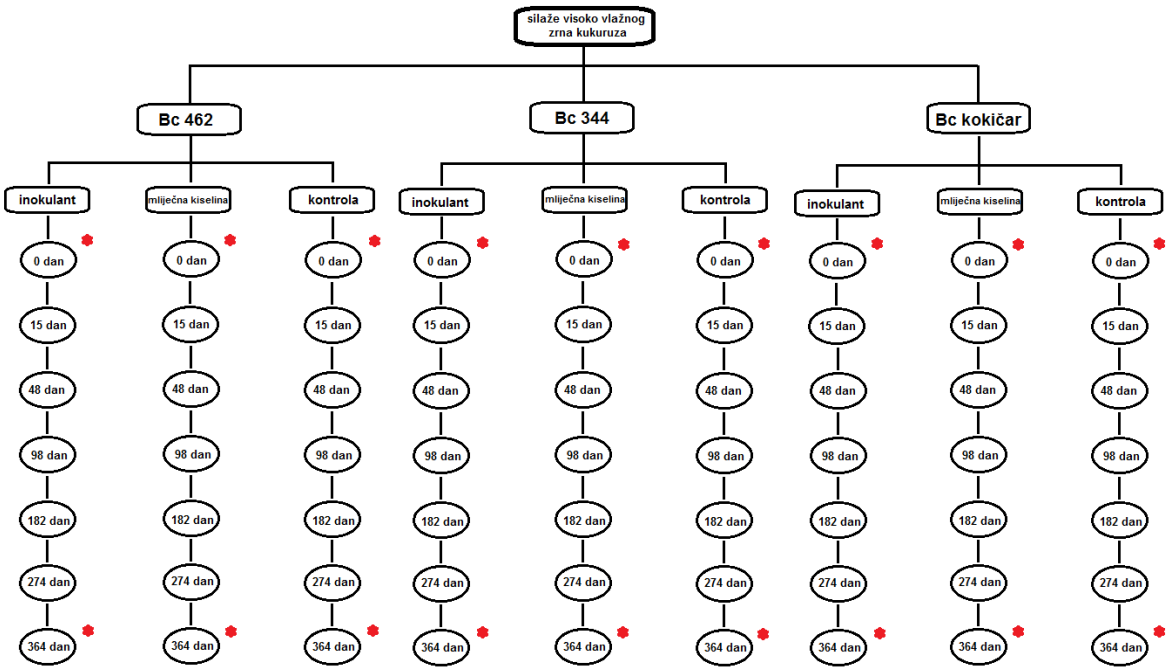


Slika 11. Mlin miničekičar tijekom Stenvert-Pomeranzove metode određivanja tvrdoće zrna:
(A) cijeli mlin s menzurom za određivanje volumena samljevenih zrna;
(B) ukupni volumen samljevenih zrna u menzuri.

3.5. Kemijske analize kvalitete visoko vlažnog zrna kukuruza

Uzorci silaža visoko vlažnog zrna kukuruza (slika 12.) prije kemijskih analiza bili su čuvani na -20 °C, a tri sata prije analiza uzorci su se temperirali na 4 °C. Nakon toga uzorci su podijeljeni na dva jednaka dijela. Jedan dio koristio se za pripremu vodene frakcije silaža te za određivanje dostavne vlage silaža i sirovog proteina, a drugi dio uzorka se prosušio na 35 °C preko noći u sušioniku.

Dio prosušenog uzorka silaža visoko vlažnog zrna kukuruza samljeven je i homogeniziran na mlinu Cyclotec na veličinu čestica ≤ 1 mm. U samljevenim uzorcima silaža određeni su laboratorijska vlaga (%), topljivi protein (% od sirovog proteina), ukupni zeini (% od sirovog proteina) te frakcija zeina, *γ*-zeini i *α*-zeini. Drugi dio prosušenih silaža koristio se za određivanje *in vitro* buražne razgradivosti škroba i suhe tvari te za određivanje sadržaja škroba (g/kg ST). Svaki uzorak analiziran je u duplikatu, osim ukupnih zeina i topljivog proteina koji su analizirani u triplikatu, a kao rezultat uzeta je srednja vrijednost.



Slika 12. Shema ispitivanih silaža visoko vlažnog zrna kukuruza tri različita hibrida (Bc 462, Bc 344 i Bc 513 pc) siliranih trima tipovima dodataka [dva dodatka silaži (inokulant i mliječna kiselina) i kontrolne silaže bez dodataka] s obilježenim periodom siliranja (vremenskim točkama uzrkovanja: 0., 15., 48., 98., 182., 274. i 364. dan). U svakoj vremenskoj točki silaže su uzorkovane u peteroplikatu te su određeni parametri kvalitete silaža. Crvenom zvjezdicom obilježena su uzorkovanja u kojima su dodatno određeni *γ*-zeini i *α*-zeini te razgradivost silaža.

3.5.1. Kemijske analize u prosušenom i samljevenom dijelu uzorka

Laboratorijska vlaga zrna određena je u skladu s normom *HRN ISO 6496:2001* (Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo, 2001) sušenjem uzoraka zrnja (5 g) u sušioniku na 103 °C kroz 4 sata. Iz odnosa mase uzorka prije i poslije sušenja izračunat je udio laboratorijske vlage u uzorku (%). Suha tvar (ST) izračunata je kao razlika između 100% i vrijednosti udjela dostavne vlage u uzorku.

Udio topljivog proteina (TP) određen je metodom prema Hedqvistu i Udenu (2006) uz modifikacije. Oko 1,5 g prosušenog uzorka (paralele tj. triplikati moraju imati što sličnije mase zbog izrazite varijabilnosti) izvagano je u Falcon epruvetu od 50 mL u koju je dodano 40 mL svježe pripremljene otopine za ekstrakciju (boratno-fosfatni pufer, pH 6,75) i nekoliko staklenih kuglica. Uzorci su inkubirani sat vremena na 39 °C u vodenoj kupelji

uz miješanje svakih 15 minuta. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 15 minuta na 4000 rpm te je uzet alikvot uzorka (20 mL) za određivanje ukupnog dušika u ekstraktu. Alikvot je odpipetiran u tubu za spaljivanje te je određen sadržaj dušika i sirovih proteina metodom za određivanje sirovog proteina u uzorku *HRN EN ISO 5983-2:2010* (Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo, 2010). Ukratko, u tubu za spaljivanje uzorka nakon alikvota uzorka dodano je je oko 4 g katalizatora, smjese bakrovog sulfata pentahidrata („modre galice“) i kalijevog sulfata te 10 mL koncentrirane sulfatne kiseline. Tube s uzorcima zatim su stavljene u blok za spaljivanje uzoraka na 420 °C kako bi se razgradila organska tvar i omogućio sljedeći korak analize. Razgrađeni uzorak destiliran je u automatskom sistemu Kjeltec™ 2200 uz dodatak 35%-tne otopine natrijeve lužine. Oslobođeni amonijak sakupljen je u 4%-tnu otopinu borne kiseline. Otopina borne kiseline sadržavala je dodatak indikatora metil-crveno i brom-krezol-zeleno kako bi se detektirala promjena pH prilikom titracije s HCl. Sakupljeni destilat titriran je s 0,1 mol/L otopinom kloridne kiseline te je na temelju utroška kiseline izračunat sadržaj dušika, a množenjem sadržaja dušika s faktorom 6,25 dobiven je sadržaj topljivog proteina uz korekciju za uzete volumene tijekom analitičkog postupka. Dijeljenjem dobivenog sadržaja topljivog proteina sa sirovim proteinom (SP) izračunat je udio topljivog proteina u uzorku (% od SP).

Ukupni zeini određeni su ekstrakcijom zeina otopinom za ekstrakciju zeina iz uzorka silaže (Wallace i sur., 1990), nakon čega je u alikvotu ekstrakta određen sadržaj dušika i proteina metodom za određivanje sirovog proteina u uzorku *HRN EN ISO 5983-2:2010* (Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo, 2010), slično kao i u određivanju topljivog proteina. 0,1 g uzorka u triplikatu izvagano je u Eppendorf epruvetu u koju je dodano 1 mL pufera za ekstrakciju [0,0125 mol/L natrijeva tetraborata, 1% natrijevog dodecil-sulfata (SDS) i 2% β-merkaptoetanola] te su uzorci stavljeni na miješanje 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon miješanja, uzorci su centrifugirani 30 minuta na 4500 rpm te je uzet alikvot uzorka od 900 µL i stavljen u staklenu epruvetu (15 mL) na 4 °C. Ekstrakcija je ponavljana na isti način još dva puta. Sakupljeni alikvoti spojeni su te im je dodano 8,1 mL etanola (96%), tako da udio etanola u smjesi bude 70%. Ta koncentracija etanola otapa zeine (Holding i Larkins, 2006) dok se neprolaminski proteini istalože. Uzorci su zatim centrifugirani kako bi se odijelile zeinska i nezeinska frakcija proteina (15 min pri 4000 rpm). Alikvot zeinske frakcije (8 mL) odpipetiran je u tubu za spaljivanje i uparen na 60 °C na bloku za spaljivanje. Nakon toga je zeinski talog spaljen i destiliran istim postupkom koji je korišten za određivanje topljivih proteina. Na temelju utroška kloridne kiseline izračunat je sadržaj dušika u ekstraktu zeina, a množenjem sadržaja dušika s faktorom 6,25 dobiven je sadržaj zeina uz korekciju za uzete volumene tijekom analitičkog postupka. Dijeljenjem sadržaja zeina (g/kg ST) sa sirovim proteinom (g/kg ST) izračunat je udio zeina u silaži visoko vlažnog zrna kukuruza (% od SP).

3.5.2. Kemijske analize u svježem uzorku silaža

Nakon odmrzavanja i temperiranja uzorka silaža visoko vlažnog zrna kukuruza (4 °C) u svježem uzorku, određeni su dostavna vlaga i sirovi protein.

Dostavna vlaga silaža određena je identičnim postupkom kao i dostavna vlaga zrna kukuruza, u skladu s normom *HRN ISO 6496:2001* (Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo, 2001). Sam postupak opisan je ranije kod određivanja dostavne vlage zrna kukuruza (v. točka 3.4. Fizikalne analize kukuruza).

Sirovi protein (SP) u svježem uzorku određen je metodom po Kjeldahl-u prema *HRN EN ISO 5983-2:2010* (Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo, 2010). Uzorak silaže zrna (3 g) spaljen je u bloku za spaljivanje na 420 °C uz dodatak koncentrirane sumporne kiseline (15 mL) i katalizatora – smjese bakrovog sulfata pentahidrata i kalijevog sulfata (8 g). Nakon razgradnje, uzorak je destiliran na automatskom sistemu za destilaciju Kjeltec™ 2200 uz dodatak 35%-tne otopine natrijeve lužine. Oslobođeni amonijak sakupljen je u 4%-tnu otopinu borne kiseline s indikatorima. Sakupljeni destilat titriran je s 0,1 mol/L otopinom kloridne kiseline te je na temelju utroška kiseline izračunat sadržaj dušika, a množenjem sadržaja dušika s faktorom 6,25 dobiven je sadržaj SP.

3.5.3. Kemijske analize vodenog ekstrakta silaža

Za pripremu vodene frakcije silaža (Nishino i Uchida, 1999) odvagano je oko 20 g svježe mase silaža nakon temperiranja na 4 °C i homogenizirano u 200 mL destilirane vode štapnim homogenizatorom. Homogenizirani uzorak stajao je 12 sati na 4 °C. Nakon stajanja, uzorak je profiltriran preko običnog filter-papira, a zatim preko plave vrpce (filter-papir finih pora 2 - 3 µm, klasifikacije 391) kako bi se uklonile koloidne čestice koje ometaju detekciju amonijaka i mliječne kiseline.

Vrijednost pH određena je na digitalnom pH-metru u filtratu uzorka nakon filtracije. Prije očitanja pH-vrijednosti filtrata uzorka, pH-metar je baždaren u dvije točke s dva standardizirana pufera pH 7 i pH 4.

Titracijska kiselost (TK) izmjerena je u filtratima uzorka nakon plave vrpce po metodi definiranoj kod Warda (2000). Alikvot filtriranog uzorka (30 mL) titriran je s 0,1 M NaOH do pH 6,5.

Mliječna kiselina (MK) određena je spektrofotometrijskom metodom definiranoj u radu Madrida i sur. (1999). Filtrat uzorka nakon filtracije na plavoj vrpci dodatno je

profiltriran preko filtera Chromafil xtra PET. Alikvot takvog filtrata uzorka (alikvot varira od 10 µL do 500 µL ovisno o pretpostavljenom sadržaju mliječne kiseline u uzorku) odpipetiran je u Falcon epruvetu (50 mL). Otopine standarda (litijev laktat, 0,04%-tna otopina) u linearnom porastu koncentracija od 8 do 32 µg/mL s porastom od 4 µg/mL između točaka odpipetirane su također u Falcon epruvetu. Uzorcima i standardima dodano je 6 mL koncentrirane sulfatne kiseline te su inkubirani u parnoj vodenoj kupelji (95 do 100 °C) 10 minuta. Nakon hlađenja, u uzorke i standarde dodani su reagensi za razvijanje boje i detekciju mliječne kiseline (4%-tna otopina bakrovog sulfata pentahidrata u dH_2O; 1,5%-tna otopina *p*-fenilfenola u 95%-tnom etanolu). Nakon razvitka boje (za oko 30 min), otopinama uzorka i standarda izmjerena je apsorbancija pri 570 nm na spektrofotometru te je kvantitativno određen udio mliječne kiseline u uzorcima (g/kg) u ovisnosti o baždarnom dijagramu otopina standarda i pripadajućih apsorbancija.

Udio amonijaka (NH_3) u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza određen je modifikacijom metode za određivanje amonijaka u otpadnim vodama, takozvanom metodom po Nessleru (Merck, 1974). Alikvot uzorka (50 mL) odpipetiran je u tubu za destilaciju (spaljivanje) te je destiliran na automatskom sistemu Kjeltec^{TM}2200 uz dodatak 35%-tne otopine natrijeve lužine. Destilat je skupljen u 4%-tnu otopinu borne kiseline bez indikatora te je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 200 mL i nadopunjen do oznake. Paralelno s uzorcima napravljena je i destilacija otopine standarda (0,1%-tni amonijev klorid) u linearnim povećanjima koncentracije standarda od 6 do 11 µg/mL. Alikvot otopine uzoraka (10 mL za 0 dan; 2,5 mL za sva ostala uzorkovanja) i standarda odpipetiran je u Falcon epruvete (50 mL) u koje su dodani reagensi za detekciju amonijaka (Nesslerov reagens i kalij-natrij tartarat) te su ostavljene na sobnoj temperaturi 10 min kako bi se razvila boja. Apsorbancije otopina uzoraka i standarda izmjerene su na spektrofotometru pri 425 nm. Koncentracija amonijaka u uzorku izračunata je pomoću baždarnog dijagrama. Dijeljenjem sadržaja amonijaka (g/kg ST) sa sirovim proteinom (g/kg ST) izračunat je udio amonijaka (% od SP).

3.6. Analiza buražne *in vitro* razgradivosti suhe tvari i škroba silaže

Prije određivanja *in vitro* razgradivosti suhe tvari i škroba, u silažama je određen sadržaj škroba prema metodi AOAC 996.11 (AOAC, 2003) upotrebom kita (Total Starch Assay, K-TSTA). Djelovanjem enzima *α*-amilaza i amiloglukozidaza škrob je hidroliziran do glukoze koja se uz pomoć GOPOD reagensa (engl. *glucose determination reagent*;

priprema prema uputstvima proizvođača iz smjesa kemikalija i enzima dostavljenih u kitu) kvantificirala spektrofotometrijski. Uz usporedbu sa standardima škroba i glukoze priloženima uz kit izračunata je koncentracija škroba u uzorku (g/kg).

Tablica 3. Sastav pufera za inkubaciju prilikom određivanja razgradivosti suhe tvari i škroba.

Puferi	g/L
Pufer A	
KH_2PO_4	10
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,5
NaCl	0,5
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,1
Urea	0,5
Pufer B	
Na_2CO_3	15,0
$Na_2S \times 9H_2O$	1,0

Za određivanje *in vitro* razgradivosti suhe tvari i škroba silaže koristila se takozvana makrometoda *in vitro* probavljivosti (Ferreira i Mertens, 2005). Uzorci silaža visoko vlažnog zrna kukuruza prije mjerenja *in vitro* razgradivosti nisu dodatno samljeveni. Korištene su meljave uzoraka definirane prilikom pripreme visoko vlažnog zrna kukuruza. 0,7 g uzorka pojedinog hibrida i tretmana siliranja izvagalo se u peteroplikatu (iste replikacije koje su definirane pri uzgoju kukuruza u poljskom pokusu) u R510 vrećice (50 µm veličina pora) za *in situ* mjerenje razgradivosti koje su zatim zalemljene na lemilici. Vrećice su nakon vaganja i pripreme inkubirane u Daisy^{II} inkubatoru na 39 °C u nekoliko vremenskih perioda: 0, 7, 12, 24, 32 i 48 sati. Sve repeticije svih hibrida i tretmana inkubirane su u istom vremenskom periodu (npr. svi uzorci inkubirani 7 sati, a zatim u drugom navratu svi uzorci inkubirani 12 sati, itd.). Daisy^{II} inkubator ima ukupno četiri inkubacijske posude, tako da je po posudi inkubirano 25 vrećica. Prije svake inkubacije pripremljena je otopina za inkubaciju koja je sadržavala buražni sok triju krava u suhostaju te kombinaciju otopina pufera A i B za održavanje stabilnog pH prilikom inkubacije (Goering i Van Soest, 1970). Sastav otopine pufera naveden u tablici 3., pripremljen je po uputama proizvođača Daisy^{II} inkubatora. Za svaku inkubacijsku posudu pripremljeno je 1600 mL otopine pufera, pri čemu omjer A i B pufera mora biti 5 : 1, a pH otopine pufera 6,8.



Slika 13. Uzimanje buražnog sadržaja sondom.

Prije dodavanja buražnog soka u otopinu za inkubaciju otopina pufera A i B inkubirana je par sati na 39 °C. Buražni sok uzet je sondom za izuzimanje buražnog soka iz tri mliječne krave u suhostaju (slika 13.) koje su hranjene na kukuruznoj silaži, dok je sastav obroka naveden u tablici 4. Buražni sok svih triju krava spojen je i homogeniziran te filtriran kroz četiri sloja gaze. Filtracija se odvijala pod strujom ugljikovog dioksida kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. 800 mL buražnog soka dodano je u svaku posudu za inkubaciju u koju su zatim dodane i vrećice za inkubaciju. Svaki korak manipulacije buražnim sokom bio je pod strujom ugljikovog dioksida. Nakon definiranog perioda inkubacije vrećice su isprane u ledenoj vodi kako bi se isprali ostaci bakterija s vrećica. Vrećice su uvijek isprane u četiri navrata s ledenom vodom. Nakon ispiranja vrećice su prosušene 48 sati na 40 °C i izvagane. Razlika u masi vrećica prije inkubacije i nakon inkubacije dala je postotak razgradive suhe tvari u određenom vremenu inkubacije (1).

$$Ragradivost = \frac{m\,(prije\ inkubacije) - m\,(poslije\ inkubacije)}{m(prije\ inkubacije)} x100 \quad (3)$$

Razgradivost škroba određena je tako da se odredio škrob u vrećici svakog uzorka prije inkubacije i nakon inkubacije, te je kao i za suhu tvar postotak razgrađenog škroba prilikom inkubacije u određenom vremenu određen iz razlike masa škroba prije i poslije inkubacije. Nakon što je dobiven podatak razgradive frakcije u svakoj vremenskoj točki inkubacije, izračunati su parametri kinetike razgradivosti suhe tvari i škroba. Nulti sat inkubacije predstavljale su vrećice isprane samo u ledenoj vodi (bez inkubacije u inkubacijskoj otopini) koje su zatim osušene i izvagane.

Tablica 4. Dnevni obrok krava.

Dnevni obrok	Kg
Silaža (cijela biljka kukuruza 50 %; sudanska trava 50 %)	16
Posije	2
GT-2	2
GKJ-dopunska 35 %	0,3 do 0,4
Paša	*ad libitum*
Sijeno	*ad libitum*
Sol	*ad libitum*

Kinetika razgradivosti izračunata je po jednadžbi (2) definiranoj u radu Orskova i McDonalda (1979) te kasnije prilagođenoj na lag fazu u radu Dhanoa (1988):

$$D\ (t) = a + b\ x\ (1 - e^{-c \times (t-L)}) \quad (4)$$

gdje je: $D\ (t)$ – razgradivost (g/g) u vremenu t (h); a – brzo razgradiva frakcija (g/g); b – sporo razgradiva ili potencijalno razgradiva frakcija (g/g); c – brzina razgradivosti (h^{-1}); L – lag faza (h).

Za izračun parametara razgradivosti upotrijebljena je procedura za nelinearnu regresiju NLIN u programskom jeziku SAS 9.3 s Marquardt parametrom radi što bolje prilagodbe podataka modelu.

Osim parametara razgradivosti, izračunata je i efektivna razgradivost po jednadžbi (3) definiranoj kod Peyrata i sur. (2014):

$$ED\ = a + \frac{(b \times ce^{(-kp \times L)})}{(c+kp)} \quad (5)$$

gdje je: ED – efektivna razgradivost; kp – brzina pasaže (za suhu tvar iznosi 0,04 h^{-1}; za škrob 0,06 h^{-1}).

3.7. Mikrobiološka analiza silaža na kraju siliranja

Priprema uzorka za određivanje ukupnog broja bakterija, laktobacila i kvasaca, obuhvaćala je miješanje 20 g uzorka (a_w 80 – 90) u tekućoj hranjivoj podlozi (bujonu) koji se sastojao od natrijevog klorida (4,3 g/L) uz dodatak peptona (1,0 g/L) i Tween 80 (0,5 mL/L) u vreći za homogenizaciju (engl. *stomacher bag*) kroz 3 minute. Od ovog početnog uzorka napravljena su decimalna razrijeđenja u prije opisanoj hranjivoj podlozi do 10^{-5}. Za određivanje ukupnog broja bakterija u gramu koristila se norma HRN EN ISO 4833:2003 (International organization for standardization, 2003). Alikvot (0,1 mL) svakog razrijeđenja stavljen je u sterilnu Petri-jevu zdjelicu i potom preliven s 12 − 15 mL zagrijanog (≈45 °C) PCA agara (engl. *Plate count agar*). Smjesa je pažljivo promiješana rotiranjem zdjelice po podlozi. Inokulirani agar inkubiran je kroz 72 ± 3 sata u aerobnim uvjetima na 30 °C (± 1 °C). Nakon inkubacije izbrojane su sve porasle kolonije i tako je određen broj bakterija u gramu uzorka. Ukupan broj bakterija mliječne kiseline određen je po normi EN ISO 15214:1998 (International organization for standardization, 1998). Alikvot (0,1 mL) razrijeđenja silaže po prethodno opisanom postupku (od 10^{-2} do 10^{-5}) nacijepljen je na De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) agar i inkubiran 72 sata na 30 °C (± 1 °C) u anaerobnim uvjetima koji su uspostavljeni pomoću lonca za anaerobnu inkubaciju i uložaka Anaerocult A. Nakon inkubacije izbrojane su kolonije te je utvrđen broj bakterija mliječne kiseline u gramu uzorka. Broj kvasaca određen je metodom ISO 21527-2:2008 (International organization for standardization, 2008). Od inicijalnog uzorka napravljen je niz razrijeđenja u prije opisanoj hranjivoj podlozi [natrijev klorid (4,3 g/L) uz dodatak peptona (1,0 g/L) i Tween 80 (0,5 mL/L)] od 10^{-1} do 10^{-10} te je nacijepljeno 0,1 ml od svakog razrijeđenja na dikloran-glicerol 18 (DG 18) selektivni agar i ravnomjerno razmazano *L*-štapićem po površini agara. Inokulirana podloga inkubirana je kroz 5 dana na 25 °C (± 1 °C) u aerobnim uvjetima. Nakon inkubacije izbrojane su porasle kolonije kvasaca te je određen njihov broj u gramu uzorka.

3.8. Statistička analiza

Za određivanje utjecaja nezavisnih varijabli (hibrida, dodatka silaži i perioda siliranja) kao i njihovih interakcija na parametre kvalitete silaža te parametre razgradivosti suhe tvari i škroba silaža statistička analiza bila je postavljena kao *split-plot* dizajn u vremenu (hibridi su definirani kao cijeli plot, a vrijeme i dodatak kao subplotovi). Analiza je izvedena pomoću pocedure MIXED u programskom jeziku SAS 9.3 (SAS Institute, SAD). Srednje vrijednosti bile su uspoređene i grupirane pomoću procedure PLM. Utjecaj hibrida i dodataka silaži te njihovih interakcija na mikrobiološki status silaža kao i utjecaj hibrida na parametre tvrdoće zrna ispitan je potpuno slučajnim *split-plot* dizajnom, a razlika između srednjih vrijednosti ispitana je Tukeyevim testom. Za utvrđivanje korelacija između parametara kvalitete silaža, kao i parametra razgradivosti silaža, s parametrima kvalitete silaža upotrijebljena je procedura CORR, a za utvrđivanje utjecaja brzine razgradivosti škroba na brzinu razgradivosti suhe tvari upotrijebljena je procedura REG u programskom jeziku SAS 9.3. Statistička signifikantnost bila je postignuta ako je $P \leq 0,05$.

3.9. Analiza proteoma *γ*-zeina

Proteom zeina kukuruza analiziran je u Centru za proteomiku i spektrometriju masa Laboratorija za sistemsku biomedicinu Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. Napravljena je usporedba proteoma zeina na početku siliranja (0. dan) i na kraju siliranja (364. dan) u svim hibridima i tretmanima, kao i kvantifikacija pojedinih detektiranih zeina.

3.9.1. Ekstrakcija zeina

Metoda za ekstrakciju zeina preuzeta je od Wua i suradnika (2009) uz modifikacije. U plastičnu epruvetu izvagano je 150 mg samljevene silaže visoko vlažnog zrna kukuruza te je dodano 1,2 mL otopine za ekstrakciju (70 % etanol/2 % β-merkaptoetanol). Epruvete s uzorcima miješane su 2 sata na 25 °C u termomikseru, nakon čega je smjesa centrifugirana 10 minuta pri 4 °C na 12000×g. Volumen od 100 µL supernatanta odpipetirano je u plastičnu epruvetu u koju je dodano 400 µL acetona te su dobivene smjese ostavljene preko noći na -20 °C kako bi se istaložili zeini. Nakon toga uzorci su centrifugirani tijekom 20 minuta pri 4 °C na 10000×g. Aceton je pažljivo oddekantiran, a proteinski talog resuspendiran je u 100 µl nekomplentiranog pufera (tablica 5.) za izoelektrično fokusiranje.

Tablica 5. Nekompletirani pufer za izoelektrično fokusiranje.

Sastojak	Masa/volumen
Tiourea	1,522 g
Urea	4,2042 g
CHAPS	0,4 g
dH_2O	do 10 mL

3.9.2. Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu

Koncentracija proteina u resuspendiranom uzorku određena je metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). Uzorci su prije detekcije razrijeđeni u destiliranoj vodi u

omjeru 5 naprema 100 (v/v). Volumenu od 100 µL razrijeđenih uzoraka i standarda dodano je 1,0 mL Bradfordova reagensa (10 mg Coomassie brilliant blue G-250 otopljeno u 5 mL 95%-tnog etanola i 10 mL 85%-tne fosforne kiseline), nakon čega su uzorci izmiješani ručno i ostavljeni stajati 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija uzoraka i standarda očitana je pri 595 nm na spektrofotometru. Koncentracija proteina u uzorku određena je pomoću koncentracijskog dijagrama otopina standarda, proteina goveđeg serumskog albumina (BSA, engl. *Bovine Serum Albumin*). Za izradu koncentracijskog dijagrama pripremljene su koncentracije standarda: 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL i 100 µg/mL.

3.9.3. 2-D elektroforeza

Izoelektrično fokusiranje

Alikvot volumena resuspendiranih uzoraka odpipetiran je mikropipetom u plastičnu epruvetu. Volumen alikvota određen je prema koncentraciji proteina kvantificiranoj pomoću Bradfordove metode i ukupnoj masi proteina koja se stavlja na trake za izoelektrično fokusiranje (20 µg). Alikvot uzorka razrijeđen je zatim kompletnim puferom za izoelektrično fokusiranje do volumena od 350 µL (tablica 6.) kojem je dodano na vrhu žličice brom-fenol plavo. Uzorak je zatim kratko cetrifugiran te nanesen uzduž kanala u kadici za izoelektrično fokusiranje. Trake s gradijentnim gelom u pH-području 3 – 10 (IPG, engl. *Immobilized pH Gradient*) položene su na uzorak a zatim su prekrivene mineralnim uljem te je pokrenut program rehidratacije traka pri 50 V na 20 °C tijekom 14 sati. Nakon rehidratacije su između IPG trake i elektroda položeni navlaženi filter-papirići te je pokrenut program za izoelektrično fokusiranje (tablica 7.).

Ekvilibracija IPG traka

Nakon završetka izoelektričnog fokusiranja IPG trake su ocijeđene od mineralnog ulja i uronjene u ekvilibracijski pufer 1 (100 mg ditiotreitola (DTT) u 10 mL osnovnog ekvilibracijskog pufera, sastav osnovnog pufera nalazi se u tablici 8.) te su trake s puferom stavljene na tresilicu 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon 15 minuta inkubacije u ekvilibracijskom puferu 1 trake su prenesene u ekvilibracijski pufer 2 (250 mg

jodoacetamida u 10 mL osnovnog pufera za ekvilibraciju) i stavljene 15 minuta na inkubaciju.

Tablica 6. Kompletirani pufer za izoelektrično fokusiranje.

Sastojak	Masa/volume
Nekompletirani pufer za IEF	858 µL
Proteaza inhibitor *	142,8 µL
Ditiotreitol	10 mg

*Proteaza inhibitor je pripremljen otapanjem 1 tabletice Protease inhibitor cocktail u 1,5 mL dH_2O. Alikvoti tako pripremljene otopine zamrznuti su na -20°C do upotrebe.

Tablica 7. Uvjeti za izoelektrično fokusiranje proteina (preuzeto iz Butorac, 2015).

Korak	Ostvareni napon, V	Trajanje, min	Trajanje, Vh
1	200	75	-
2	500	15	-
3	500	60	-
4	1000	15	-
5	1000	60	-
6	7000	240	-
7	7000	-	90000
8	500	1440	-

Tablica 8. Osnovni pufer za ekvilibraciju.

Sastojak	Masa/volume
1,5 mM tris-HCl pufera pH 8,8*	10 mL
Urea	72,07 g
Glicerol	60,3 g
SDS	4 g
dH_2O	do 200 mL

*18,20 g tris baze u 70 mL destilirane vode. pH pufera je podešen dodatkom 6 M HCl na 8,8 te je volumen nadopunjen do oznake u odmjernoj tikvici od 100 mL.

SDS-elektroforeza (SDS-PAGE)

Otopina za poliakrilamidni gel (12%, tablica 9.) pripremljena je neposredno prije izlijevanja gela između stakala (12 × 18 cm) s razmakom od 1 mm (Protean II XI cell). Na dno između stakala je prije izlijevanja otopine poliakrilamidnog gela izliveno 1,0 mL brzo polimerizirajućega gela (osnovna otopina za poliakrilamidni gel 6 mL u koju je dodano 20

µL TEMED-a i 50 µL 10% APS-a) i ostavljeno da polimerizira između stakala. Neposredno prije izlijevanja osnovnog poliakrilamidnog gela u otopinu je dodano 75 µL TEMED-a i 750 µL 10% APS-a. Nakon izlijevanja osnovnog gela između stakala, na vrh gela nanesen je n-butanol kako bi se spriječila oksidacija. Nakon polimerizacije poliakrilamidnog gela n-butanol je pažljivo uklonjen te je površina gela isprana s dH_2O, a stakla s držačima su spojena na pripadajuće stalke (Protean II XI cell).

Tablica 9. Otopina za poliakrilamidni gel.

Sastojak	Volumen
30 % akrilamid/bisakrilamid*	60 mL
dH_2O	50,2 mL
1,5 M tris-HCl, pH 8,8**	37,5 mL
10 % SDS***	1,5 mL

*29,2 g akrilamida i 0,80 g bisakrilamida u 100 mL dH_2O
**vidjeti pripremu u tablici 7
***10 g SDS u 100 mL dH_2O

Tablica 10. Radni pufer.

Sastojak	Masa/volumen
Tris baza*	30,3 g
Glicin (Kemika d.d.)	144 g
SDS	10 g
dH_2O	Do 1 L

IPG trake nakon ekvilibracije isprane su nekoliko puta u radnom puferu razrijeđenom pet puta s dH_2O (sastav radnog pufera naveden je u tablici 10.) te su utisnute pincetama na površinu polimeriziranog gela (slika 14.). Za bolju fiksaciju IPG traka na gelu izliveno je oko 1,0 mL 0,5%-tne otopine agaroze (0,5 g agaroze, brom-fenol plavo, 20 ml radnog pufera i 80 ml dH_2O). Stakla sa stalcima umetnuta su u kadu za elektroforezu, a cijeli sustav napunjen je pet puta razrijeđenim radnim puferom, poklopljen poklopcem i priključen na hlađenje vodom te na jedinicu za izvor struje s definiranim programom koji definira uvjete elektroforeze (tablica 11.).

Tablica 11. Uvjeti za SDS-elektroforezu (preuzeto iz: Butorac, 2015).

Korak	I, mA	Trajanje, min	Trajanje, Vsat
1	15	60	-
2	20	/	600
3	30	Do kraja gela (približno 300)	-



Slika 14. Umetanje IPG trake na gel koji je polimerizirao.

Bojanje gelova

Nakon završene elektroforeze gelovi su preneseni u koloidnu otopinu za bojanje gelova. Otopina za bojanje gelova pripremljena je miješanjem otopine boje Commassie brilliant blue (250 g Commassie brilliant blue G250, 200 g amonijevog sulfata, 47 mL 85%-tne fosforne kiseline, nadopunjeno do 2L s dH_2O) i metanola u omjeru 1 : 4 (v/v). Gelovi su ostavljeni na tresilici u kadicama s bojom 16 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga, otopina boje pažljivo je oddekantirana, a gelovi su isprani nekoliko puta u dH_2O dok pozadina gela nije izgubila plavo obojenje. Gelovi su ostavljeni stajati u kadici s dH_2O uz dodatak 1% (v/v) octene kiseline.

3.9.4. Snimanje gelova i kvantifikacija proteina na pojedinim željenim lokacijama

Gelovi su snimljeni pomoću instrumenta VersDoc Imaging System (model 4000), a denzitometrijska analiza gelova i kvantifikacija napravljena je pomoću računalnog programa za analizu 2-DE gelova Discovery Series PDQuest 7.4.0., pri čemu su korištena Gaussian preračunata zatamnjena za kvantifikaciju.

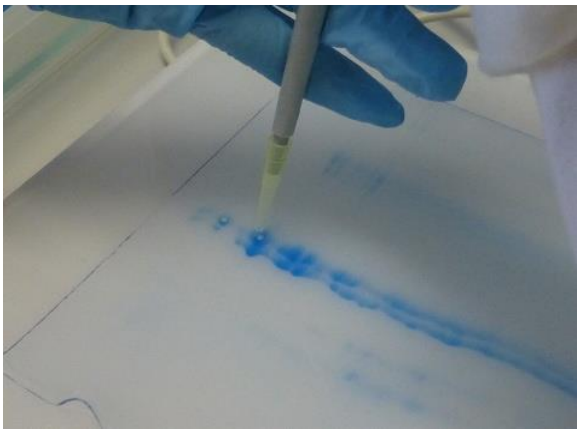
3.9.5. Spektrometrija masa

Kako bi se detektirali proteini separirani pomoću 2-D elektroforeze primijenjen je *bottom-up* (odozdo nagore) pristup u spektrometriji masa uz korištenje MALDI-TOF/TOF sustava (4800 plus MALDI TOF/TOF).

3.9.5.1 Izolacija proteina iz gela i njihova derivatizacija

Digestija proteina

Proteini detektirani na različitim lokacijama u 2-DE gelu (vidljivo po plavom obojenju) ručno su izrezani pomoću nastavka za mikropipetu (slika 15.). Komadići gela prebačeni su u Eppendorf epruvetu u koju je prethodno dodano 1 mL otopine za odbojavanje (100 mL octene kiseline, 400 mL metanola i 500 mL dH_2O) te su stavljeni na termomiješalicu na 40 °C i 700 o/min do obezbojenja komadića gela uz izmjenu otopine za odbojavanje jednom ili dva puta u tijekom rada. Komadići gela zatim su dva puta isprani u 50 mM otopini NH_4HCO_3 (pH 8,8; 3,95 g NH_4HCO_3 u 900 mL dH_2O; pH podešen s fosfatnom kiselinom te nadopunjeno s dH_2O do oznake u odmjernoj tikvici od 1 L) po 5 min, te jednom kroz 30 minuta (sve na termomiješalici uz pomak 700 o/min). Nakon toga je na komadiće gela dodano 500 µL 50 mM NH_4HCO_3/acetonitril, 1 : 1 (v/v) te su epruvete stavljene 30 minuta na termomiješalicu (sobna temperatura, 700 o/min). Zadnji korak obrade komadića gela prije tripsinolize bio je dodavati 100 µL acetonitrila kako bi se komadići gela stisnuli (komadići gela pobijele). Nakon uklanjanja acetonitrila komadići gela su osušeni u vakuum-centrifugi. Sasušeni komadići gela prebačeni su onda u manje Eppendorf epruvete (200 µL) te je na svaki komadić gela dodano 10 µL pufera s tripsinom (u ampulu tripsina dodano je 50 µL dH_2O te je dobivena koncentracija 1 mg/mL koja je razrijeđena na radnu koncentraciju (10 µg/mL) dodavanjem 25 mM NH_4HCO_3 u omjeru 1 : 100). Dodavanjem pufera s tripsinom započela je digestija proteina u gelu (parametri inkubacije: 18 sati, 37 °C, 700 o/min).



Slika 15. Izrezivanje proteina iz gela.

Ekstrakcija peptida

Nakon digestije proteina, pufer s tripsinom i peptidima prebačen je u čistu Eppendorf epruvetu (1,5 mL) te je posušen u vakuum-centrifugi. Na komadiće gela dodano je još 10 µL acetonitril/5% vodene otopine trifluoroctena kiselina, TFA (1 : 1, v/v) te su sonificirani 30 minuta u sonifikacijskoj kupelji i inkubirani 15 minuta na termomiješalici (25 °C, 500 o/min). Nakon inkubacije gela u smjesi je ovako dobivena otopina s peptidima spojena s osušenim peptidima te su epruvete s otopinom peptida stavljene na sušenje u vakuum-centrifugu. Nakon sušenja je talog peptida resuspendiran u 10 µL 0,1% vodene otopine TFA.

Pročišćavanje uzoraka sa Zip-Tip nastavcima

Prije nanašanja resuspendiranog uzorka peptida na Zip-Tip nastavak, nastavak je kondicioniran u tri koraka: prvi – 3 ispiranja s po 10 µL otopine acetonitril/0,1%-tna vodena otopina TFA (4 : 1, v/v), drugi – 3 ispiranja s po 10 µL otopine acetonitril/0,1%-tna vodena otopina TFA (1 : 1, v/v) i na kraju treći – 3 ispiranja s po 10 µL 0,1%-tne vodene otopine TFA. Nakon ispiranja nastavka nanesen je uzorak peptida i to s deset ispiranja (uvlačenja/ispuštanja). Nanesen uzorak peptida isprao se pet puta s po 10 µL 0,1%-tne vodene otopine TFA te je eluiran s nastavka s 10 µL otopine acetonitril/0,1%-tna vodena otopina TFA (4 : 1, v/v) i prebačen u 1,5 mL Eppendorf epruvetu. Pročišćeni uzorci peptida prosušeni su u vakuum-centrifugi.

Derivatizacija peptida

Peptidi su obilježeni s CAF-/CAF+ reagensom (Cindrić i sur., 2010). Derivatizacijska otopina sadržavala je $NaCNBH_4$ koncentracije 12 mg/mL i CAF koncentracije 8 mg/mL u omjeru 1 : 1. Otopina natrijevog cijanoborhidrida (12 mg/mL) pripremljena je neposredno prije derivatizacije otapanjem 6 mg $NaCNBH_4$ (Merck, Njemačka) u 500 µL 10 mM KH_2PO_4 (pH 5,0). Otopina CAF (8 mg/mL) pripremljena je vaganjem 2 mg CAF (IRB, Hrvatska) u 250 µL 10 mM KH_2PO_4 (pH 5,0). Prosušeni peptidi resuspendirani su u 20 µL pripremljene otopine za derivatizaciju te su derivarizirani 3 puta po 4 minute na 90 W u mikrovalnoj pećnici. Nakon derivatizacije peptidi su ponovno pročišćeni Zip-Tip tehnikom, prebačeni u Eppendorf epruvetu (1,5 mL) i posušeni na vakuum-centrifugi. Posušeni derivatizirani peptidi resuspendirani su u otopini CHCA matrice [α-cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina, Sigma-Aldrich, SAD; 5 mg CHCA otopi se u 1,0 mL otopine acetonitril/dH_2O (1/1, v/v)]. Nakon resuspendiranja u CHCA matrici otopine peptida nanesene su na MALDI pločicu.

3.9.5.2. Analiza peptida spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF

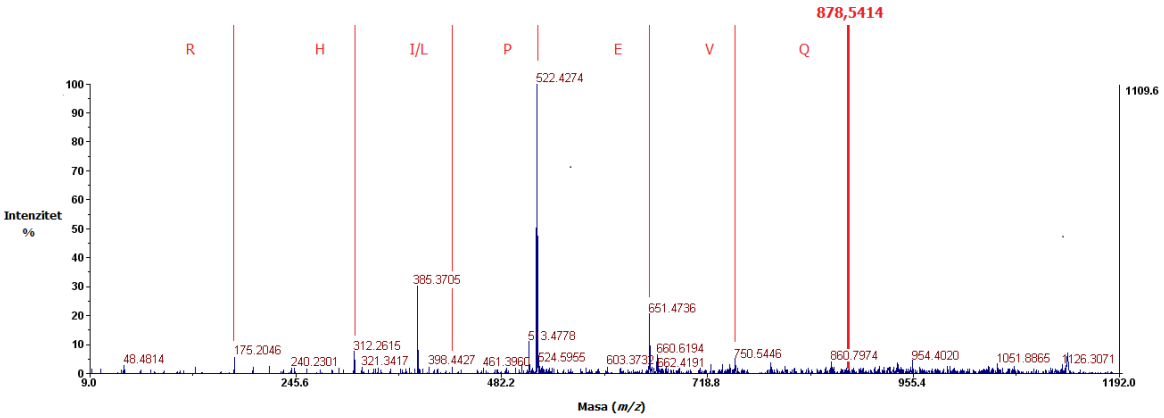
Obilježeni peptidi snimljeni su u negativnom načinu rada instrumenta. Interna kalibracija provedena je signalima autoliziranog tripsina obilježenog reagensom CAF-/CAF+. Nakon snimanja negativnog MS spektra, deset najintenzivnijih signala peptida prekursora odabrano je za daljnju fragmentaciju unutar instrumenta. MS/MS spektri snimljeni su prvo u negativnom načinu rada instrumenta, a zatim su ti isti prekursori snimljeni i u pozitivnom radu instrumenta. Parametri rada instrumenta navedeni su u tablici 12.

Tablica 12. Parametri rada MALDI-TOF/TOF (Preuzeto iz: Butorac, 2015).

Tip analize	MS negativ	MS/MS negativ	MS/MS pozitiv
Detekcija iona	Negativna	Negativna	Pozitivna
Ionsko zrcalo	Reflektron	Reflektron	Reflektron
Broj snimaka, spektar	1000	2000	2000
Raspon masa, Da	1000 – 4000	1000 – 3833	9 – 3833
Vrijeme odziva, ns	500	400	400

3.8.5.3. Identifikacija proteina

Identifikacija proteina bazirana je na *de novo* principu. Slijed aminokiselina iščitan je na temelju razlika u masi konsekutivnih signala u spektru s obzirom na monoizotopne mase fragmentiranih iona (slika 16.), kao što je definirano u radu Cindrića i suradnika (2010). Nakon generiranja sekvenci dobivenih iz oba tipa spektara (MS/MS negativ i MS/MS pozitiv), pretražena je baza podataka proteinskih sekvenci NCBI (engl. *National Center for Biotechnology Information*) pomoću programa Protein Reader (Institut Ruđer Bošković i SemGen Ltd.) te su kao istinit rezultat uzete sekvence koje su imale preklapanje u oba tipa MS/MS spektara. Dodatna potvrda dobivena je i kroz masu iona prekursora.



Slika 16. MALDI-TOF/TOF MS/MS spektar identificiranog peptida triptičkog digesta 16 kDa *γ*-zeina s definiranom masom prekursor iona i slijedom aminokiselina definiranih iz masa konsekutivnih signala.

4. REZULTATI

Tri hibrida kukuruza korištena u ovom istraživanju: Bc 462, Bc 344 i Bc 513 pc, razlikovali su se u parametrima Stenvertove analize i pravoj gustoći (tablica 13.). Dok istovremeno, nije primijećena razlika u veličini čestica samljevenih zrna kukuruza prilikom pripreme silaža visoko vlažnog zrna kukuruza (tablica 13.).

Tablica 13. Parametri tvrdoće zrna ispitivanih hibrida kukuruza.

	Hibridi kukuruza			
	Bc 462	Bc 344	Bc 513 pc	*P*
Veličina čestica, mm	1,45	1,43	1,56	NS
Praca gustoća, g/mL	1,31^{b}	1,26^{c}	1,36^{a}	***
Stenvert-ova analiza				
W_t C/F	1,48^{b}	1,46^{b}	1,96^{a}	***
Vrijeme, s	3,75^{ab}	3,50^{b}	3,94^{a}	**
Volumen, mL	30,6^{a}	31,0^{a}	29,0^{b}	***

***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05; NS: nesignifikantno

^{abc}Vrijednosti u istom retku tablice označene različitim slovima značajno se razlikuju; P<0,05.

Od parametara Stenvertove analize, kod Bc 513 pc zabilježen je statistički značajno viši odnos krupnih i sitnih čestica nego što je slučaj kod ostala dva hibrida. Slično tomu je dulje vrijeme mljevenja zabilježeno u Bc 513 pc, s time da Bc kokičar i Bc 462 nisu imali statistički značajno različito vrijeme mljevenja. Statistički značajna razlika u vremenima mljevenja između ispitivanih hibrida proizlazi iz razlike između Bc 513 pc i Bc 344, dok se Bc 462 po vremenima mljevenja nalazi između ta dva hibrida. U ukupnom volumenu samljevnih zrna Bc 462 i Bc 344 imali su slične vrijednosti koje su bile statistički značajno više od volumena kod Bc 513 pc (tablica 13.).

Vrijednosti prave gustoće statistički značajno su varirale između sva tri hibrida: Bc 513 pc ima najvišu vrijednost gustoće zrna, Bc 344 najnižu, dok se Bc 462 po vrijednosti prave gustoće nalazi između preostala dva hibrida (tablica 13.). Priprema silaže visoko vlažnog zrna kukuruza obuhvaća mljevenje zrna mlinom čekićarem sa sitom veličina pora od 0,8 cm. Analiza tako samljevenih zrna kukuruza nije pokazala statistički značajnu razliku u veličinama čestica između silaža ispitivanih hibrida kukuruza, iako su silaže Bc 513 pc imale nešto višu relativnu srednju veličinu čestica nego silaže ostalih dvaju hibrida (tablica 13.).

4.1. Parametri kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

Utjecaji hibrida različite caklavosti endosperma te dodataka silaži na kvalitetu silaža i sadržaj ukupnih zeina praćeni su tijekom godine dana siliranja visoko vlažnog zrna kukuruza. Osim glavnih parametara (hibrida, dodataka i vremena siliranja), ispitane su i njihove međusobne interakcije.

4.1.1. Utjecaj hibrida kukuruza na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

Statistička analiza ispitivanih silaža pokazala je da hibrid kukuruza nije imao signifikantan utjecaj na vrijednosti suhe tvari silaža. Vrijednost suhe tvari ispitivanih silaža visoko vlažnog zrna kukuruza kretala se oko 70% (tablica 14.) sa zabilježenom razlikom od manje od 1% između silaža. Mliječna kiselina (MK) i titracijska kiselost (TK) bile su najniže u silažama hibrida Bc 344, iako nije utvrđen statistički značajan utjecaj hibrida na sadržaj mliječne kiseline, kao ni na titracijsku kiselost. U silažama hibrida Bc 344 isto tako je zabilježen najviši pH koji se statistički razlikovao ($P < 0,01$) od pH-vrijednosti u ostala dva hibrida (Bc 462; Bc 513 pc).

Hibrid je također imao značajan utjecaj ($P < 0,001$) na sadržaj sirovog proteina (SP) u ispitivanim silažama. Silaže hibrida Bc 513 pc imale su najviši sadržaj sirovog proteina, dok su silaže Bc 344 imale najniži. Udio topljivog proteina u ukupnom sirovom proteinu kao pokazatelj razgradivog proteina bio je najniži u silažama hibrida Bc 513 pc, dok je u silažama hibrida Bc 344 bio najviši. Silaže svih triju hibrida kukuruza razlikovale su se statistički značajno i u udjelu topljivog proteina i u udjelu amonijaka (tablica 14.). Silaže hibrida Bc 513 pc imale su i najniži udio amonijaka u sirovom proteinu od ispitivanih silaža, dok su za razliku od topljivog proteina silaže hibrida Bc 462 imale statistički značajno viši udio amonijaka u sirovom proteinu od silaža Bc 344 i općenito najviši udio amonijaka od svih triju hibrida. Silaže hibrida Bc 513 pc su osim najvišeg sadržaja SP imale i najviši udio ukupnih zeina od svih silaža ispitivanih hibrida. Silaže ostalih dvaju hibrida (Bc 462 i Bc 344) imale su statistički sličan udio ukupnih zeina.

Tablica 14. Utjecaj hibrida kukuruza na osnovne parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

	Hibridi kukuruza			
	Bc 462	Bc 344	Bc 513 pc	*P*
ST, %	69,8	70,1	70,6	NS
MK, g/kg ST	9,50	9,20	9,63	NS
TK, meq/g ST	0,55	0,51	0,53	NS
pH	$4,62^{b}$	$4,71^{a}$	$4,65^{b}$	**
SP, g/kg ST	$109,8^{b}$	$105,6^{c}$	$133,0^{a}$	***
TP, % SP	$35,9^{b}$	$38,4^{a}$	$29,4^{c}$	***
NH_3, % SP	$2,62^{a}$	$2,45^{b}$	$2,28^{c}$	***
Zeini, % SP	$79,2^{b}$	$79,6^{b}$	$84,0^{a}$	***

****P* < 0,001; ***P* < 0,01; **P* < 0,05; NS: nesignifikantno
^{abc}Vrijednosti u istom retku označene različitim slovima značajno se razlikuju; *P* < 0,05.

4.1.2. Utjecaj dodataka silaži na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

Silaže s dodanim inokulantom imale su značajno višu suhu tvar (P < 0,05) nego silaže s ostalim dvaju tretmanima. Dodatak mliječne kiseline nije pokazao utjecaj na sadržaj suhe tvari (tablica 15.). Sadržaj mliječne kiseline u silažama s dodanim inokulantom bio je statistički značajno viši nego u kontrolnim silažama i silažama s dodanom mliječnom kiselinom. Kontrolne silaže imale su pri tome najniži sadržaj mliječne kiseline (*P* < 0,05) od svih ispitivanih silaža. Općenito je utjecaj različitih dodatka prilikom siliranja visoko vlažnog zrna kukuruza pokazao značajan utjecaj na sadržaj mliječne kiseline (*P* < 0,001). Titracijska kiselost (TK) kao pokazatelj ukupnih kiselina isto tako je bila najviša u silažama s dodanim inokulantom, dok se u ostala dva tretmana nije razlikovala (tablica 15.).

Tip dodatka silaži imao je značajan utjecaj na pH-vrijednost ispitivanih silaža (P < 0,001). Dodatak inokulanta prilikom siliranja rezultirao je sa silažama koje su imale najniži pH. pH u silažama s dodatkom mliječne kiseline bio je značajno niži nego li pH u kontrolnim silažama (P < 0,05).

Nije utvrđen statistički značajan utjecaj dodataka silaži na sadržaj sirovog proteina (SP) ispitivanih silaža. Međutim silaže s dodatkom inokulanta imale su signifikantno niži sadržaj SP od kontrolnih silaža (tablica 15.). Silaže s dodatkom inokulanta imale su istovremeno najviši udio topljivog proteina (TP). Najmanji udio TP bio je u kontrolnim silažama. Utjecaj dodataka silaži na udio topljivih proteina i udio amonijaka u ispitivanim

silažama bio je značajan (za oba parametra $P < 0,001$). Najviši udio amonijaka u sirovom proteinu bio je u kontrolnim silažama, dok je najniži zabilježen u silažama s dodatkom inokulanta. Dodatak mliječne kiseline rezultirao je silažama koje su imale niži udio amonijaka od kontrolnih silaža, ali viši od silaža s dodatkom inokulanta (tablica 15.). Silaže sa dodatkom inokulanta imale su viši udio zeina od silaža sa dodatkom mliječne kiseline i kontrolnih silaža. Općenito su kontrolne silaže imale najniži udio zeina od svih ispitivanih silaža.

Tablica 15. Utjecaj dodataka silaži na osnovne parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

	Dodatak silaži			
	Kontrola	Inokulant	Mliječna kiselina	*P*
ST, %	$69,9^{b}$	$70,8^{a}$	$69,9^{b}$	*
MK, g/kg ST	$7,14^{c}$	$12,63^{a}$	$8,55^{b}$	***
TK, meq/g ST	$0,51^{b}$	$0,57^{a}$	$0,51^{b}$	*
pH	$4,85^{a}$	$4,40^{c}$	$4,74^{b}$	***
SP, g/kg ST	$117,5^{a}$	$114,3^{b}$	$116,6^{ab}$	NS
TP, % SP	$32,3^{c}$	$37,0^{a}$	$34,4^{b}$	***
NH_3, % SP	$2,81^{a}$	$2,20^{c}$	$2,36^{b}$	***
Zeini, % SP	$78,4^{c}$	$83,3^{a}$	$80,8^{b}$	***

***$P < 0,001$; **$P < 0,01$; *$P < 0,05$; NS: nesignifikantno
^{abc} Vrijednosti u istom retku označene različitim slovima značajno se razlikuju; $P < 0,05$.

4.1.3. Utjecaj perioda siliranja na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

Sadržaj suhe tvari silaža tijekom siliranja pokazao je minimalan, ali statistički značajan rast tijekom trajanja siliranja ($P < 0,001$) s maksimumom zabilježenim u zadnjoj točki ispitnog razdoblja (364. dan). Zabilježeni porast u suhoj tvari od otprilike 1,3% između početne mase za siliranje i silaža nakon godine dana pokazao se statistički značajnim primarno zbog ujednačenosti suhe tvari ispitivanih silaža u kojima je zabilježena niska standardna devijacija (SD = 0,47%). Sadržaj mliječne kiseline u ispitivanim silažama imao je konstantan statistički značajan rast do pete vremenske točke (182. dan) u kojoj je zabilježena maksimalna vrijednost, nakon koje je u šestoj (274. dan) i sedmoj (364. dan) vremenskoj točki zabilježen statistički značajan pad (tablica 16.). Za razliku od sadržaja mliječne kiseline, titracijska kiselost ispitivanih silaža rasla je statistički

značajno do pete vremenske točke (tablica 16.), nakon koje je zabilježen blagi porast u vrijednosti titracijske kiselosti bez statističke značajnosti. Vrijednost pH imala je konstantan pad u svim vremenskim točkama ispitnog razdoblja. Pad pH nakon četvrte ispitne točke pokazao je usporavanje, što je evidentirano preko statističkog grupiranja vrijednosti pH između konsekutivnih vremenskih točaka (tablica 16.).

Tablica 16. Utjecaj perioda siliranja na osnovne parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

	Period siliranja, dan							
	0	15	48	98	182	274	364	*P*
ST, %	69,74^{d}	70,29^{bc}	69,11^{e}	69,92^{cd}	70,43^{ab}	70,75^{ab}	71,04^{a}	***
MK, g/kg ST	1,01^{f}	6,37^{e}	8,76^{d}	13,89^{b}	15,38^{a}	11,60^{c}	9,10^{d}	***
TK meq/g ST	0,02^{e}	0,34^{d}	0,55^{c}	0,63^{b}	0,71^{a}	0,72^{a}	0,74^{a}	***
pH	6,45^{a}	4,79^{b}	4,47^{c}	4,30^{d}	4,25^{de}	4,21^{ef}	4,18^{f}	***
SP, g/kg ST	113,6^{c}	114,2^{c}	118,0^{a}	118,3^{a}	116,7^{ab}	116,2^{b}	116,0^{b}	***
TP, % SP	17,9^{g}	24,1^{f}	30,3^{e}	37,7^{d}	40,6^{c}	44,3^{b}	47,0^{a}	***
NH_3, % SP	0,38^{f}	1,95^{e}	2,25^{d}	2,73^{c}	2,91^{c}	3,24^{b}	3,73^{a}	***
Zeini, % SP	54,6^{f}	79,0^{e}	82,8^{d}	85,4^{c}	87,3^{b}	88,6^{a}	88,8^{a}	***

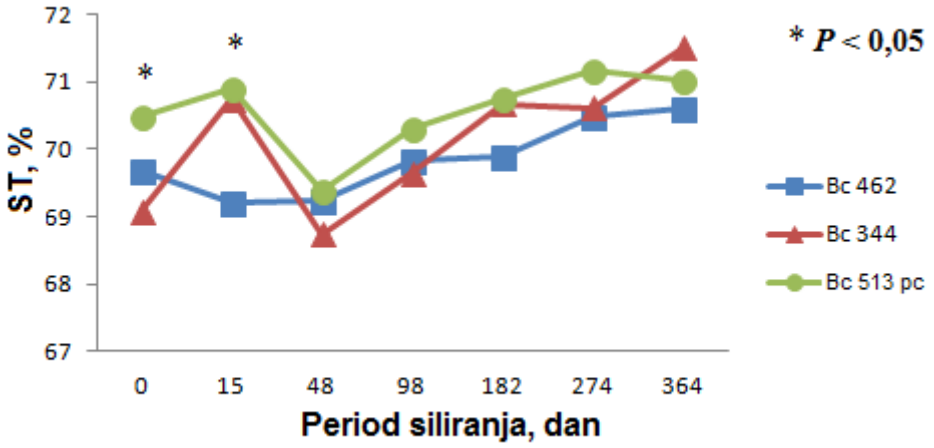
***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05

^{abcdefg} Vrijednosti u istom retku označene različitim slovima značajno se razlikuju; P < 0,05.

Sadržaj sirovog proteina pokazao je značajno različite vrijednosti u različitim vremenskim točkama (P < 0,001). Prvo je između prve i četvrte točke zabilježen blagi porast, a nakon toga blagi pad od četvrte do sedme vremenske točke. Standardna devijacija vrijednosti za sirovi protein u ispitivanim silažama iznosila je 1,71 g/kg ST, a maksimalna razlika između vrijednosti sirovog proteina u različitim ispitnim točkama iznosila je 4,7 g/kg ST, što govori o minimalnim razlikama između sadržaja sirovog proteina u različitim vremenskim točkama. Udio topljivog proteina u sirovom proteinu u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza imao je konstantan rast (P < 0,001) tijekom siliranja. Slično je zabilježeno u udjelu amonijaka u sirovom proteinu tijekom siliranja, udio amonijaka imao je signifikantan rast tijekom perioda siliranja (tablica 16.). Neočekivano je kroz period siliranja zabilježen porast u udjelu ukupnih zeina s najvišim skokom zabilježenim između prve i druge vremenske točke te nešto manjim između druge i treće vremenske točke. Nakon toga je porast bio usporen stagnacijom u šestoj i sedmoj točki (tablica 16.).

4.1.4. Utjecaj interakcije hibrida i perioda siliranja na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

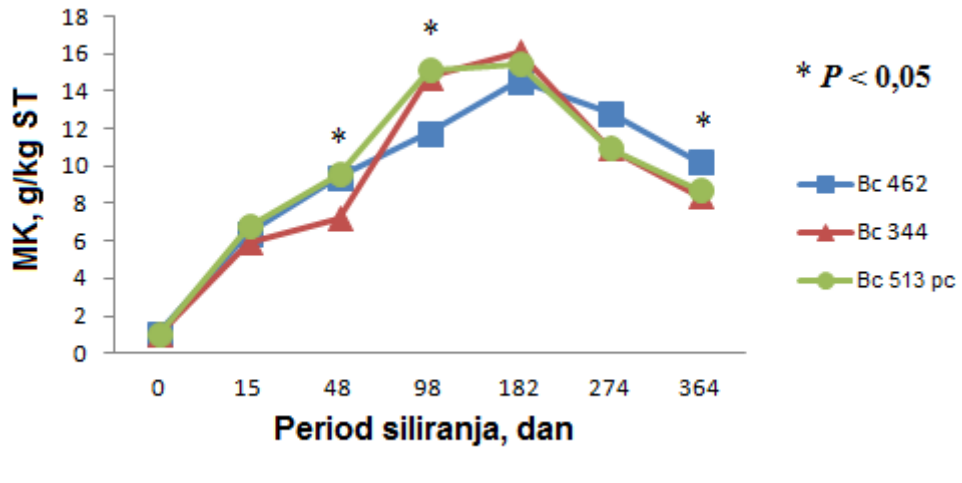
Sadržaj suhe tvari (ST) u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza ispitivanih hibrida tijekom siliranja pokazao je blagi rast u skladu s prethodno utvrđenim utjecajem perioda siliranja na sadržaj suhe tvari. Silaže hibrida Bc 344 i Bc 513 pc imale su sličnu promjenu sadržaja suhe tvari tijekom siliranja. Silaže obaju hibrida bilježile su intenzivni porast suhe tvari između prve i druge vremenske točke te naknadno pad u trećoj vremenskoj točki (Bc 344: pad sa 70,74% na 68,73%; Bc 513 pc: pad sa 70,89% na 69,39%). Nakon toga silaže obaju hibrida imale su blagi porast ST u konsekutivnim vremenskim točkama (slika 17.). Silaže hibrida 462 pokazale su nešto drugačiju promjenu sadržaja suhe tvari tijekom siliranja od ostalih dvaju hibrida s minimalnim padom u drugoj vremenskoj točki (prva točka: 69,67%; druga točka: 69,21%) i s blagim porastom u konsekutivnim vremenskim točkama (slika 17.). U točki jedan silaže hibrida Bc 462 i Bc 344 imale su slične suhe tvari signifikantno niže od silaža Bc 513 pc. Silaže hibrida Bc 513 pc i Bc 344 u točki dva imale su slične i signifikantno više vrijednosti suhe tvari od silaža hibrida Bc 462.



Slika 17. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na sadržaj suhe tvari u silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u prvoj i drugoj vremenskoj točki između silaža pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

U silažama svih triju hibrida izmjeren je rast mliječne kiseline do pete vremenske točke u kojoj su zabilježene maksimalne vrijednosti (Bc 462: 14,56 g/kg ST; Bc 344: 16,13

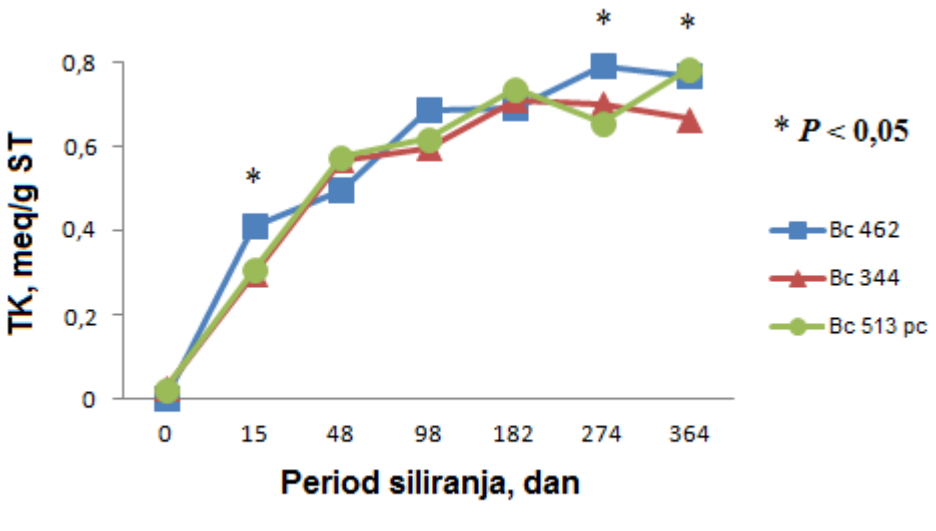
g/kg ST; Bc 513 pc: 15,45 g/kg ST). Nakon toga u šestoj i sedmoj vremenskoj točki izmjeren je pad u sadržaju mliječne kiseline (slika 18.). Iako je odgovor silaža svih triju hibrida na siliranje, s obzirom na sadržaj mliječne kiseline, ukazivao na isti trend, u vremenskoj točki tri, četiri i sedam utvrđene su značajne razlike ($P < 0,05$). U trećoj točki silaže hibrida Bc 344 imale su niži sadržaj mliječne kiseline nego silaže ostalih dvaju hibrida (Bc 462: 9,47 g/kg ST; Bc 344: 7,21 g/kg ST; Bc 513 pc: 9,60 g/kg ST). U četvrtoj točki silaže Bc 344 i Bc 513 pc imale su slične, ali statistički značajno više sadržaje mliječne kiseline nego silaže Bc 462 (Bc 462: 11,82 g/kg ST; Bc 344: 14,75 g/kg ST; Bc 513 pc: 15,09 g/kg ST). U sedmoj točki silaže Bc 462 su imale viši sadržaj mliječne kiseline nego silaže ostalih dvaju hibrida (Bc 462: 10,23 g/kg ST; Bc 344: 8,40 g/kg ST; Bc 513 pc: 8,66 g/kg ST).



Slika 18. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na sadržaj mliječne kiseline u silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,01$) te sa značajnom razlikom u trećoj, četvrtoj i sedmoj vremenskoj točki između silaža pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

Titracijske kiselosti ispitivanih silaža pojedinih hibrida tijekom siliranja pokazale su rast do pete točke (182. dan) iza koje je utvrđen različit odziv između ispitivanih hibrida za ispitivani parametar (slika 19.). Silaže hibrida Bc 462 dodatno su rasle u šestoj točki (0,79 meq/g ST) u kojoj je zabilježena maksimalna vrijednost titracijske kiselosti za taj hibrid. U točki sedam zabilježen je minimalni, statistički nesignifikantan pad titracijske kiselosti za silaže Bc 462. Silaže hibrida 344 stagnirale su u šestoj točki iza koje je slijedio minimalni

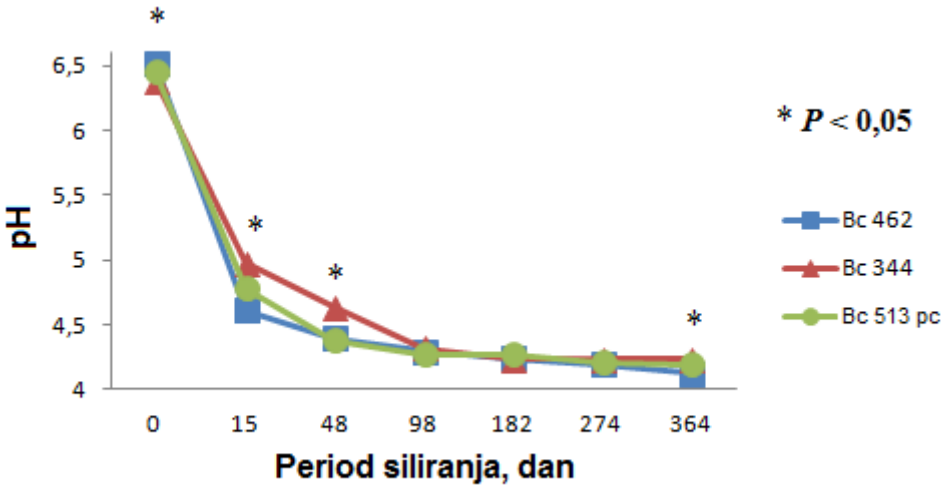
pad u sedmoj točki (0,67 meq/g ST). Silaže hibrida Bc 513 pc imale su pad između pete i šeste točke (s 0,74 na 0,66 meq/g ST) iza čega je slijedio rast u sedmoj točki (0,78 meq/g ST). Sve promjene u silažama ispitivanih hibrida između pete i sedme točke nisu imale statističku signifikantnost, osim između pete i šeste točke u silažama hibrida Bc 462 u kojima je zabilježen signifikantni rast. Vrijednosti titracijske kiselosti između silaža pojedinih hibrida, međusobno su se statistički značajno razlikovale u drugoj, šestoj i sedmoj točki. U drugoj i šestoj točki silaže Bc 462 imale su značajno višu titracijsku kiselost naspram silaža ostalih dvaju hibrida. U točki sedam statistički značajna razlika utvrđena je samo između silaža Bc 344 i Bc 513 pc, dok su silaže hibrida Bc 462 pokazivale sličnost naspram ostalih dvaju hibrida.



Slika 19. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na titracijsku kiselost u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,01$) te sa značajnom razlikom u drugoj, šestoj i sedmoj vremenskoj točki između pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

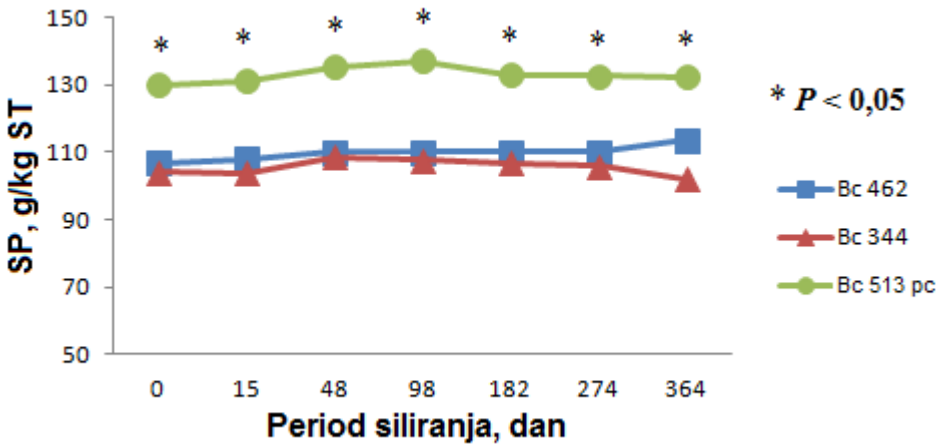
U silažama tijekom siliranja pH-vrijednost je pokazala isti trend smanjenja vrijednosti bez obzira na hibrid. Međutim same vrijednosti pH između silaža pojedinih hibrida ipak su se razlikovale u prvoj, drugoj, trećoj i sedmoj točki (slika 20.). U prvoj vremenskoj točki (0. dan) silaže svih triju hibrida su se međusobno statistički značajno razlikovale (Bc 462: 6,51; Bc 344: 6,38; Bc 513 pc: 6,45). U drugoj točki su silaže Bc 462 i Bc 344 imale značajno različite pH-vrijednosti, dok su silaže Bc 513 pc bile slične i jednom i drugom hibridu. Silaže Bc 344 imaju signifikantno višu pH-vrijednost s obzirom na silaže ostalih

hibrida u trećoj točki. Na kraju ispitanog perioda siliranja silaže Bc 462 imale su signifikantno nižu pH-vrijednost naspram silaža ostalih dvaju hibrida (Bc 462: 4,12; Bc 344: 4,23; Bc 513 pc: 4,19).



Slika 20. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na pH u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti (P < 0,001) te sa značajnom razlikom u prvoj, drugoj, trećoj i sedmoj vremenskoj točki između pojedinih hibrida (P < 0,05; označeno s *).

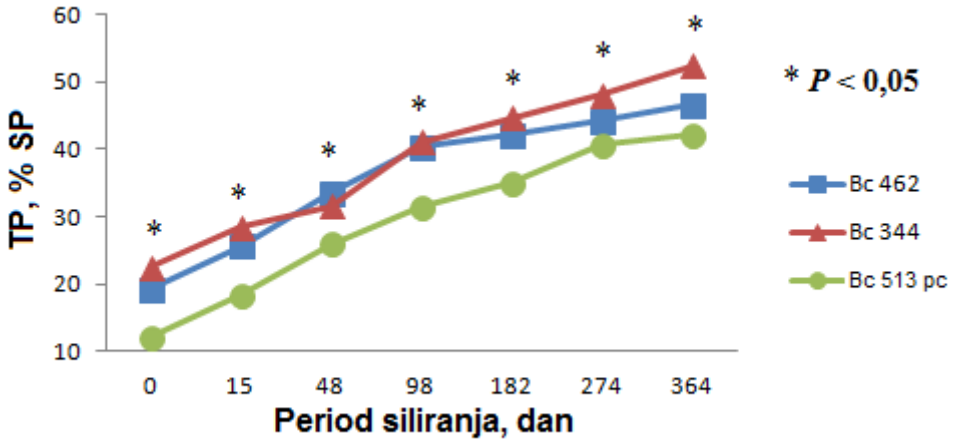
Sadržaj sirovog proteina u silažama ispitivanih hibrida pokazao je ujednačene vrijednosti tijekom perioda siliranja (slika 21.), osim što je u silažama hibrida Bc 462 u sedmoj vremenskoj točki sadržaj sirovog proteina bio statistički viši nego u ostalim točkama. Isto tako je u Bc 513 pc u četvrtoj vremenskoj točki zabilježena najviša vrijednost sirovog proteina. Zabilježena odstupanja u sadržaju sirovog proteina, iako minimalna, signifikantna su zbog niske ukupne standardne devijacije za interakciju hibrida i perioda siliranja (1,37 g/kg ST). U svim vremenskim točkama silaže hibrida Bc 513 pc imale su više sadržaje sirovog proteina u odnosu na ostala dva hibrida. Dodatno je u točkama dva, šest i sedam izmjerena statistički značajna razlika između silaža hibrida Bc 462 i Bc 344. U svim navedenim vremenskim točkama silaže hibrida Bc 462 imale su viši sadržaj sirovog proteina (točka 2: 107,87; točka 6: 109,95; točka 7: 113,50 g/kg ST) nego silaže Bc 344 (točka 2: 103,67; točka 6: 105,88; točka 7: 102,16 g/kg ST).



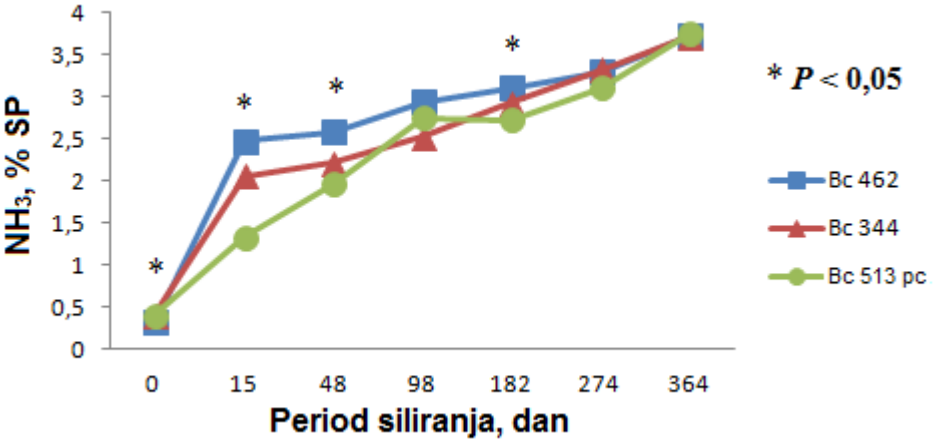
Slika 21. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na sadržaj sirovog proteina u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,05$) te sa značajnom razlikom u svim vremenskim točkama između pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

Udio topljivog proteina u ukupnom sirovom proteinu rastao je tijekom siliranja, iako su vrijednosti za silaže pojedinih hibrida bile različite u istim vremenskim točkama (slika 22.). U svim vremenskim točkama silaže hibrida Bc 513 pc imale su statistički značajno niže vrijednosti udjela topljivog proteina od silaža ostala dva hibrida. U točkama tri i četiri silaže hibrida Bc 462 i Bc 344 imale su slične vrijednosti udjela topljivog proteina (Bc 462, točka tri: 33,51%; Bc 344, točka tri: 31,54%; Bc 462, točka četiri: 40,38%; Bc 344, točka četiri: 41,08%). U ostalim točkama su silaže hibrida Bc 344 imale statistički značajno više vrijednosti topljivog proteina nego silaže hibrida Bc 462.

Slično kao trend zabilježen kod udjela topljivog proteina, udio amonijaka u ukupnom sirovom proteinu u silažama ispitivanih hibrida rastao je tijekom siliranja (slika 23.). U vremenskim točkama jedan, dva, tri i četiri udio amonijaka razlikovao se između silaža pojedinih hibrida ($P < 0,05$). U točki jedan silaže hibrida Bc 344 i Bc 513 pc imale su slične vrijednosti udjela amonijaka (Bc 344: 0,41%; Bc 513 pc: 0,40%) dok su silaže Bc 462 imale signifikantno niže vrijednosti (Bc 462: 0,31%). Udjeli amonijaka u silažama svih triju hibrida signifikantno su se razlikovali u drugoj točki. U točki tri, slično kao u točki jedan, silaže hibrida Bc 344 i Bc 513 pc imale su slične udjele amonijaka (Bc 344: 2,22%, Bc 513 pc: 1,96%). Silaže hibrida Bc 462 u točki tri imale su signifikantno više vrijednosti od silaža ostalih dvaju hibrida (Bc 462: 2,57%). U petoj točki silaže hibrida Bc 462 i Bc 344 imale su slične i signifikantno više udjele amonijaka nego silaže hibrida Bc 513 pc (Bc 462: 3,09%; Bc 344: 2,93%; Bc 513 pc: 2,72%).



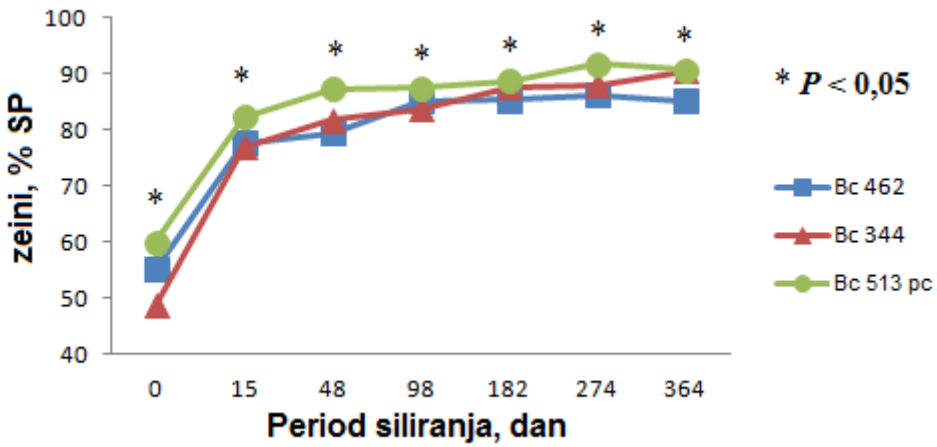
Slika 22. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na udio topljivog proteina u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,01$) te sa značajnom razlikom u svim vremenskim točkama između pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).



Slika 23. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na udio amonijaka u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u prvoj, drugoj, trećoj i petoj vremenskoj točki između pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

Udio ukupnih zeina u sirovom proteinu u silažama svih triju hibrida ponašao se u skladu s promjenama ustanovljenim pri utjecaju vremena siliranja na udio zeina u silažama (tablica 15.), gdje je zamijećen neočekivan porast u ukupnim zeinima u silažama

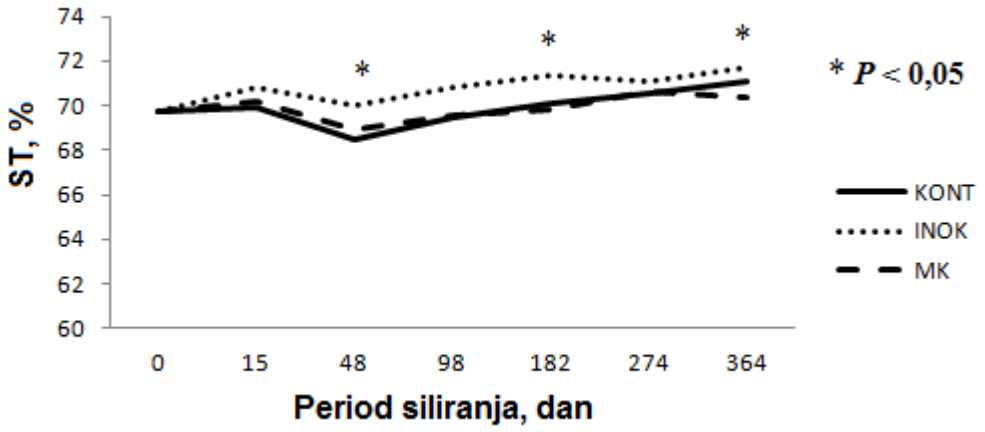
svih triju hibrida tijekom siliranja (slika 24.). Silaže hibrida Bc 513 pc imale su najviše vrijednosti ukupnih zeina u svim vremenskim točkama. U točki jedan silaže svih triju hibrida su se signifikantno razlikovale (Bc 462: 55,13%; Bc 344: 48,75%; Bc 513 pc: 59,96%). Vremenske točke dva i tri imale su slične odnose udjela ukupnih zeina, pa su u njima silaže hibrida Bc 513 pc imale statistički značajno više udjele zeina nego silaže ostala dva hibrida. U četvrtoj vremenskoj točki silaže hibrida Bc 344 i Bc 513 pc imale su signifikantno različite udjele ukupnih zeina, dok su se udjeli ukupnih zeina u silažama hibrida Bc 462 nalazili između tih razlika (Bc 462, točka četiri: 85,19%; Bc 344, točka četiri: 76,95%; Bc 513 pc, točka četiri: 87,39%). Silaže hibrida Bc 344 i Bc 513 pc imale su slične i signifikantno više udjele ukupnih zeina od silaža Bc 462 u vremenskim točkama pet i sedam. U šestoj vremenskoj točki silaže hibrida Bc 513 pc imale su signifikantno više udjele ukupnih zeina od silaža hibrida Bc 462 i Bc 344 (slika 24.).



Slika 24. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na udio zeina u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u svim vremenskim točkama između pojedinih hibrida ($P < 0,05$; označeno s *).

4.1.5. Utjecaj interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

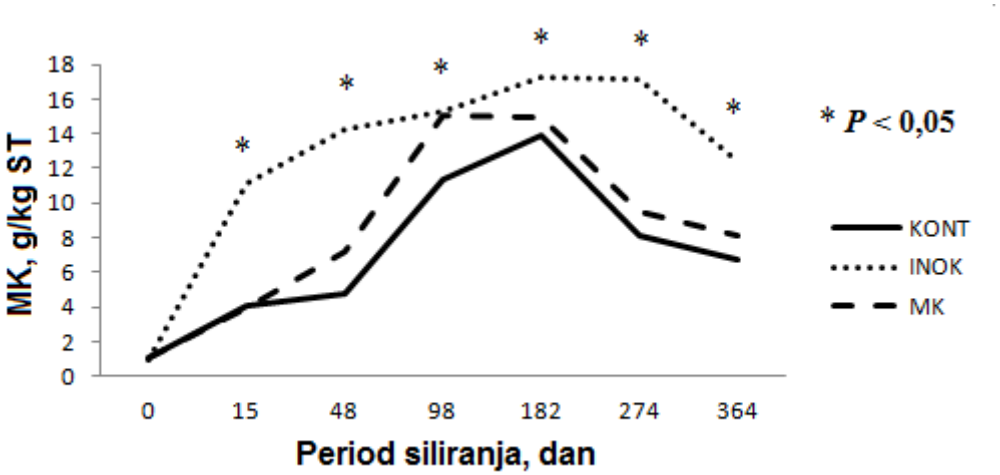
Vrijednosti suhe tvari (ST) minimalno su rasle tijekom siliranja te su najviše vrijednosti ST u silažama sa inokulantom iako ne u svim vremenskim točkama signifikantno. U točkama tri, pet i sedam zabilježena je signifikanta razlika ($P < 0,05$) između pojedinih tretmana (slika 25.). Trend zabilježen u interakciji dodataka silaži i perioda siliranja je u skladu s prethodno utvrđenim signifikantno većim sadržajem ST u silažama s inokulantom (tablica 14.). Silaže s inokulantom imale su signifikantno višu ST u trećoj točki od silaža s dodatkom mliječne kiseline i kontrolnih silaža (kontrola: 68,46%; inokulant: 69,99%; mliječna kiselina: 68,90%). U petoj i sedmoj točki silaže s dodatkom inokulanta imale su signifikantno višu ST od silaža s dodanom mliječnom kiselinom, ali ne i od kontrolnih silaža (kontrola, peta točka: 70,12%; inokulant, peta točka: 71,35%; mliječna kiselina, peta točka: 69,83%; kontrola, sedma točka: 71,10%; inokulant, sedma točka: 71,70%; mliječna kiselina, sedma točka: 70,33%).



Slika 25. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na sadržaj suhe tvari u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,05$) te sa značajnom razlikom u točki tri, pet i sedam između suhe tvari pojedinih dodataka ($P < 0,05$; označeno s *).

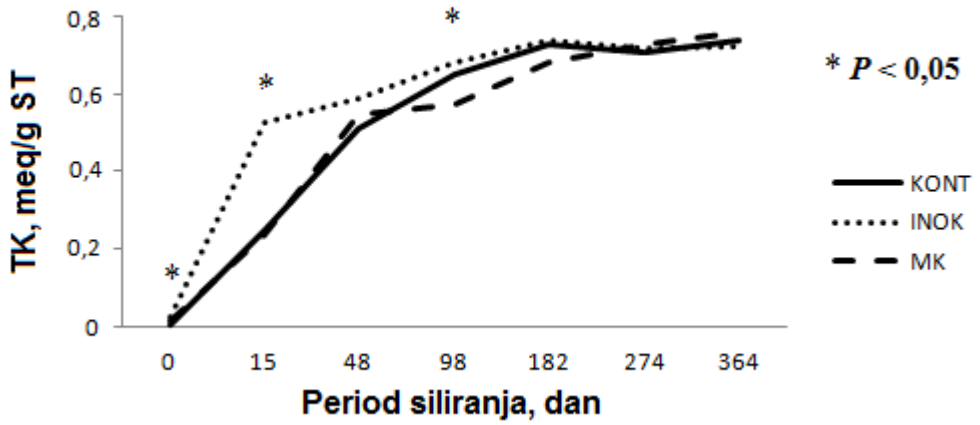
Sadržaj mliječne kiseline u ispitivanim silažama pokazivao je trend rasta s konsekutivnim padom nakon četvrte ili pete točke, ovisno o tipu dodatka (slika 26.). U silažama s inokulantom izmjereni su signifikantno najviši sadržaji mliječne kiseline u svim točkama osim u prvoj i četvrtoj. Silaže s inokulantom u četvrtoj točki imale su sličan

sadržaj mliječne kiseline kao i silaže s dodanom mliječnom kiselinom (inokulant: 15,29 g/kg ST; mliječna kiselina: 15,01 g/kg ST), a različite od kontrolnih silaža (11,37 g/kg ST). U prvoj točki sva tri tipa silaža imale su slične sadržaje mliječne kiseline (kontrola: 1,01 g/kg ST; inokulant: 0,91 g/kg ST; mliječna kiselina: 1,11 g/kg ST). Silaže s mliječnom kiselinom imale su niže sadržaje mliječne kiseline od silaža s inokulantom, ali više od kontrolnih silaža, iako su samo u trećoj i sedmoj točki te razlike bile signifikantne (kontrola, treća točka: 4,82; inokulant, treća točka: 14,25 g/kg ST; mliječna kiselina, treća točka: 7,21 g/kg ST; kontrola, sedma točka: 6,74 g/kg ST; inokulant, sedma točka: 12,43 g/kg ST; mliječna kiselina, sedma točka: 8,14 g/kg ST). Silaže s inokulantom imale su maksimalne vrijednosti mliječne kiseline u petoj točki (17,31 g/kg ST) iza koje je u šestoj vremenskoj točki izmjeren minimalni pad (17,16 g/kg ST). U sedmoj točki u silažama s inokulantom zabilježen je značajan pad u sadržaju mliječne kiseline. Kontrolne silaže imale su rast sadržaja mliječne kiseline do pete točke u kojoj je zabilježena maksimalna vrijednost (13,90 g/kg ST). Nakon pete točke izmjeren je pad ($P < 0,05$) u sadržaju mliječne kiseline u šestoj točki (8,10 g/kg ST). Trend pada mliječne kiseline u kontrolnim silažama nastavio se i u sedmoj točki, iako bez statističke signifikantnosti. Silaže s dodanom mliječnom kiselinom imale su rast u sadržaju mliječne kiseline do četvrte vremenske točke, gdje je zabilježena maksimalna vrijednost. U petoj točki zabilježen je minimalni pad u sadržaju mliječne kiseline (14,93 g/kg ST) iza čega je u šestoj točki slijedio signifikantan pad (9,54 g/kg ST) koji se nastavio i u sedmoj točki (8,13 g/kg ST).



Slika 26. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na sadržaj mliječne kiseline u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u sadržaju mliječne kiseline u pojedinim tretmanima (s različitim silažnim dodacima) u svim vremenskim točkama osim u prvoj točki ($P < 0,05$; označeno s *).

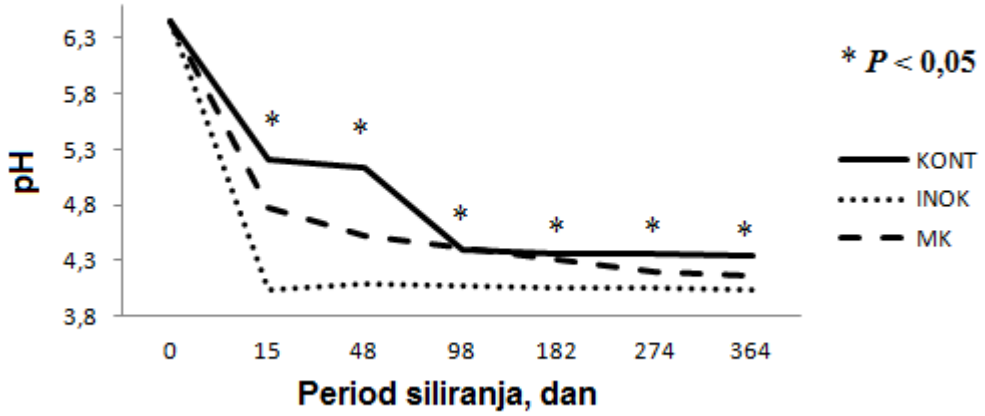
Titracijska kiselost pokazala je slične promjene bez obzira na tip dodataka silaži koje su utvrđene i utjecajem samo perioda siliranja (tablica 15.). Titracijska kiselost u svim trima tretmanima rasla je do pete vremenske točke nakon koje je utvrđena stagnacija u vrijednostima titracijske kiselosti. U vremenskim točkama jedan, dva i tri izmjerene su signifikantne razlike između titracijske kiselosti silaža s različitim dodacima (slika 27.). Titracijska kiselost u prvoj točki bila je signifikantno različita između silaža s inokulantom i kontrolnih silaža, dok su silaže s mliječnom kiselinom imale vrijednosti između tih razlika (kontrola: 0,0049; inokulant: 0,027; mliječna kiselina: 0,017 meq/g ST). U drugoj točki silaže s inokulantom imale su signifikantno višu titracijsku kiselost nego silaže s mliječnom kiselinom i kontrolne silaže (kontrola: 0,25; inokulant: 0,53; mliječna kiselina: 0,51 meq/g ST). Silaže s dodatkom inokulanta i dodatkom mliječne kiseline signifikantno su se razlikovale u četvrtoj točki u titracijskoj kiselosti, dok su se kontrolne silaže nalazile između njih (kontrola: 0,65; inokulant: 0,68; mliječna kiselina: 0,57 meq/g ST).



Slika 27. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na titracijsku kiselost u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u titracijskoj kiselosti u pojedinim tretmanima (s različitim silažnim dodacima) u prvoj, drugoj i četvrtoj točki ($P < 0,05$; označeno s *).

Vrijednost pH u svima trima tretmanima s različitim silažnim dodacima ili bez istih ponašala se u skladu s utvrđenim utjecajem perioda siliranja na pH (tablica 15.), iako je odaziv s obzirom na tip dodataka bio različiti (slika 28.). Silaže s dodatkom inokulanta imale su signifikantno niži pH u drugoj, četvrtoj i petoj točki nego silaže ostalih dvaju tretmana. U trećoj i sedmoj točki silaže svih triju tipova su se signifikantno razlikovale, s

time da su silaže s inokulantom imale najniži pH, a kontrolne silaže najviši pH (kontrola: 4,78; inokulant: 4,09; mliječna kiselina: 4,52; kontrola, sedma: 4,35; inokulant, sedma: 4,03; mliječna kiselina, sedma: 4,17). Silaže s dodanim inokulantom i silaže s dodanom mliječnom kiselinom u šestoj vremenskoj točki imale su signifikantno niže pH nego kontrolne silaže (kontrola: 4,37; inokulant: 4,06; mliječna kiselina: 4,20). Kao što je vidljivo sa slike 28., silaže s inokulantom u svim vremenskim točkama imale su najniže vrijednosti, a kontrolne silaže najviše vrijednosti pH.

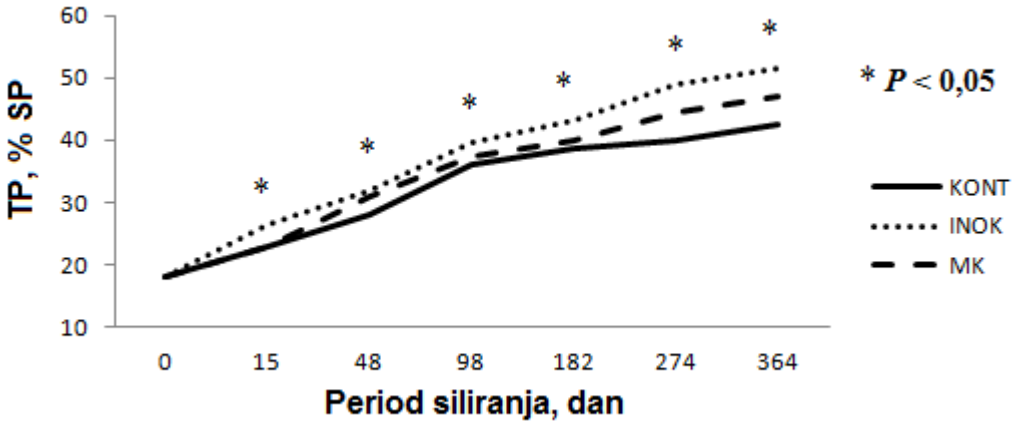


Slika 28. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na pH u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti (P < 0,001) te sa značajnom razlikom u pH u pojedinim tretmanima (s različitim silažnim dodacima) u svim točkama osim u prvoj točki (P < 0,05; označeno s *).

Na sadržaj sirovog proteina interakcija dodatka silaži i perioda siliranja nije imala signifikantan utjecaj (P = 0,133, nije grafički prikazano). U svim vremenskim točkama, osim u sedmoj, nije zabilježena signifikantna razlika između silaža s dodatkom inokulanta ili dodatkom mliječne kiseline s kontrolnima silažama iako su u svim točkama silaže s dodatkom inokulanta imale najniže, a kontrolne silaže najveće sadržaje sirovog proteina.

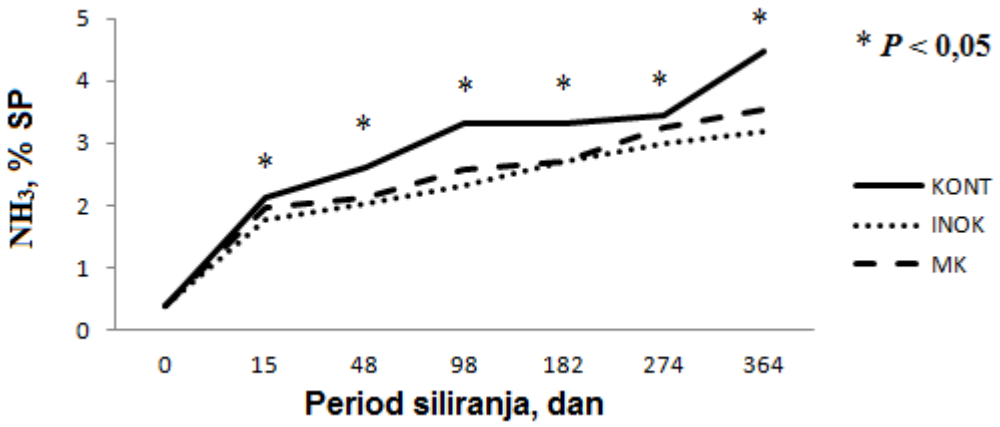
Udio topljivog proteina imao je rast tijekom perioda siliranja (tablica 15.), iako su relativna vrijednost udjela topljivog proteina i zabilježen rast varirali u pojedinim vremenskim točkama između tipova dodataka i kontrolnih silaža (slika 29.). U vremenskim točkama dva i pet udjeli topljivog proteina bili su signifikantno viši u silažama s inokulantom nego u silažama s dodatkom mliječne kiseline i kontrolnim silažama. Udio topljivog proteina u vremenskoj točki tri u kontrolnim silažama bio je signifikantno niži od udjela u silažama s dodatkom inokulanta ili mliječne kiseline. U četvrtoj točki, slično kao i

u trećoj, udio topljivog proteina bio je signifikantno viši u silažama s inokulantom nego u kontrolnim silažama. Udjeli topljivog proteina u zadnje dvije vremenske točke bili su signifikantno različiti između testiranih tretmana. Tijekom siliranja silaže s inokulantom imale su najviše udjele topljivog proteina, a kontrolne silaže najniže.

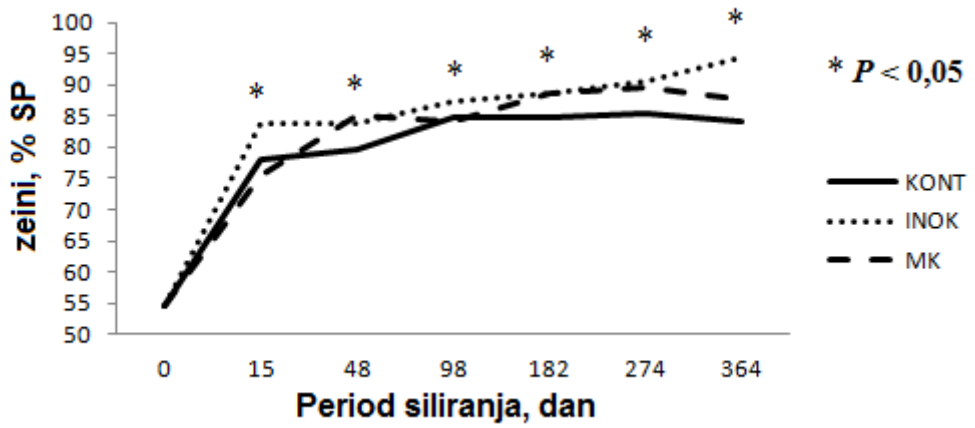


Slika 29. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na udio topljivog proteina u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u udjelu topljivog proteina u pojedinim tretmanima (s različitim silažnim dodacima) u svim točkama osim u prvoj točki ($P < 0,05$; označeno s *).

Udio amonijaka u sirovom proteinu ispitivanih silaža pokazao je rast tijekom perioda siliranja neovisno o tipu dodatka silaži (slika 30.), iako su se relativne vrijednosti udjela razlikovale u pojedinim vremenskim točkama između dodataka. Vremenske točke dva i šest imale su signifikantnu razliku u udjelima amonijaka između silaža s dodatkom inokulanta i kontrolnih silaža. U točkama tri, četiri i pet u kontrolnim silažama izmjereni su signifikantno veći udjeli amonijaka nego u silažama s dodatkom inokulanta ili mliječne kiseline. Silaže s dodatkom inokulanta ili mliječne kiseline kao i kontrolne silaže su se međusobno signifikantno razlikovale u udjelima amonijaka u sedmoj vremenskoj točki (kontrola, točka sedam: 4,46% SP; inokulant, točka sedam: 3,18% SP; mliječna kiselina, točka sedam: 3,55% SP). Općenito su u svim vremenskim točkama silaže s inokulantom imale najniže udjele amonijeke, a kontrolne silaže najviše: zapažene interakcije su u skladu s prethodno ustanovljenim utjecajem dodataka (tablica 14.) i perioda siliranja (tablica 15.) na udio amonijaka u ispitivanim silažama.



Slika 30. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na udio amonijaka u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u udjelu amonijaka u pojedinim tretmanima (s različitim silažnim dodacima) u svim točkama osim u prvoj točki ($P < 0,05$; označeno s *).



Slika 31. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na udio zeina u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te sa značajnom razlikom u udjelu zeina u pojedinim tretmanima (s različitim silažnim dodatcima) u svim točkama osim u prvoj točki ($P < 0,05$; označeno s *).

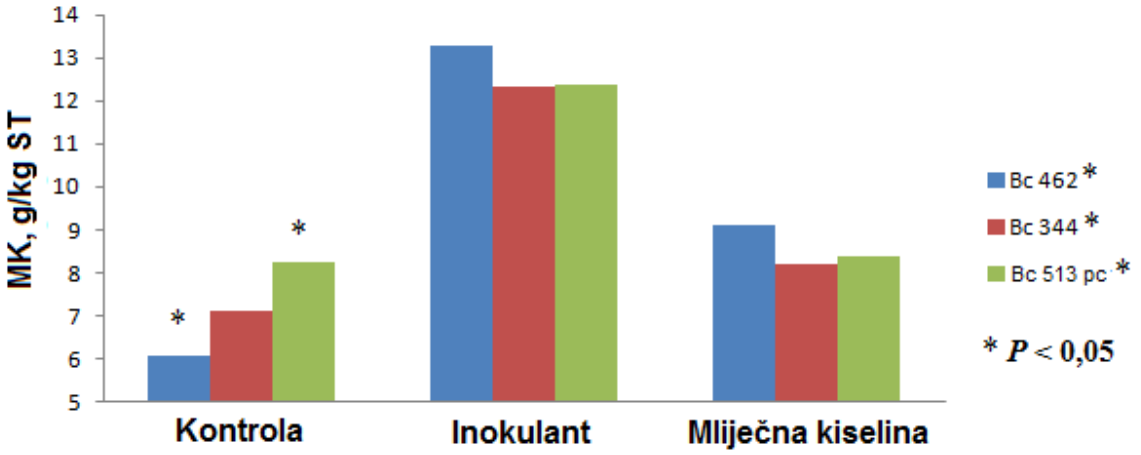
Udio zeina u sirovom proteinu imao je neočekivan rast u svim silažama, iako je zabilježena statistički značajna razlika između tretmana u pojedinim vremenskim točkama (slika 31.). U vremenskoj točki dva silaže s dodatkom inokulanta imale su signifikantno

veći udio ukupnih zeina od ostala dva tipa silaža (kontrola: 77,91% SP; inokulant: 83,65% SP; mliječna kiselina: 75,37% SP). Udio zeina bio je sličan između silaža s dodatkom inokulanta i mliječne kiseline te veći nego u kontrolnim u točkama tri, pet i šest (kontrola, točka tri: 79,68% SP; inokulant, točka tri: 83,75% SP; mliječna kiselina, točka tri: 85,12% SP; kontrola, točka pet: 84,65% SP; inokulant, točka pet: 88,60% SP; mliječna kiselina, točka pet: 88,52% SP; kontrola, točka šest: 85,51% SP; inokulant, točka šest: 90,59% SP; mliječna kiselina, točka šest: 89,74% SP). Silaže s dodatkom inokulanta statistički su se razlikovale u udjelima ukupnih zeina od silaža s dodanom mliječnom kiselinom u točki četiri, dok su kontrole bile između njih (kontrola: 84,71% SP; inokulant: 87,35% SP; mliječna kiselina: 84,13% SP). U sedmoj vremenskoj točki sva tri tipa silaža imale su signifikantno različite udjele ukupnih zeina (kontrola: 84,16% SP; inokulant: 94,42% SP; mliječna kiselina: 87,76 %SP).

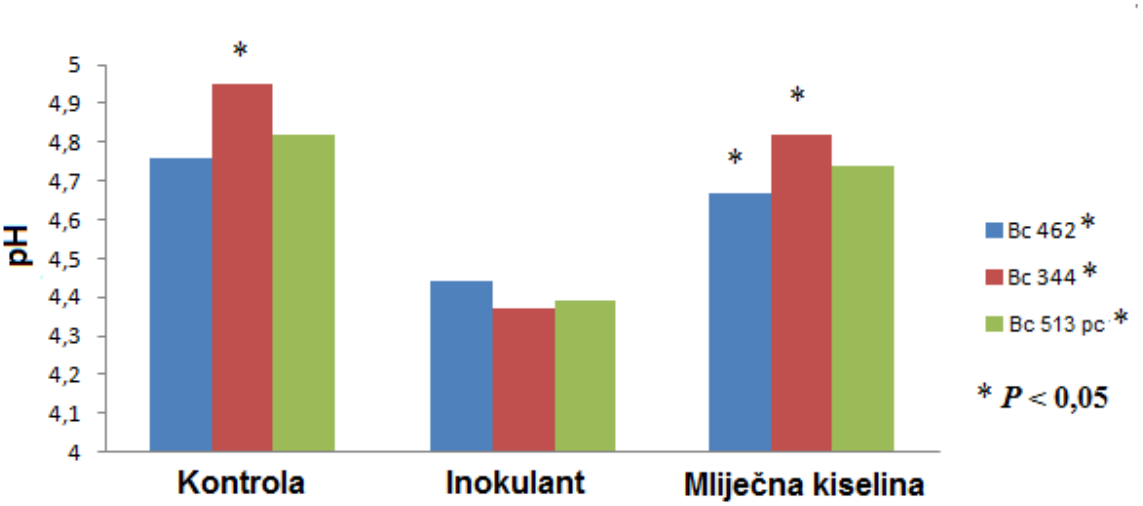
4.1.6. Utjecaj interakcije hibrida kukuruza i dodataka silaži na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

Interakcija hibrida kukuruza i dodataka silaži bila je signifikantna u sadržaju mliječne kiseline, pH-vrijednosti te u udjelima amonijaka i ukupnim zeinima. U ostalim parametrima nije primijećen utjecaj ove interakcije.

Silaže triju hibrida imale su različiti odgovor na tip dodataka silaži s obzirom na sadržaj mliječne kiseline. Najviši sadržaji mliječne kiseline u silažama izmjereni su u silažama s dodatkom inokulanta bez obzira na tip hibrida (slika 32.). No dok je u silažama hibrida Bc 462 izmjerena signifikantna razlika između sva tri tretmana (Bc 462, kontrola: 6,08 g/kg ST; Bc 462, inokulant: 13,29 g/kg ST; Bc 462, mliječna kiselina: 9,12 g/kg ST) u ostalim dvama hibridima odgovor je bio drugačiji. Tako u hibridima Bc 344 i Bc 513 pc nije ustanovljena signifikantna razlika u sadržaju mliječne kiseline između kontrolnih silaža i silaža s dodatkom mliječne kiseline, već samo u odnosu na silaže s inokulantom (Bc 344, kontrola: 7,10 g/kg ST; Bc 344, inokulant: 12,33 g/kg ST; Bc 344, mliječna kiselina: 8,18 g/kg ST; Bc 513 pc, kontrola: 8,25 g/kg ST; Bc 513 pc, inokulant: 12,28 g/kg ST; Bc 513 pc, mliječna kiselina: 8,36 g/kg ST). Dodatno u kontrolnim silažama ustanovljena je i signifikantna razlika između Bc 513 pc i Bc 462 u sadržajima mliječne kiseline dok u ostalim tretmanima nije zabilježena razlika između hibrida.



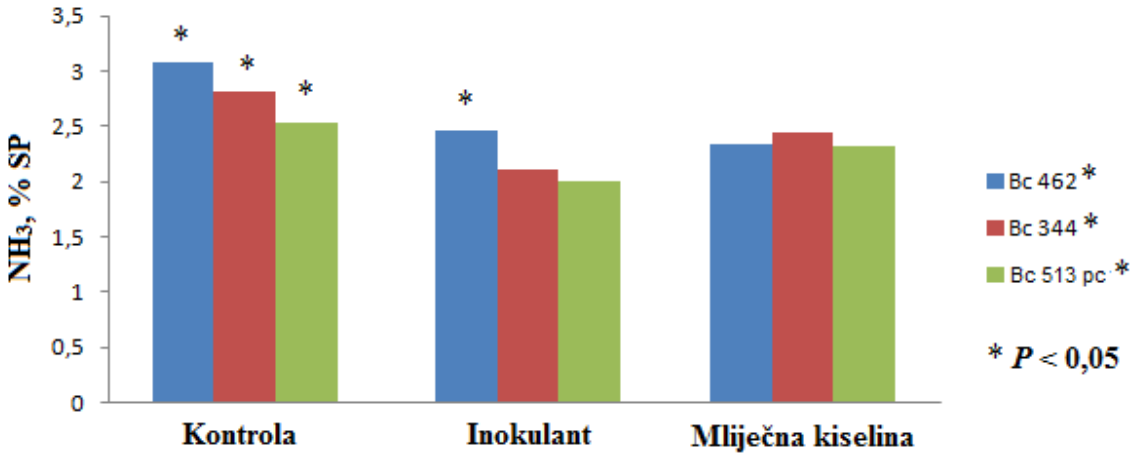
Slika 32. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i dodataka silaži na sadržaj mliječne kiseline u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,05$) te s naznačenom razlikom u sadržaju mliječne kiseline u pojedinim tipovima silažnih dodataka ili hibridima ($P < 0,05$; označeno s *).



Slika 33. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i dodataka silaži na pH u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te s naznačenom razlikom u pH u pojedinim tipovima silažnih dodataka ili hibridima ($P < 0,05$; označeno s *).

Silaže hibrida Bc 462 i Bc 344 imale su sličan odgovor na tip dodataka silaži sa signifikantnom razlikom između sva tri tipa tretmana u vrijednosti pH (Bc 462, kontrola: 4,76; Bc 462, inokulant: 4,44; Bc 462, mliječna kiselina: 4,67; Bc 344, kontrola: 4,95; Bc

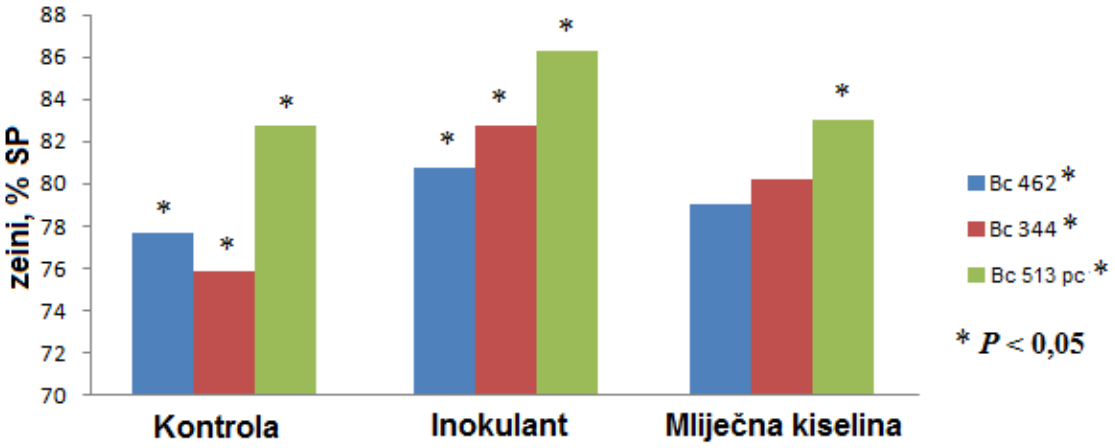
344, inokulant: 4,38; Bc 344, mliječna kiselina: 4,82). Silaže hibrida Bc 513 pc imale su nešto drugačiji odgovor sa silažama s dodatkom mliječne kiseline i kontrolnim silažama sličnih vrijednosti pH koje su bile signifikantno više od vrijednosti pH u silažama s dodatkom inokulanta (kontrola: 4,82; inokulant: 4,39; mliječna kiselina: 4,74). Silaže pojedinih hibrida s dodatkom inokulanta nisu se statistički razlikovale. Dodatak mliječne kiseline rezultirao je signifikantno različitim odgovorom između silaža Bc 462 i Bc 344. Isto tako je u kontrolnim silažama hibrid Bc 344 imao signifikantno viši pH od ostala dva hibrida (slika 33.).



Slika 34. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i dodataka silaži na udio amonijaka u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,01$) te s naznačenom razlikom u udjelu amonijaka u pojedinim tipovima silažnih dodataka ili hibridima ($P < 0,05$; označeno s *).

Što se tiče udjela amonijaka u sirovom proteinu, odgovor svih triju hibrida na tip dodataka silaži bio je različit. Tako su u Bc 462 kontrolne silaže imale signifikantno viši udio amonijaka od ostala dva tipa silaža (kontrola: 3,07% SP; inokulant: 2,47% SP; mliječna kiselina: 2,33% SP). Dodatno u Bc 462 silaže s dodatkom mliječne kiseline imale su najniži udio amonijaka (iako ne signifikantno s obzirom na silaže s inokulantom). U ostalim dvama hibridima silaže s dodatkom inokulanta imale su najniži udio amonijaka. Silaže hibrida Bc 344 imale su signifikantno različite udjele amonijaka između sva tri tretmana s najvišim udjelom amonijaka u kontrolnim silažama, a najnižim u silažama s inokulantom (kontrola: 2,82%; inokulant: 2,11% SP; mliječna kiselina: 2,45%). U hibridu Bc 513 pc silaže s dodatkom inokulanta imale su signifikantno niže udjele amonijaka od

ostala dva tipa silaža (kontrola: 2,54% SP; inokulant: 2,01% SP; mliječna kiselina: 2,32% SP). Silaže pojedinih hibrida nisu se razlikovale s obzirom na dodatak mliječne kiseline, ali su kontrolne silaže svih triju hibrida bile signifikantno različite. Kontrolne silaže hibrida Bc 462 imale su najviše udjele amonijaka, a silaže Bc 513 pc najniže. Isto tako su silaže s dodatkom inokulanta hibrida Bc 462 imale signifikantno više amonijaka od silaža sa inokulantom ostalih dvaju hibrida (slika 34.).



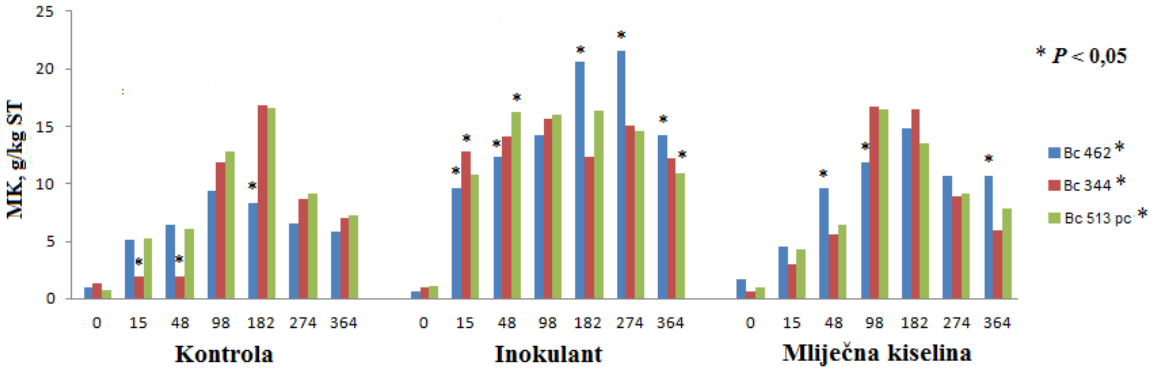
Slika 35. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i dodataka silaži na udio zeina u sirovom proteinu u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,01$) te s naznačenom razlikom u udjelu amonijaka u pojedinim tipovima silažnih dodataka ili hibridima ($P < 0,05$; označeno s *).

Udio ukupnih zeina u sirovom proteinu bio je različit u silažama svih triju hibrida s obzirom na tip dodatka silažama. Silaže s dodatkom inokulanta hibrida Bc 462 imale su signifikantno viši udio zeina od kontrolnih silaža hibrida Bc 462 (kontrola: 77,67% SP; inokulant: 80,79% SP; mliječna kiselina: 79,03% SP). Sva tri tretmana u silažama hibrida Bc 344 imale su signifikantno različite udjele zeina s najvišim vrijednostima u silažama s dodatkom inokulanta, a najnižim u kontrolnim silažama (kontrola: 75,82% SP; inokulant: 82,76% SP; mliječna kiselina: 80,29% SP). U hibridu Bc 513 pc silaže s dodatkom inokulanta imale su signifikantno više udjele ukupnih zeina od ostalih dvaju tipova silaža (kontrola: 82,74% SP; inokulant: 86,29% SP; mliječna kiselina: 83,03% SP). Kontrolne silaže svih triju tipova hibrida imale su najniže vrijednosti ukupnih zeina od svih tretmana (slika 35.). Sva tri hibrida imala su različite udjele zeina u silažama s dodatkom inokulanta

i kontrolnim silažama, dok je Bc 513 pc imao u silažama s dodatkom mliječne kiseline signifikantno više udjele zeina od ostalih dvaju hibrida.

4.1.7. Utjecaj interakcije hibrida kukuruza, dodataka silaži i perioda siliranja na parametre kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

Interakcija hibrida kukuruza, dodataka silaži i perioda siliranja bila je signifikantna u sadržaju mliječne kiseline, titracijskoj kiselosti te u udjelima topljivih proteina i amonijaka. U ostalim parametrima nije primijećen utjecaj ove interakcije.



Slika 36. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza, dodataka silaži i perioda siliranja na sadržaj mliječne kiseline (MK) u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti (P < 0,001) te s naznačenim razlikama u sadržaju mliječne kiseline ovisno o tipu silažnih dodataka ili hibrida u pojedinim vremenskim točkama (P < 0,05; označeno s *).

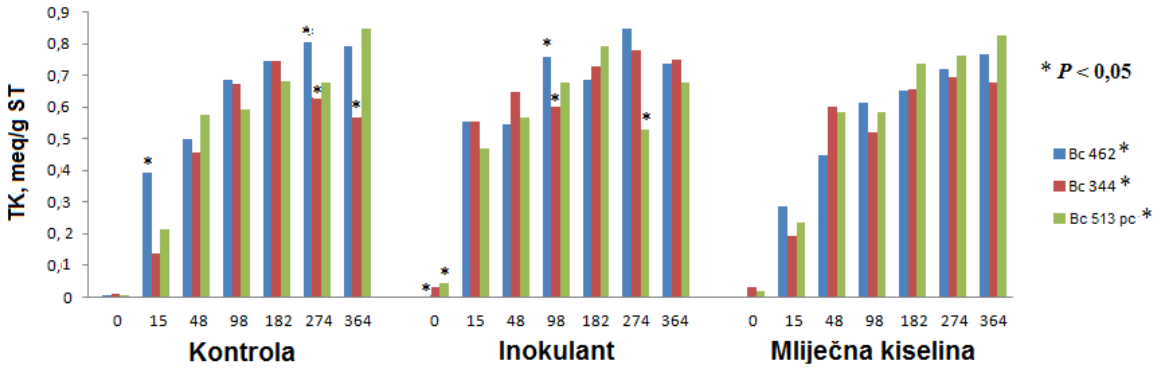
Sadržaj mliječne kiseline u silažama različitih hibrida i tretmana pratio je osnovni trend zabilježen kod utjecaja perioda siliranja na sadržaj mliječne kiseline u silažama (tablica 15.) ali su relativne vrijednosti varirale ovisno o hibridu i tretmanu u nekim vremenskim točkama. Početkom siliranja (0. dan) izmjerene su ujednačene vrijednosti sadržaja mliječne kiseline u silažama neovisno o upotrijebljenom hibridu ili dodatku silaži. U drugoj vremenskoj točki (15. dan) zabilježen je ujednačen odgovor svih triju hibrida na dodatke silaži. Silaže s dodatkom inokulanta imale su signifikantno veći sadržaj mliječne kiseline u odnosu na ostala dva tretmana u svima trima hibridima kukuruza (slika 36.). Ako se gledao utjecaj hibrida u pojedinim tretmanima u drugoj vremenskoj točki, onda je u

silažama s dodatkom inokulanta utvrđena signifikantna razlika između Bc 462 i Bc 344, dok su se silaže Bc 513 pc nalazile između njih (Bc 462: 9,62 g/kg ST; Bc 344: 12,85 g/kg ST; Bc 513 pc: 10,78 g/kg ST). Kontrolne silaže imale su signifikantno veće sadržaje mliječne kiseline u silažama Bc 462 i Bc 513 pc u odnosu na silaže hibrida Bc 344 (Bc 462: 5,11 g/kg ST; Bc 344: 1,94 g/kg ST; Bc 513 pc: 5,19 g/kg ST). U trećoj vremenskoj točki (48. dan) odgovor svih triju hibrida bio je različit ovisno o upotrijebljenom dodatku. Silaže hibrida Bc 462 imale su slične sadržaje mliječne kiseline u silažama s dodatkom inokulanta i mliječne kiseline čije su vrijednosti bile signifikantno veće od kontrolnih silaža (kontrola: 6,44 g/kg ST; inokulant: 12,33 g/kg ST; mliječna kiselina: 9,64 g/kg ST). Silaže hibrida Bc 344 u trećoj vremenskoj točki imale su signifikantno različite sadržaje mliječne kiseline između tretmana, silaže s dodatkom inokulanta imale su maksimalne vrijednosti, a kontrolne silaže minimalne (kontrola: 1,89 g/kg ST; inokulant: 14,15 g/kg ST; mliječna kiselina: 5,59 g/kg ST). U trećoj vremenskoj točki silaže hibrida Bc 513 pc imale su signifikantno veće sadržaje mliječne kiseline u silažama s dodatkom inokulanta u odnosu na ostala dva tretmana (kontrola: 6,12 g/kg ST; inokulant: 16,28 g/kg ST; mliječna kiselina: 6,39 g/kg ST). U silažama s dodatkom inokulanta zabilježena je statistički značajna razlika u sadržaju mliječne kiseline između hibrida Bc 462 i Bc 344: hibrid Bc 462 imao je minimalne, a Bc 344 maksimalne vrijednosti mliječne kiseline. Kontrolne silaže hibrida Bc 462 i Bc 513 pc imale su signifikantno veće sadržaje mliječne kiseline od silaža Bc 344. Silaže s dodatkom mliječne kiseline imale su signifikantno veće sadržaje mliječne kiseline u Bc 462 nego u ostala dva hibrida. U četvrtoj vremenskoj točki (98. dan) odgovor hibrida na dodatke silažama bio je različit između ispitanih hibrida. Hibrid Bc 462 imao je signifikantno veće sadržaje mliječne kiseline u silažama s dodatkom inokulanta od kontrolnih silaža, dok su se silaže s dodatkom mliječne kiseline nalazile između (kontrola: 9,41 g/kg ST; inokulant: 14,22 g/kg ST; mliječna kiselina: 11,84 g/kg ST). U hibridu Bc 344 silaže s dodatkom inokulanta i mliječne kiseline imale su slične i signifikantno veće sadržaje mliječne kiseline od kontrolnih silaža (kontrola: 11,89 g/kg ST; inokulant: 15,62 g/kg ST; mliječna kiselina: 16,75 g/kg ST). Silaže Bc 513 pc nisu imale signifikantnu razliku s obzirom na upotrijebljene dodatke u sadržajima mliječne kiseline (kontrola: 12,81 g/kg ST; inokulant: 16,05 g/kg ST; mliječna kiselina: 16,42 g/kg ST). Što se tiče utjecaja hibrida u pojedinim tretmanima, u silažama s dodatkom inokulanta i kontrolnim silažama nije utvrđena razlika između hibrida kukuruza. U silažama s dodatkom mliječne kiseline silaže hibrida Bc 462 imale su signifikantno niže sadržaje mliječne kiseline od ostala dva hibrida. Isto tako je i u petoj vremenskoj točki (182. dan) utvrđena razlika u odgovoru hibrida Bc 462 na dodatke u odnosu na ostala dva hibrida. Hibrid Bc 462 imao je signifikantnu razliku između sva tri tretmana, s time da su silaže s dodatkom inokulanta imale najveći sadržaj mliječne kiseline, a kontrolne najmanji (kontrola: 8,27 g/kg ST;

inokulant: 20,57 g/kg ST; mliječna kiselina: 14,85 g/kg ST). U silažama ostalih dvaju hibrida nije utvrđena signifikantna razlika između tretmana (Bc 344, kontrola: 16,88 g/kg ST; Bc 344, inokulant: 15,06 g/kg ST; Bc 344, mliječna kiselina: 16,43 g/kg ST; Bc 513 pc, kontrola: 16,55 g/kg ST; Bc 513 pc, inokulant: 16,29 g/kg ST; Bc 513 pc, mliječna kiselina: 16,42 g/kg ST). U silažama s dodatkom inokulanta hibrid Bc 462 imao je signifikantno više sadržaje mliječne kiseline od ostalih dvaju hibrida. Signifikantno niži sadržaj mliječne kiseline u hibridu Bc 462 utvrđen je kod kontrolnih silaža. U silažama s dodatkom mliječne kiseline nije utvrđena signifikantna razlika između tretmana. Silaže hibrida Bc 462 signifikantno su se međusobno razlikovale ovisno o upotrijebljenim dodacima u šestoj vremenskoj točki (274. dan) s maksimalnim vrijednostima u silažama s inokulantom, a minimalnim u kontrolnim silažama (kontrolna: 6,48 g/kg ST; inokulant: 21,52 g/kg ST; mliječna kiselina: 10,64 g/kg ST). Silaže ostalih dvaju hibrida imale su signifikantno više udjele u silažama s dodatkom inokulanta u odnosu na ostala dva tretmana (Bc 344, kontrola: 8,72 g/kg ST; Bc 344, inokulant: 15,35 g/kg ST; mliječna kiselina: 8,87 g/kg ST; Bc 513 pc, kontrola: 9,10 g/kg ST; Bc 513 pc, inokulant: 14,59 g/kg ST; Bc 513 pc, mliječna kiselina: 9,12 g/kg ST). U šestoj točki nije bilo razlike u hibridima kukuruza u silažama s dodatkom mliječne kiseline i kontrolnim silažama, dok su u silažama s dodatkom inokulanta silaže hibrida Bc 462 imale signifikantno viši sadržaj mliječne kiseline od ostalih dvaju hibrida. U sedmoj vremenskoj točki (364. dan) silaže s dodatkom inokulanta imale su signifikantno različite vrijednosti u silažama hibrida Bc 462 i Bc 513 pc. Kontrolne silaže nisu bilježile signifikantnu razliku između hibrida, dok su u silažama s dodatkom mliječne kiseline silaže hibrida Bc 462 imale signifikantno višu mliječnu kiselinu nego silaže ostalih dvaju hibrida kukuruza (slika 36.).

Općenito je rast titracijske kiselosti u ispitivanim silažama svih hibrida i dodataka tijekom vremena bio u skladu s utvrđenim utjecajem perioda siliranja na titracijsku kiselost (tablica 15.). Iznimka su kontrolne silaže hibrida Bc 344 koje su imale blagi pad u titracijskoj kiselosti u zadnja dva uzorkovanja (vremenske točke) te silaže s dodatkom mliječne kiseline i kontrolne silaže hibrida Bc 513 pc koje su zabilježile blagi rast u zadnje dvije vremenske točke. Isto kao i u sadržaju mliječne kiseline u silažama, titracijska kiselost silaža varirala je ovisno o tipu hibrida i tretmana u nekim vremenskim točkama (slika 37.). U prvoj vremenskoj točki nije utvrđena signifikantna razlika između tretmana u silažama hibrida Bc 462 i Bc 344. Silaže hibrida Bc 513 pc imale su signifikantnu razliku između silaža s dodatkom inokulanta i kontrolnim silažama, dok se silaže s dodatkom mliječne kiseline nalaze između (kontrola: 0,006; inokulant: 0,045; mliječna kiselina: 0,019 meq/g ST). Što se tiče utjecaja hibrida unutar pojedinih tretmana, kontrolne silaže i silaže s dodatkom mliječne kiseline nisu imale signifikantnu razliku između hibrida. S druge strane silaže s dodatom inokulanta imale su signifikantnu razliku između silaža hibrida Bc

462 i Bc 513 pc. U drugoj vremenskoj točki silaže svih triju hibrida imale su signifikantno veću titracijsku kiselost u silažama s dodatkom inokulanta u odnosu na ostala dva tretmana (Bc 462 kontrola: 0,391; Bc 462 inokulant: 0,555; Bc 462 mliječna kiselina: 0,286; Bc 344, kontrola: 0,139; Bc 344, inokulant: 0,555; Bc 344, mliječna kiselina: 0,192; Bc 513 pc, kontrola: 0,213; Bc 513 pc, inokulant: 0,469; Bc 513 pc, mliječna kiselina: 0,235 meq/g ST). Jedino su kontrolne silaže imale signifikantnu razliku uvjetovanu tipom hibrida, pri čemu su silaže hibrida Bc 462 imale signifikantno višu titracijsku kiselost naspram ostala dva hibrida. U trećoj i petoj vremenskoj točki nije utvrđena signifikantna razlika između titracijske kiselosti ispitivanih silaža, bilo ovisno o hibridu, bilo da se radi o dodatku upotrijebljenom za siliranje. U četvrtoj vremenskoj točki nije utvrđena signifikantna razlika u titracijskoj kiselosti silaža pojedinih hibrida ovisno o upotrijebljenim dodatcima. Signifikantnost je utvrđena u silažama s dodatkom inokulanta u kojima su silaže hibrida Bc 462 imale signifikantno višu titracijsku kiselost od silaža ostalih dvaju hibrida (Bc 462: 0,757; Bc 344: 0,601; Bc 513 pc: 0,672 meq/g ST). U šestoj vremenskoj točki (274. dan) silaže svih triju hibrida imale su različit odgovor na upotrijebljene dodatke silaži. Tako su silaže hibrida Bc 462 imale signifikantnu razliku između silaža s dodatkom inokulata i mliječne kiseline, dok su titracijske kiselosti kontrolnih silaža bile između (kontrola: 0,807; inokulant: 0,847; mliječna kiselina meq/g ST). Silaže hibrida Bc 344 imale su signifikantnu razliku između silaža s dodatkom inokulanta i kontrolnih silaža (kontrola: 0,633; inokulant: 0,778; mliječna kiselina: 0,693 meq/g ST). Dodatak inokulanta u silažama hibrida Bc 513 pc rezultirao je signifikantno nižom titracijskom kiselosti nego u silažama ostala dva tretmana (kontrola: 0,676; inokulant: 0,529; mliječna kiselina: 0,764 meq/g ST). U silažama s dodatkom inokulanta silaže hibrida Bc 513 pc imale su signifikantno nižu titracijsku kiselost od silaža ostalih dvaju hibrida, dok su u kontrolnim silažama silaže hibrida Bc 462 i Bc 344 imale signifikantno različitu titracijsku kiselost. Dodatak mliječne kiseline nije imao različit efekt na silaže triju ispitana hibrida. U sedmoj vremenskoj točki (364. dan) nije utvrđena signifikantna razlika u titracijskoj kiselosti silaža hibrida Bc 462 i Bc 513 pc. Silaže trećeg hibrida, Bc 344, imale su signifikantnu razliku u titracijskoj kiselosti između silaža s dodatkom inokulanta i kontrolnim silažama (kontrola: 0,569; inokulant: 0,749; mliječna kiselina: 0,677 meq/g ST). Dodatak inokulanta i mliječne kiseline nije signifikantno utjecao na odgovor silaža ispitivanih hibrida i njihovu titracijsku kiselost. U kontrolnim silažama hibrida Bc 344 utvrđena je signifikantno niža titracijska kiselost u odnosu na ostala dva hibrida.

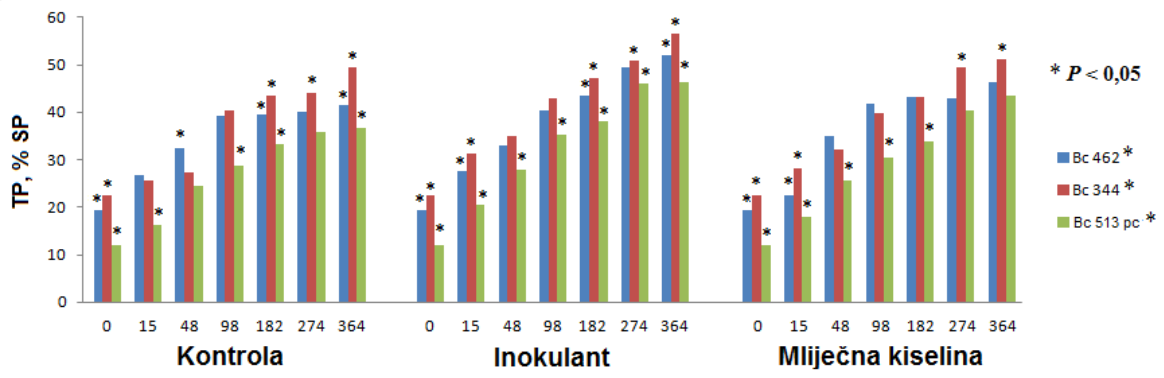


Slika 37. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza, dodataka silaži i perioda siliranja na titracijsku kiselost (TK) u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te s naznačenim razlikama u titracijskoj kiselosti ovisno o tipu silažnih dodataka ili hibrida u pojedinim vremenskim točkama ($P < 0,05$; označeno s *).

Udio topljivih proteina u sirovom proteinu u svim silažama pokazao je rast prilikom siliranja u skladu s utvrđenim utjecajem perioda siliranja na udio topljivih proteina (tablica 15.), iako se vrijednost udjela razlikovala između silaža hibrida i dodataka u pojedinim vremenskim točkama. Općenito su silaže hibrida Bc 344 imale najveću vrijednost topljivih proteina, a silaže hibrida Bc 513 pc najmanju. Sličan odnos je utvrđen između silaža s dodatkom inokulanta i kontrolnih silaža (slika 38.). U prvoj vremenskoj točki nije utvrđena signifikantna razlika između tretmana u ispitivanim hibridima. No u svim tretmanima utvrđen je signifikantno različit odgovor hibrida. U svima trima ispitivanima tretmanima, silaže hibrida Bc 344 imale su najveći udio topljivih proteina, a silaže hibrida Bc kokičar najmanji (srednja vrijednost za sva tri tretmana - Bc 462: 19,25% SP; Bc 344: 22,46% SP; Bc 513 pc: 12,12% SP). Odgovor svih triju ispitivanih hibrida na upotrijebljene dodatke silaži bio je različit u drugoj vremenskoj točki. Tako su silaže hibrida Bc 462 imale signifikantno niži udio topljivih proteina u silažama s dodatkom mliječne kiseline nego u ostalima dvama tretmanima (kontrola: 26,80% SP; inokulant: 27,55% SP; mliječna kiselina: 22,56% SP). Silaže hibrida Bc 344 imale su signifikantnu razliku između sva tri tretmana, s najvećim udjelima topljivih proteina izmjerenim u silažama s dodatkom inokulanta, a najmanjim u kontrolnim silažama (kontrola: 25,72% SP; inokulant: 31,38% SP; mliječna kiselina: 28,18% SP). U silažama hibrida Bc 513 pc utvrđen je signifikantno veći udio topljivih proteina u silažama s dodatkom inokulanta nego u ostalima dvama tretmanima (kontrola: 16,25% SP; inokulant: 20,52% SP; mliječna kiselina: 17,97% SP). Slično kao i na početku siliranja, u drugoj vremenskoj točki u silažama s dodatkom inokulanta i mliječne kiseline utvrđena je signifikantna razlika između svih triju hibrida u

udjelima topljivih proteina, no kontrolne silaže imale su nešto drugačiji odgovor. Kontrolne silaže hibrida Bc 513 pc imale su niže udjele topljivih proteina od ostala dva hibrida (slika 38.). Silaže hibrida Bc 462 i Bc 513 pc imale su sličan odgovor na dodatke silaži u trećoj vremenskoj točki. U silažama tih dvaju hibrida nije utvrđena signifikantna razlika u udjelima topljivih proteina između tretmana. U silažama hibrida Bc 344 u trećoj vremenskoj točki zabilježen je signifikantno niži udio topljivog proteina u kontrolnima silažama u odnosu na silaže s dodacima (kontrola: 27,44% SP; inokulant: 34,97% SP; mliječna kiselina: 32,20% SP). Silaže s dodatkom inokulanta i mliječne kiseline imale su u silažama hibrida Bc 513 pc signifikantno niže udjele topljivih proteina od silaža ostalih dvaju hibrida. Silaže hibrida Bc 462 imale su signifikantno veći udio topljivog proteina od kontrolnih silaža ostalih dvaju hibrida. U četvrtoj vremenskoj točki u silažama hibrida Bc 462 i Bc 344 nije utvrđena signifikantna razlika u udjelima topljivih proteina između upotrijebljenih tretmana (Bc 462, kontrola: 39,12% SP; Bc 462, inokulant: 40,27% SP; Bc 462, mliječna kiselina: 41,74% SP; Bc 344, kontrola: 40,33% SP; Bc 344, inokulant: 42,98% SP; Bc 344, mliječna kiselina: 39,94% SP). Silaže hibrida Bc 513 pc imale su signifikantno više udjele topljivog proteina u silažama s dodatkom inokulanta nego u ostalima dvama tretmanima (kontrola: 28,81% SP; inokulant: 35,34% SP; mliječna kiselina: 30,40% SP). U četvrtoj vremenskoj točki u silažama svih triju tipova dodataka utvrđeni su signifikantno niži udjeli topljivih proteina u silažama hibrida Bc 513 pc (slika 38.). Silaže hibrida Bc 344 i Bc 513 pc u petoj vremenskoj točki imale su slične odgovore na upotrijebljene dodatke silaži. Tako su u silažama obaju hibrida utvrđeni signifikantno viši udjeli topljivih proteina nego u silažama s dodatkom inokulanta (Bc 344, kontrola: 43,61% SP; Bc 344, inokulant: 47,24% SP; Bc 344, mliječna kiselina: 43,21% SP; Bc 513 pc, kontrola: 33,21% SP; Bc 513 pc, inokulant: 38,24% SP; Bc 513 pc, mliječna kiselina: 33,87 %). U petoj vremenskoj točki silaže hibrida Bc 462 imale su drugačiji odgovor sa signifikantno nižim udjelom topljivih proteina u kontrolnim silažama u odnosu na ostala dva tretmana (kontrola: 39,57% SP; inokulant: 43,55% SP; mliječna kiselina: 43,21% SP). Silaže s dodatkom inokulanta i kontrolne silaže imaju statistički različite udjele topljivih proteina između ispitivanih hibrida u petoj vremenskoj točki: sa silažama hibrida Bc 344 s maksimalnim udjelima i silažama hibrida Bc 513 pc s minimalnim udjelima topljivih proteina. U silažama s dodatkom mliječne kiseline silaže hibrida Bc 513 pc imale su signifikantno niže udjele topljivog proteina u odnosu na ostala dva hibrida. Silaže hibrida Bc 462 i Bc 513 pc u šestoj vremenskoj točki imale su signifikantno različite udjele topljivih proteina s obzirom na upotrijebljene dodatke, tako su silaže s dodatkom inokulanta imale najveće vrijednosti, a kontrolne silaže najmanje (Bc 462, kontrola: 40,05%; Bc 462, inokulant: 49,51% SP; Bc 462, mliječna kiselina: 42,99% SP; Bc 513 pc, kontrola: 35,75% SP; Bc 513 pc, inokulant: 46,08% SP; Bc 513 pc, mliječna kiselina: 40,44% SP). Silaže

hibrida Bc 344 imale su signifikantno niže udjele topljivih proteina u kontrolnim silažama u odnosu na ostala dva tretmana (kontrola: 43,92% SP, inokulant: 50,77% SP; mliječna kiselina: 49,56% SP). U silažama s dodatkom inokulanta u šestoj vremenskoj točki utvrđena je signifikantna razlika između silaža hibrida Bc 344 i Bc 513 pc, pri čemu su silaže Bc 513 pc imale više vrijednosti udjela topljivih proteina. Kontrolne silaže i silaže s dodatkom mliječne kiseline u šestoj vremenskoj točki imale su signifikantno više udjele topljivih proteina u silažama hibrida Bc 344 u odnosu na ostala dva hibrida. Odgovori svih triju hibrida u sedmoj vremenskoj točki razlikovali su se obzirom na upotrijebljene dodatke. Tako su silaže hibrida Bc 462 imale signifikantnu razliku u udjelima topljivih proteina između upotrijebljenih dodataka s najvećim udjelima u silažama s dodatkom inokulanta, a najmanjim u kontrolnim silažama (kontrola: 41,48% SP; inokulant: 51,98% SP; mliječna kiselina: 46,19% SP). U silažama hibrida Bc 344 silaže s dodatkom inkulanta u sedmoj vremenskoj točki imale su signifikantno veće udjele topljivih proteina od ostalih dvaju tretmana (kontrola: 49,54%; inokulant: 56,59% SP; mliječna kiselina: 51,11% SP). Kontrolne silaže hibrida Bc 513 pc imale su signifikantno niže udjele topljivih proteina od ostala dva tretmana (kontrola: 36,67% SP; inokulant: 46,21% SP; mliječna kiselina: 43,59% SP). U sedmoj vremenskoj točki silaže s dodatkom inokulanta i kontrolne silaže imale su signifikantno različite udjele topljivih proteina između silaža ispitivanih hibrida, s time da su silaže hibrida Bc 344 imale najveće vrijednosti, a silaže Bc 513 pc najmanje. Dodatak mliječne kiseline rezultirao je signifikantno većim udjelima topljivih proteina u silažama hibrida Bc 344 u odnosu na silaže s dodatkom mliječne kiseline u ostalima dvama hibridima (slika 38.).

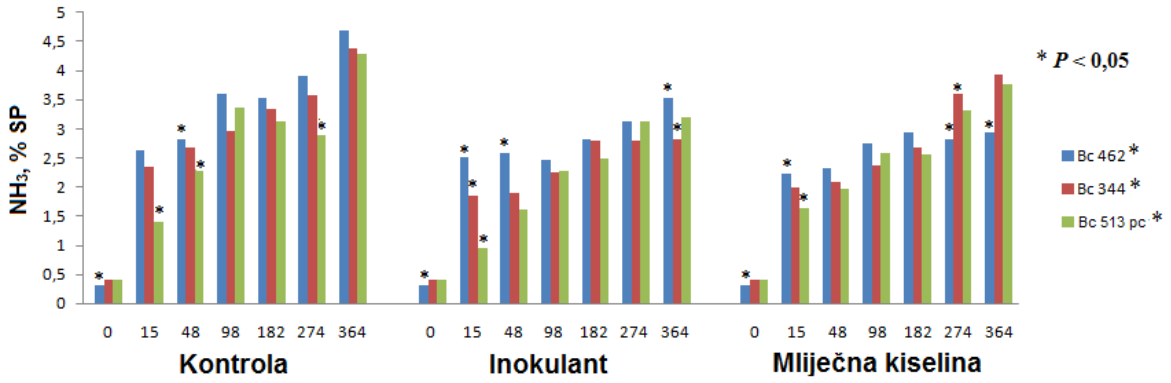


Slika 38. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza, dodataka silaži i perioda siliranja na udio topljivih proteina u sirovom proteinu (TP) u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,05$) te s naznačenim razlikama u TP ovisno o tipu silažnih dodataka ili hibrida u pojedinim vremenskim točkama ($P < 0,05$; označeno s *).

Udio amonijaka u sirovom proteinu u silažama ispitivanih hibrida s različitim dodacima tijekom siliranja rastao je u skladu s utvrđenim utjecajem perioda siliranja na udio amonijaka (tablica 15). Uz iznimku u kontrolnim silažama hibrida Bc 513 pc u petoj i šestoj vremenskoj točki, u kojima su zabilježene redukcije u udjelima amonijaka. Nakon toga je u sedmoj vremenskoj točki zabilježen porast u kontrolnim silažama Bc 513 pc koji je u skladu s ostalim ispitivanim silažama (slika 39.). Silaže hibrida Bc 462 imale su nešto veće udjele amonijaka u silažama s dodatkom inokulanta i kontrolnim silažama, dok su u silažama s dodatkom mliječne kiseline pred kraj perioda siliranja najveće vrijednosti udjela amonijaka zabilježene u Bc 344. No najčešće su ispitivane silaže u različitim vremenskim točkama pratile utvrđene odnose između hibrida (s najvišim udjelima amonijaka u Bc 462, osim u prvoj točki) bez obzira na tip dodataka. Tako je u prvoj vremenskoj točki u silažama svih triju tretmana utvrđen najniži udio amonijaka u silažama hibrida Bc 462 (srednja vrijednost za sva tri tretmana - Bc 462: 0,31% SP; Bc 344: 0,41% SP; Bc 513 pc: 0,40% SP). U drugoj vremenskoj točki silaže svih triju hibrida kukuruza različito su reagirale na upotrijebljene dodatke. Silaže hibrida Bc 462 nisu imale signifikantnu razliku između tretmana (kontrola: 2,64% SP; inokulant: 2,52% SP; mliječna kiselina: 2,24% SP). S druge strane silaže hibrida Bc 344 imale su kontrolne silaže sa signifikantno većim udjelom amonijaka od silaža s dodatkom inokulanta, dok su silaže s dodatkom mliječne kiseline po vrijednostima bile između (kontrola: 2,35% SP; inokulant: 1,85% SP; mliječna kiselina: 1,99% SP). U hibridu Bc 513 pc silaže s dodatkom mliječne kiseline imale su signifikantno veće udjele amonijaka od silaža s dodatkom inokulanta (kontrola: 1,40% SP; inokulant: 0,95% SP; mliječna kiselina: 1,64% SP). Silaže s dodatkom inokulanta imale su signifikantno različite udjele amonijaka u svima trima hibridima: silaže hibrida Bc 462 imale su najviše udjele amonijaka, a silaže Bc 513 pc najmanje. Kontrolne silaže Bc 513 pc imale su signifikantno niže udjele amonijaka od kontrolnih silaža ostalih dvaju hibrida. Silaže s dodatkom mliječne kiseline hibrida Bc 462 imale su signifikantno veći udio amonijaka od silaža Bc 513 pc, dok su silaže Bc 344 po udjelima amonijaka bile između. U trećoj vremenskoj točki silaže hibrida Bc 462 imale su različit odgovor na upotrijebljene dodatke od silaža ostalih dvaju hibrida. U silažama hibrida Bc 462 nije utvrđena signifikantna razlika između silaža s različitim dodacima u udjelima amonijaka. U ostalim dvama hibridima kontrolne silaže imale su signifikantno veće udjele amonijaka od ostalih dvaju tretmana (Bc 344, kontrola: 2,69% SP; Bc 344, inokulant: 1,89% SP; Bc 344, mliječna kiselina: 2,08% SP; Bc kokičar, kontrola: 2,29% SP; Bc kokičar, inokulant: 1,62% SP; Bc kokičar, mliječna kiselina: 1,96% SP). Silaže s dodatkom inkulanta u trećoj vremenskoj točki imale su signifikantno veće udjele amonijaka u silažama hibrida Bc 462. Slično je bilo i u kontrolnim silažama, gdje su silaže hibrida Bc 462 imale najveće udjele amonijaka, sa signifikantnom razlikom u odnosu na silaže hibrida Bc 513 pc, ali ne i u

odnosu sa silažama Bc 344. Silaže s dodatkom mliječne kiseline nisu imale razlike u udjelima amonijaka u silažama ispitivanih hibrida. U četvrtoj vremenskoj točki silaže hibrida Bc 462 i Bc 513 pc imale su sličan odgovor na upotrijebljene dodatke. Silaže obaju hibrida imale su signifikantno veće udjele amonijaka u kontrolnim silažama u odnosu na silaže s inokulantom (Bc 462, kontrola: 3,59% SP; Bc 462, inokulant: 2,46% SP; Bc 462, mliječna kiselina: 2,74% SP; Bc 513 pc, kontrola: 3,36% SP; Bc 513 pc, inokulant: 2,27% SP; Bc 513 pc, mliječna kiselina: 2,58% SP). U silažama hibrida Bc 344 nije utvrđena razlika između upotrijebljenih dodataka (kontrola: 2,97% SP; inokulant: 2,25% SP; mliječna kiselina: 2,38% SP). Isto tako u četvrtoj vremenskoj točki nije utvrđena razlika između hibrida u silažama pojedinih tipova dodataka (tretmana). U petoj vremenskoj točki sva tri hibrida imala su sličan odgovor na upotrijebljene dodatke. Sva tri hibrida imala su signifikantno veće udjele amonijaka u kontrolnim silažama u odnosu na ostala dva tretmana (slika 39.). U petoj vremenskoj točki, kao i u četvrtoj, nije utvrđena signifikantna razlika između udjela amonijaka u silažama pojedinih hibrida u različitim tretmanima. Silaže ispitivanih hibrida različito su odgovorile na tretmane u šestoj vremenskoj točki. Silaže hibrida 462 imale su signifikantno veće udjele amonijaka u kontrolnim silažama u odnosu na silaže ostalih dvaju dodataka (kontrola: 3,91% SP; inokulant: 3,12% SP; mliječna kiselina: 3,31% SP). U silažama hibrida Bc 344 silaže s dodanim inokulantom imale su signifikantno niže udjele amonijaka od ostalih dvaju tipova silaža (kontrola: 3,57% SP; inokulant: 2,80% SP; mliječna kiselina: 3,59% SP). U silažama Bc 513 pc nije utvrđena razlika u udjelima amonijaka između silaža s ispitivanim dodacima i kontrolnim silažama (kontrola: 2,88% SP; inokulant: 3,12% SP; mliječna kiselina: 3,31% SP). U silažama s dodatkom inokulanta u šestoj vremenskoj točki nije utvrđena signifikantna razlika između testiranih hibrida. No u kontrolnim silažama silaže hibrida Bc 513 pc imale su signifikantno niže udjele amonijaka od silaža ostalih dvaju hibrida. Silaže s dodatkom mliječne kiseline imale su udio amonijaka u silažama hibrida Bc 344 signifikantno veći u odnosu na silaže hibrida Bc 462, dok su silaže Bc 513 pc imale udjele amonijaka između silaža Bc 344 i Bc 462. U sedmoj vremenskoj točki silaže hibrida Bc 462 i Bc 513 pc imale su signifikantno različite udjele amonijaka između sva tri testirana tretmana s najvećim vrijednostima u kontrolnim silažama, a najmanjim u silažama s dodatkom inokulanta (slika 39.). Silaže hibrida Bc 344 imale su signifikantno niže udjele amonijaka u silažama s dodatkom inokulanta u odnosu na ostala dva tretmana (kontrola: 4,39% SP; inokulant: 2,81% SP; mliječna kiselina: 3,93% SP). Silaže s dodatkom inokulanta u sedmoj vremenskoj točki imale su signifikatno veći udio amonijaka u silažama hibrida Bc 462 u odnosu na silaže hibrida Bc 344, dok su silaže Bc 513 pc imale udjele amonijaka između ostalih dvaju hibrida. U kontrolnim silažama nije utvrđena signifikantna razlika između

hibrida, dok su silaže s dodatkom mliječne kiseline Bc 462 imale signifikantno niži udio amonijaka u odnosu na silaže ostalih dvaju hibrida.



Slika 39. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza, dodataka silaži i perioda siliranja na udio amonijaka u sirovom proteinu (NH_3) u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te s naznačenim razlikama u NH_3 ovisno o tipu silažnih dodataka ili hibrida u pojedinim vremenskim točkama ($P < 0,05$; označeno s *).

4.1.8. Korelacije između osnovnih parametara kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

Tablica 17. Utvrđene korelacije između osnovnih parametara kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

	ST	MK	TK	pH	SP	NH_3	VSP	Zeini
ST		0,11*	-0,03^{NS}	-0,15**	-0,10^{NS}	0,04^{NS}	0,15**	0,20***
MK		-	0,65***	-0,75***	0,06^{NS}	0,47***	0,63***	0,66***
TK				-0,87***	0,14*	0,76***	0,75***	0,79***
pH					-0.09^{NS}	-0,73***	-0,74***	-0,91***
SP						0,02^{NS}	-0,25***	0,25**
NH_3							0,77***	0,70***
VSP								0,68***
Zeini								

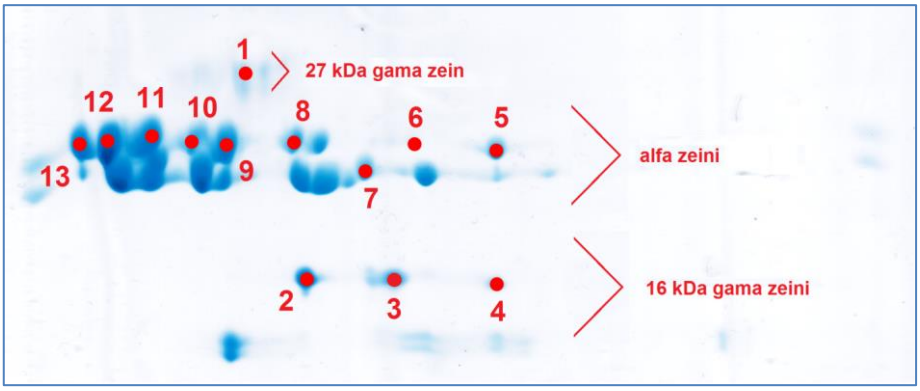
***P<0,001; **P<0,01; *P<0,05; NS: nesignifikantno

Nije utvrđena signifikantna korelacija između sadržaja suhe tvari i ostalih parametara kvalitete silaža, što je vrlo vjerojatno rezultat ujednačenosti suhe tvari silaža tijekom siliranja (tablica 17.). Sadržaj mliječne kiseline pokazao je signifikantnu i visoku pozitivnu korelacija s titracijom kiselosti (0,65). Istovremeno je utvrđena i signifikantno visoka negativna korelacija između sadržaja mliječne kiseline i pH u ispitivanim silažama (-0,75). Sadržaj mliječne kiseline imao je visoku pozitivnu korelaciju i s udjelom topljivih proteina (0,63) i nešto nižu s udjelom amonijaka (0,47). Dodatno je utvrđena pozitivna korelacija i između sadržaja mliječne kiseline i udjela zeina u silažama, kao i između udjela zeina i titracijske kiselosti. Titracijska kiselost pokazivala je sličnu visoku negativnu korelaciju s pH (-0,87) kao što je bilo utvrđeno i s mliječnom kiselinom. Isto tako je titracijska kiselost, kao i u slučaju mliječne kiseline, pokazivala visoku pozitivnu korelaciju s topljivim proteinom (0,75) i s udjelom amonijaka (0,76). Vrijednost pH je korelirala negativno i s udjelima topljivih proteina (-0,74) i amonijaka (-0,73). Sadržaj sirovih proteina samo je granično pozitivno korelirao s udjelom ukupnih zeina (0,25), dok s ostalim parametrima kvalitete silaža nije korelirao. Od dušičnih frakcija ispitanih ovim istraživanjem utvrđena je visoka signifikantna korelacija između udjela topljivih proteina i udjela amonijaka (0,77).

4.2. Promjene γ- zeina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza

4.2.1. Detektirani zeinski proteom u hibridima kukuruza

Tijekom analize zeinskog proteoma spektrometrijom masa korištenjem CAF-/CAF+ tehnike te *de novo* identifikaciju nakon 2-D elektroforezom separiranih proteina, od ukupno 53 ispitane lokacije na gelu identificirano je šest zeinskih proteina u 13 različitih lokacija (slika 40., tablica 18.). Od ukupno tri moguća tipa *γ*-zeina (16 kDa, 27 kDa i 50 kDa γ-zein) identificirana su dva: 16 kDa i 27 kDa *γ*-zein. Ostali detektirani zeini pripadaju skupini *α*-zeina. Pojedini proteini nalazili su se u više lokacija na gelu, najvjerojatnije zbog prisutnih posttranslacijskih modifikacija proteina. Posttranslacijske modifikacije proteina nisu dio ovog istraživanja te se nisu dalje ispitivale.



Slika 40. Prikaz lokacija izrezanih proteinskih zatamnjenja (spotova) u kojima su detektirani zeini na kontrolnom 2-DE gelu (Bc 462) – prikazan je samo dio 2-DE gela sa zeinima.

Tablica 18. Identificirani zeinski proteini s pripadajućim lokacijama na 2-DE gelu (spot).

Spot	Protein
1	27 kDa *γ*-zein (NCBI GI: 22550)
2	16 kDa *γ*-zein (NCBI GI: 89199566)
3	16 kDa *γ*-zein (NCBI GI: 89199566)
4	16 kDa *γ*-zein (NCBI GI: 89199566)
5	22 kDa zein (NCBI GI: 168703)
6	22 kDa zein (NCBI GI: 168703) / M36M361 zein (NCBI GI: 224511)
7	22 kDa zein (NCBI GI: 168703)
8	M36M361 zein (NCBI GI: 224511)
9	M36M361 zein (NCBI GI: 224511)
10	M36M361 zein (NCBI GI: 224511)
11	M36M361 zein (NCBI GI: 224511)
12	z1A α-zein (NCBI GI: 157780922)
13	M36M361 zein (NCBI GI: 224511)

Hibridi kukuruza korišteni u ovom istraživanju osim u udjelima ukupnih zeina (tablica 14) razlikovali su se i u udjelima pojedinih specifičnih zeina. Tako je hibrid Bc 462 imao u istoj koncentraciji proteina na 2-DE gelu više 27 kDa i 16 kDa *γ*-zeina u odnosu na ostala dva hibrida (tablica 19.). Hibrid Bc 513 pc imao je najviši izmjereni udio ukupnih zeina u ukupnom sirovom proteinu u odnosu na ostala dva hibrida, no istovremeno taj hibrid definiraju i najniži relativni sadržaji detektiranih *γ*-zeina. Što se tiče *α*-zeina, odnos je nešto drugačiji. Zein M36M361 najviše je zastupljen u hibridu Bc 344, a najmanje u hibridu Bc 462, iako se relativni odnos razlikuje između lokacija. Ostala dva detektirana *α*-zeina (22 kDa zein i z1A zein) varirala su između lokacija u pojedinim hibridima. Hibrid Bc 344 imao je u usporedbi s ostala dva hibrida više z1A *α*-zeina u lokaciji dvanaest i 22 kDa zeina u lokaciji šest, dok je Bc 513 pc imao više 22 kDa zeina u lokaciji pet u odnosu na ostala dva hibrida

Tablica 19. Utvrđene razlike između ispitivanih hibrida u specifičnim zeinima detektiranim nakon ekstrakcije i separacije 2-D elektroforezom.

	Hibridi kukuruza		
Zein/lokacija	Bc 462	Bc 344	Bc 513 pc
27 kDa *γ*-zein			
1	kontrola	ND	↓ 18,1x
16 kDa *γ*-zein			
2	kontrola	NS	↓ 2,2x
3	kontrola	↓ 4,3x	↓ 3,2x
4	kontrola	↓ 27,6x	ND
22 kDa zein			
5	kontrola	NS	↑ 2,9x
7	kontrola	↑ 3,1x	NS
22 kDa / M36M361 zein			
6	kontrola	↓ 5,0x	↑ 6,2x
M36M361 zein			
8	kontrola	↑ 14,9x	↑ 8,5x
9	kontrola	↑ 19,1x	NS
10	kontrola	NS	NS
11	kontrola	NS	NS
13	kontrola	↑ 15,1x	↑ 4,6x
z1A α-zein			
12	kontrola	↑ 4,6x	NS

ND: nije detektiran; NS: nije utvrđena signifikantna razlika

↓↑ strelice označavaju smanjivanje ili povećanje relativnog sadržaja detektiranih zeina u odnosu na kontrolni uzorak (hibrid Bc 462).

4.2.2. Promjene *γ*-zeina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja

Sadržaj *γ*-zeina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza svih hibrida zabilježio je pad nakon godine dana siliranja bez obzira na upotrijebljeni tip dodataka. No intenzitet razgradnje u različitim dodacima nije bio isti (tablica 20.; tablica 21.; tablica 22.).

U silažama hibrida Bc 462 utvrđena je najveća razgradnja *γ*-zeina u silaži s dodatkom inokulanta, iako je u silaži s dodatkom mliječne kiseline zabilježen sličan odnos kao i u silaži s dodatkom inokulanta osim u četvrtom spotu gdje je silaža s dodatkom mliječne kiseline imala 6,7 puta manji intenzitet nego kontrolni uzorak (uzorak hibrida Bc 462 prije siliranja), a u silaži s dodatkom inokulanta nismo uopće detektirali taj spot (protein). U kontrolnoj silaži hibrida Bc 462 detektirane su sve tri lokacije 16 kDa *γ*-zeina sa slabijim intenzitetom zatamnjenja u usporedbi s kontrolnim uzorkom (hibrid Bc 462 prije siliranja), dok protein 27 kDa *γ*-zein nije detektiran. Općenito protein 27 kDa *γ*-zein nije detektiran u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza hibrida Bc 462 nakon godine dana siliranja bez obzira na tip dodatka (tablica 20.).

Tablica 20. Utvrđene promjene u sadržaju *γ*-zeina između silaža hibrida Bc 462 s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja.

	Dodatak silaži		
Zein/lokacija na 2-DE gelu	Kontrola	Inokulant	Mliječna kiselina
27 kDa *γ*-zein			
1	ND	ND	ND
16 kDa γ-zein			
2	↓ 20,8x	ND	ND
3	↓ 12,6x	ND	ND
4	↓ 2,0x	ND	↓ 6,7x

ND: nije detektiran; NS: nije signifikantna razlika
↓↑ strelice označavaju smanjivanje ili povećanje relativnog sadržaja detektiranih zeina u odnosu na kontrolni uzorak (hibrid Bc 462 prije siliranja).

Silaže visoko vlažnog zrna kukuruza hibrida Bc 344 imale su nešto drugačiji odgovor na silažne dodatke od silaža hibrida Bc 462. U silažama hibrida Bc 344 utvrđen je manji intenzitet ispitivanih *γ*-zeina u silažama s dodatkom inokulanta i dodatkom mliječne kiseline u odnosu na kontrolnu silažu (tablica 21.). No za razliku od hibrida Bc 462 gdje je utvrđen najmanji intenzitet u silažama s dodatkom inokulanta, u hibridu Bc 344 najmanji intenzitet *γ*-zeina zabilježen je u silažama s dodatkom mliječne kiseline i to u

svim spotovima proteina 16 kDa *γ*-zeina. Isto tako iz rezultata se dobiva dojam da je intenzitet razgradnje u hibridu Bc 344 bio manji u odnosu na hibride Bc 462 i Bc 513 pc, ali nije moguća realna usporedba hibrida, jer se ona radi između 2-DE gelova koji su elektroforetski odvojeni u istoj šarži.

Tablica 21. Utvrđene promjene u sadržaju *γ*-zeina između silaža hibrida Bc 344 s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja.

	Dodatak silaži		
Zein/lokacija na 2-DE gelu	Kontrola	Inokulant	Mliječna kiselina
27 kDa *γ*-zein			
1	ND	ND	ND
16 kDa *γ*-zein			
2	↓ 5,8x	↓ 11,35x	↓ 21,3x
3	↓ 2,1x	↓ 2,2x	↓ 6,9x
4	NS	↓ 9,3x	ND

ND: nije detektiran; NS: nije signifikantna razlika
↓↑ strelice označavaju smanjivanje ili povećanje relativnog sadržaja detektiranih zeina u odnosu na kontrolni uzorak (hibrid Bc 344 prije siliranja).

Silaže trećeg hibrida Bc 513 pc ponašale su se slično kao i silaže hibrida Bc 462. Najveća razgradnja *γ*-zeina zabilježena je u silažama s dodatkom inokulanta. Slično kao i u silažama hibrida Bc 462 kontrolne silaže imale su najmanju razgradnju nakon godine dana siliranja (tablica 22.). Dodatno kao i u silažama hibrida Bc 462 protein 27 kDa *γ*-zein nije detektiran u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza hibrida Bc 513 pc nakon godine dana siliranja bez obzira na tip dodatka.

Tablica 22. Utvrđene promjene u sadržaju *γ*-zeina između silaža hibrida Bc 513 pc s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja.

	Dodatak silaži		
Zein/lokacija na 2-DE gelu	Kontrola	Inokulant	Mliječna kiselina
27 kDa *γ*-zein			
1	ND	ND	ND
16 kDa γ-zein			
2	↓ 10,7x	ND	↓ 21,7x
3	↓ 4,0x	ND	ND
4	ND	ND	ND

ND: nije detektiran; NS: nije signifikantna razlika
↓↑ strelice označavaju smanjivanje ili povećanje relativnog sadržaja detektiranih zeina u odnosu na kontrolni uzorak (hibrid Bc 513 pc prije siliranja).

4.2.3. Promjene detektiranih *α*-zeina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja

Nakon godine dana siliranja *α*-zeini su reducirani u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza isto kao i *γ*-zeini, iako ne tako intenzivno i ne u svim spotovima kao što je bio slučaj s *γ*-zeinima. Intenzitet razgradnje *α*-zeina u silažama ispitivanih hibrida ovisio je o tipu upotrijebljenog dodatka silaži (tablica 23.; tablica 24.; tablica 25.).

Od svih silaža hibrida Bc 462, u silaži s dodatkom inokulanta zabilježena je najveća razgradnja *α*-zeina, uz iznimku protein M36M361 u spotu jedanaest u kojem je najmanji intenzitet ili maksimalna razgradnja bila u kontrolnoj silaži. Isto tako nije utvrđena razlika intenziteta razgradnje *α*-zeina između kontrolnih silaža i silaža s dodatkom mliječne kiseline (tablica 23.). Kao i u odnosu razgradnje *α*-zeina i *γ*-zeina svih hibrida, tako i u silažama hibrida Bc 462 opažen je manji stupanj razgradnje *α*-zeina u odnosu na *γ*-zeine koji su imali razgradnju u svim detektiranim spotovima.

Tablica 23. Utvrđene promjene u sadržaju *α*-zeina između silaža hibrida Bc 462 s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja.

	Dodatak silaži		
Zein/lokacija na 2-DE gelu	Kontrola	Inokulant	Mliječna kiselina
22 kDa zein			
5	NS	NS	NS
7	↓ 2,3x	↓ 2,0x	NS
22 kDa / M36M361 zein			
6	NS	NS	NS
M36M361 zein			
8	NS	↓ 5,5x	NS
9	↓ 2,6x	↓ 3,1x	NS
10	NS	NS	NS
11	↓ 31,9x	NS	NS
13	ND	↓ 5,9x	↓ 5,2x
z1A α-zein			
12	↓ 3,1x	↓ 5,8x	↓ 5,0x

ND: nije detektiran; NS: nije signifikantna razlika
↓↑ strelice označavaju smanjivanje ili povećanje relativnog sadržaja detektiranih zeina u odnosu na kontrolni uzorak (hibrid Bc 462 prije siliranja).

Silaže hibrida Bc 344, slično kao i kod *γ*-zeina, imale su najveću razgradnju *α*-zeina u silažama s dodatkom mliječne kiseline. Najmanja razgradnja *α*-zeina hibrida Bc 344 bila je u kontrolnim silažama, uz iznimku proteine 22 kDa zein i M36M361 zein u spotu 6 gdje

je zabilježena maksimalna razgradnja u kontrolnim silažama te protein M36M361 zein u spotu 9 i 10 gdje je kontrolna silaža imala nešto veću razgradnju od silaže s dodatkom inokulanta (tablica 24.). Slično kao i u razgradnji *α*-zeina u odnosu na *γ*-zeine hibrida Bc 462, tako je i u hibridu Bc 344 intenzitet razgradnje *α*-zeina bio slabiji nego razgradnja *γ*-zeina.

Tablica 24. Utvrđene promjene u sadržaju *α*-zeina između silaža hibrida Bc 344 s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja.

	Dodatak silaži		
Zein/lokacija na 2-DE gelu	Kontrola	Inokulant	Mliječna kiselina
22 kDa zein			
5	NS	NS	NS
7	NS	↓ 7,6x	↓ 8,5x
22 kDa / M36M361 zein			
6	↓ 3,8x	NS	↓ 2,9x
M36M361 zein			
8	NS	NS	NS
9/10	↓ 2,1x	NS	↓ 3,0x
11	NS	↓ 3,1x	↓ 2,1x
13	NS	↓ 53,9x	ND
z1A α-zein			
12	NS	NS	NS

ND: nije detektiran; NS: nije signifikantna razlika
↓↑ strelice označavaju smanjivanje ili povećanje relativnog sadržaja detektiranih zeina u odnosu na kontrolni uzorak (hibrid Bc 344 prije siliranja).

Od silaža hibrida Bc 513 pc, silaže s dodatkom inokulanta imale su najveću razgradnju *α*-zeina, slično kao što je zabilježeno u silažama Bc 462. No za razliku od silaža hibrida Bc 462, u Bc 513 pc najmanja razgradnja nije bila u kontrolnim silažama, nego u silažama s dodatkom mliječne kiseline, uz iznimku protein M36M361 u trinaestom spotu koji je imao najveću razgradnju u silažama s dodatkom mliječne kiseline u odnosu na sve tretmane. Kao što je bio slučaj i s hibridima Bc 462 i Bc 344, tako i razgradnja *α*-zeina u Bc 513 pc bila je slabijeg intenziteta od razgradnje *γ*-zeina u istom hibridu. U svim spotovima *γ*-zeina zabilježena je redukcija (tablica 22.), što nije bio slučaj sa spotovima *α*-zeina (tablica 25.).

Tablica 25. Utvrđene promjene u sadržaju *α*-zeina između silaža hibrida Bc 513 pc s različitim tipovima dodataka nakon godine dana siliranja.

	Dodatak silaži		
Zein/Lokacija na 2-DE gelu	Kontrola	Inokulant	Mliječna kiselina
22 kDa zein			
5	↓ 2,1x	↓ 2,5x	↓ 2,2x
7	↓ 3,4x	↓ 2,1x	NS
22 kDa / M36M361 zein			
6	↓ 2,0x	↓ 2,5x	NS
M36M361 zein			
8	NS	↓ 6,9x	NS
9	↓ 2,1x	↓ 2,0x	NS
10	↓ 2,0x	↓ 5,5x	↓ 2,9x
11	↓ 20,4x	NS	NS
13	↓ 4,0x	↓ 2,5x	ND
z1A α-zein			
12	↓ 9,5x	↓ 3,9x	↓ 3,5x

ND: nije detektiran; NS: nije signifikantna razlika

↓↑ strelice označavaju smanjivanje ili povećanje relativnog sadržaja detektiranih zeina u odnosu na kontrolni uzorak (hibrid Bc 513 pc prije siliranja).

4.3. Razgradivost suhe tvari i škroba u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza nakon godine dana siliranja

4.3.1. Utjecaj hibrida, dodataka silaži, perioda siliranja i njihovih interakcija na razgradivost suhe tvari silaža

Hibridi kukuruza međusobno su se signifikantno razlikovali u svim parametrima probavljivosti suhe tvari. Efektivna razgradivost hibrida Bc 513 pc bila je signifikantno niža u odnosu na efektivnu razgradivost ostalih dvaju hibrida, što je u skladu s detektiranom višom brzo razgradivom frakcijom u silažama hibrida Bc 462 i Bc 344 (tablica 26.). Hibrid Bc 513 pc je s druge strane imao višu potencijalno razgradivu frakciju (Bc 462: 0,058; Bc 344: 0,053; Bc 513 pc: 0,061). Od tri ispitivana hibrida kukuruza, silaže hibrida Bc 344 imale su najvišu brzinu razgradivosti suhe tvari (0,074 sat^{-1}), dok su silaže hibrida Bc 462 i Bc 513 pc imale slične i signifikantno niže brzine (Bc 462: 0,063 sat^{-1}; Bc 513 pc: 0,066 sat^{-1}). Iako nije utvrđen signifikantan utjecaj hibrida na trajanje lag faze, utvrđena je signifikantna razlika između lag faza silaža hibrida Bc 462 i Bc 344 (tablica 26.).

Tablica 26. Utjecaj hibrida kukuruza na parametre razgradivosti suhe tvari silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

	Hibridi kukuruza			
Razgradivost suhe tvari	Bc 462	Bc 344	Bc 513 pc	*P*
Efektivna razgradivost	$0,70^{a}$	$0,70^{a}$	$0,65^{b}$	**
Brzo razgradiva frakcija (a)	$0,42^{a}$	$0,44^{a}$	$0,37^{b}$	**
Potencijalno razgradiva frakcija (b)	$0,58^{a}$	$0,53^{b}$	$0,61^{a}$	**
Brzina, sat^{-1}	$0,063^{b}$	$0,074^{a}$	$0,066^{b}$	**
Lag faza, sat	$5,87^{b}$	$7,02^{a}$	$6,31^{ab}$	NS

***$P < 0,001$; **$P < 0,01$; *$P < 0,05$; NS nesignifikantno

^{ab}Vrijednosti u istom retku označene različitim slovima značajno se razlikuju; $P < 0,05$.

Signifikantno viša efektivna razgradivost izmjerena je u silažama s dodatkom inokulanta u odnosu na silaže s dodatkom mliječne kiseline. Kontrolne silaže imale su efektivnu razgradivost između dva ostala tretmana. Iako su ustanovljene signifikantne razlike u efektivnoj razgradivosti između tretmana, te su razlike bile minimalne (tablica 27.). Nešto viša efektivna razgradivost u silažama s dodatkom inokulanta rezultat je više brzo razgradive frakcije u silažama s inokulantom. Lag faza i potencijalno razgradiva

frakcija nisu se razlikovale između dodataka. U skladu s najvišom efektivnom razgradivosti silaže s dodatkom inokulanta imale su i najveću brzinu razgradivosti suhe tvari. Slično kao i u efektivnoj razgradivosti, signifikantost je bila postignuta samo u odnosu na silaže s dodatkom mliječne kiseline, dok je vrijednost kontrolnih silaža bila između (tablica 27.).

Tablica 27. Utjecaj dodataka silaži na parametre razgradivosti suhe tvari silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

	Dodatak silaži			
Razgradivost suhe tvari	Kontrola	Inokulant	Mliječna kiselina	*P*
Efektivna razgradivost	0,68^{ab}	0,70^{a}	0,67^{b}	*
Brzo razgradiva frakcija (a)	0,39^{b}	0,44^{a}	0,40^{ab}	NS
Potencijalno razgradiva frakcija (b)	0,59	0,55	0,57	NS
Brzina, sat^{-1}	0,067^{ab}	0,073^{a}	0,063^{b}	*
Lag faza, sat	6,82	6,52	5,86	NS

***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05; NS: nesignifikantno
^{ab}Vrijednosti u istom retku označene različitim slovima značajno se razlikuju; P < 0,05.

Period siliranja imao je važan utjecaj na sve parametre razgradivosti suhe tvari. Signifikantno niža lag faza je izmjerena u silažama nakon godine dana siliranja (0. dan: 7,37 sati; 364. dan: 5,43 sati), dok je efekivna razgradivost bila signifikantno viša (ER, 0. dan: 0,59; ER, 364. dan: 0,77). U skladu s višom efektivnom razgradivosti u silažama nakon godine dana siliranja izmjerena je i viša brzo razgradiva frakcija u silažama 364. Dan, dok je potencijalno razgradiva frakcija bila niža (tablica 28.). Brzina razgradivosti bila je signifikantno viša u silažama 364. dan siliranja (c, 0. dan: 0,051 sat^{-1}; c, 364. dan: 0,085 sat^{-1}).

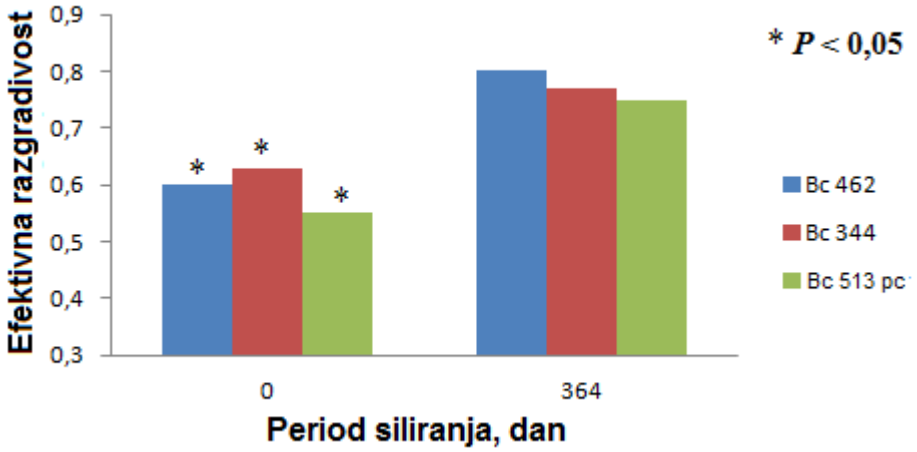
Tablica 28. Utjecaj perioda siliranja na parametre razgradivosti suhe tvari silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

	Period siliranja, dan		
Razgradivost suhe tvari	0	364	*P*
Efektivna razgradivost	0,59^{b}	0,77^{a}	***
Brzo razgradiva frakcija (a)	0,28^{b}	0,54^{a}	***
Potencijalno razgradiva frakcija (b)	0,71^{a}	0,43^{b}	***
Brzina, sat^{-1}	0,051^{b}	0,085^{a}	***
Lag faza, sat	7,37^{a}	5,43^{b}	***

***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05; NS: nesignifikantno
^{ab}Vrijednosti u istom retku označene različitim slovima značajno se razlikuju; P < 0,05.

Od interakcija između hibrida kukuruza, dodatka silaži i perioda siliranja opaženih u parametrima razgradivosti suhe tvari prikazane su samo one koje su imale signifikantnost.

Opažen je signifikantan utjecaj interakcije hibrida i perioda siliranja u efektivnoj razgradivosti suhe tvari (slika 41.). Tako je između silaža svih triju ispitivanih hibrida u nultom danu (prije siliranja) opažena signifikantna razlika u efektivnoj razgradivosti. Silaže hibrida Bc 344 imale su najveću efektivnu razgradivost, a silaže Bc 513 pc najmanju (Bc 462: 0,60; Bc 344: 0,63; Bc 513 pc: 0,55). Za razliku od nultog dana, 364. dan siliranja nije opažena signifikantna razlika u efektivnoj razgradivosti između silaža ispitivanih hibrida (Bc 462: 0,80; Bc 344: 0,77; Bc 513 pc: 0,75).

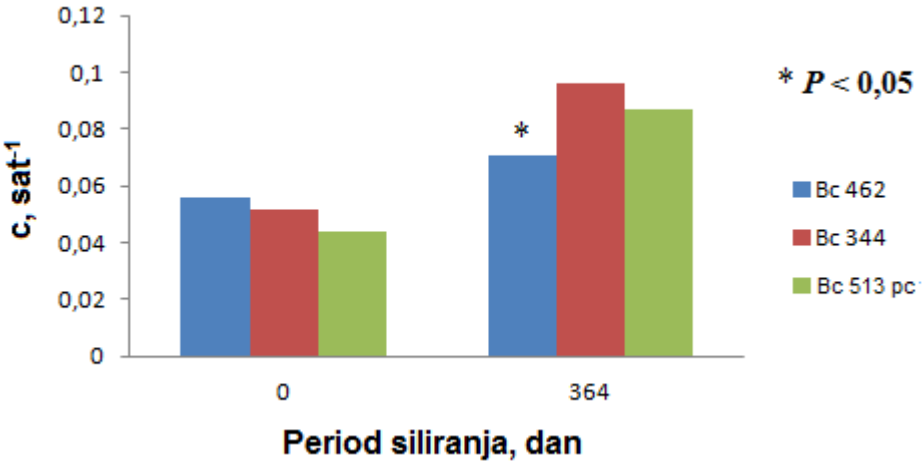


Slika 41. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na efektivnu razgradivost suhe tvari u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,05$) te s naznačenim razlikama u efektivnoj razgradivosti suhe tvari između silaža hibrida u pojedinim vremenskim točkama ($P < 0,05$; označeno s *).

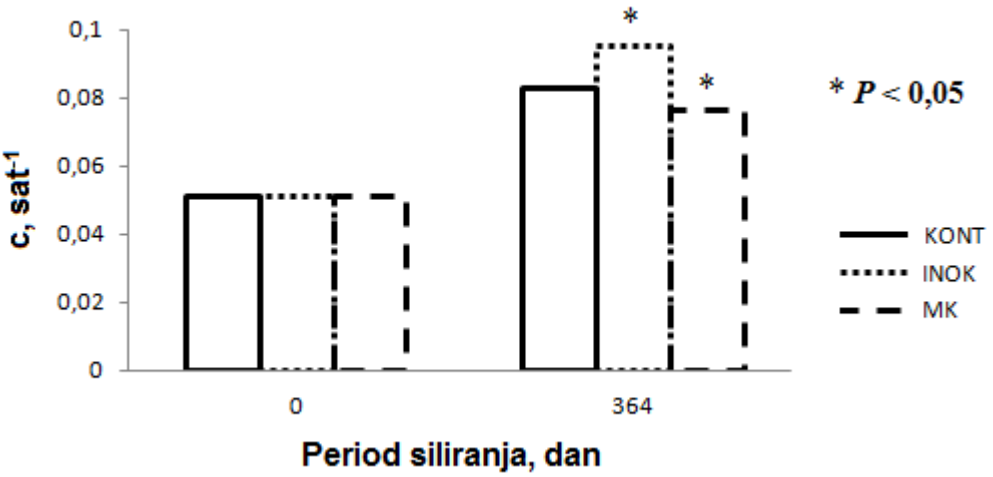
Silaže hibrida Bc 462 imale su signifikantno nižu brzinu razgradivosti od silaža ostalih dvaju hibrida na kraju siliranja (Bc 462: 0,071 sat^{-1}; Bc 344: 0,096 sat^{-1}; Bc 513 pc: 0,087 sat^{-1}). Na početku siliranja nije utvrđena signifikantna razlika u brzini razgradivosti suhe tvari između ispitivanih hibrida (Bc 462: 0,056 sat^{-1}; Bc 344: 0,052 sat^{-1}; Bc 513 pc: 0,044 sat^{-1}). Razlike u odgovorima hibrida u različitim vremenskim točkama reflektiraju utvrđenu interakciju hibrida i vremena siliranja u brzini razgradivosti (slika 42.).

Osim interakcije hibrida i perioda siliranja na brzinu razgradivosti suhe tvari utvrđena je i interakcija dodataka silaži i perioda siliranja (slika 43.). Tako je između silaža s dodatkom inokulanta i dodatkom mliječne kiseline utvrđena signifikantna razlika u brzini razgradivosti na kraju siliranja. Silaže s dodatkom inokulanta imale su veću, a silaže s

dodatkom mliječne kiseline nižu brzinu razgradivosti (kontrola: 0,083 sat^{-1}; inokulant: 0,095 sat^{-1}; mliječna kiselina: 0,076 sat^{-1}). U nultom danu nije utvrđena signifikantna razlika između silaža pojedinih tretmana (kontrola: 0,0508 sat^{-1}; inokulant: 0,0509 sat^{-1}; mliječna kiselina: 0,0508 sat^{-1}).



Slika 42. Prikaz utjecaja interakcije hibrida kukuruza i perioda siliranja na brzinu razgradivosti suhe tvari u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te s naznačenom razlikom u brzini razgradivosti suhe tvari između silaža hibrida Bc 462 i silaža ostalih dvaju hibrida u 364. danu ($P < 0,05$; označeno s *).



Slika 43. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na brzinu razgradivosti suhe tvari u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,001$) te s naznačenim razlikama u brzini razgradivosti suhe tvari između silaža s dodatkom inokulanta i mliječne kiseline u 364. danu ($P < 0,05$; označeno s *).

4.3.2. Utjecaj hibrida, dodataka silaži, perioda siliranja i njihovih interakcija na sadržaj i razgradivost škroba silaža

Silaže ispitivanih hibrida signifikantno su se razlikovale u sadržaju škroba. Silaže hibrida Bc 462 imale su najveći, dok su silaže Bc 513 pc imale najmanji sadržaj škroba (tablica 29.). Od parametara razgradivosti škroba na lag fazu i brzinu razgradivosti nije uočen signifikantan utjecaj hibrida. Iako bez signifikantnog utjecaja hibrida, brzina razgradivosti škroba signifikantno se razlikovala između hibrida Bc 344 i Bc 513 pc (tablica 29.). Uočen je signifikatan utjecaj hibrida na efektivnu razgradivost te na obje razgradive frakcije. U skladu sa signifikantno većom brzo razgradivom frakcijom u silažama hibrida Bc 462 u odnosu na silaže ostala dva hibrida uočena je i signifikantno veća efektivna razgradivost. Potencijalno razgradiva frakcija škroba varirala je signifikantno između silaža sva tri hibrida s najvećom izmjerenom potencijalno razgradivom frakcijom u silažama hibrida Bc 344, a najmanjom u silažama hibrida Bc 462 (tablica 29.).

Tablica 29. Utjecaj hibrida kukuruza na sadržaj i parametre razgradivosti škroba silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

	Hibridi kukuruza			
	Bc 462	Bc 344	Bc 513 pc	*P*
Škrob, g/kg ST	709,5^{a}	642,2^{b}	590,4^{c}	***
Razgradivost škroba				
Efektivna razgradivost	0,69^{a}	0,64^{b}	0,64^{b}	***
Brzo razgradiva frakcija (a)	0,50^{a}	0,38^{b}	0,43^{b}	***
Potencijalno razgradiva frakcija (b)	0,49^{c}	0,62^{a}	0,57^{b}	***
Brzina, sat^{-1}	0,074^{ab}	0,081^{a}	0,068^{b}	NS
Lag faza, sat	4,76	5,38	5,37	NS

***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05; NS: nesignifikantno
^{abc}Vrijednosti u istom retku označene različitim slovima značajno se razlikuju; P < 0,05.

Silaže pojedinih tipova dodataka nisu se signifikantno razlikovale u sadržaju škroba**,** dok su u nekim parametrima razgradivosti škroba utvrđene signifikantne razlike (tablica 30.). Silaže s dodatkom inokulanta imale su signifikantno veću razgradivost škroba od silaža ostalih dvaju tretmana koji su imali slične brzine razgradivosti škroba (kontrola: 0,069 sat^{-1}; inokulant: 0,087 sat^{-1}; mliječna kiselina: 0,067 sat^{-1}). Utvrđena je i signifikantna razlika u lag fazi između kontrolnih silaža i ostalih dvaju tipova silaža. Kontrolne silaže imale su signifikantno dulju lag fazu od ostalih tretmana (kontrola: 6,03 sati; inokulant:

5,00 sati; mliječna kiselina: 4,48 sati). Što se tiče ostalih parametara razgradivosti, brzo razgradive i potencijalno razgradive frakcije te efektivne razgradivosti, u njima nije utvrđen signifikantni utjecaj dodatka silaži (tretmana siliranja).

Tablica 30. Utjecaj dodataka silaži na sadržaj i parametre razgradivosti škroba silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

	Dodatak silaži			
	Kontrola	Inokulant	Mliječna kiselina	*P*
Škrob, g/kg ST	653,0	646,8	642,3	NS
Razgradivost škroba				
Efektivna razgradivost	0,65^{b}	0,67^{a}	0,66^{ab}	NS
Brzo razgradiva frakcija (a)	0,44	0,45	0,43	NS
Potencijalno razgradiva frakcija (b)	0,55	0,55	0,57	NS
Brzina, sat^{-1}	0,069^{b}	0,087^{a}	0,067^{b}	**
Lag faza, sat	6,03^{a}	5,00^{b}	4,48^{b}	**

***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05; NS: nesignifikantno
^{ab}Vrijednosti u istom retku označene različitim slovima značajno se razlikuju; P < 0,05.

Tablica 31. Utjecaj perioda siliranja na sadržaj i parametre razgradivosti škroba silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

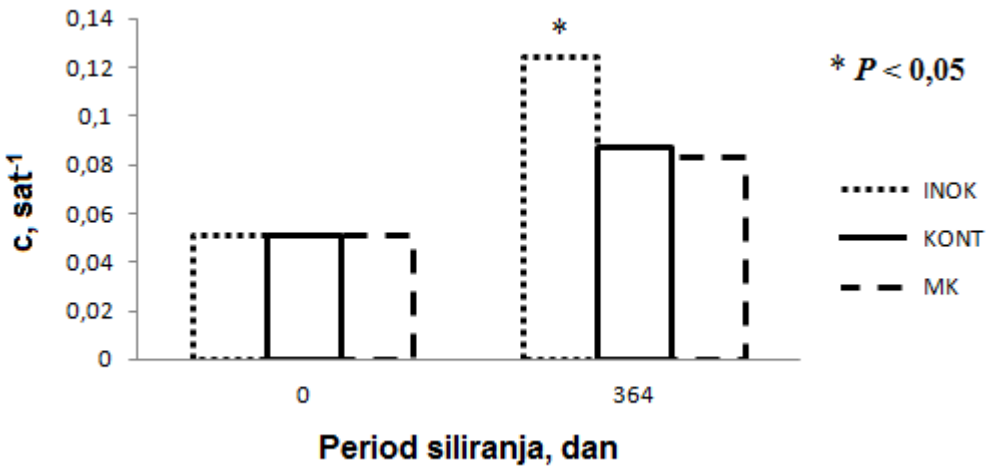
	Period siliranja, dan		
	0	364	*P*
Škrob, g/kg ST	639,4^{b}	655,3^{a}	*
Razgradivost škroba			
Efektivna razgradivost	0,53^{b}	0,78^{a}	***
Brzo razgradiva frakcija (a)	0,32^{b}	0,56^{a}	***
Potencijalno razgradiva frakcija (b)	0,68^{a}	0,43^{b}	***
Brzina, sat^{-1}	0,051^{b}	0,098^{a}	***
Lag faza, sat	6,01^{a}	4,32^{b}	**

***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05; NS: nesignifikantno
^{ab}Vrijednosti u istom retku označene različitim slovima značajno se razlikuju; P < 0,05.

Iako je utvrđen signifikantan utjecaj perioda siliranja na sadržaj škroba u ispitivanim silažama, razlika je bila minimalna i brojčano zanemariva s obzirom na vrijednosti sadržaja škroba (0. dan: 639,4 g/kg ST; 364. dan: 655,3 g/kg ST). Period siliranja imao je signifikantan utjecaj i na sve parametre razgradivosti škroba. Lag faza razgradivosti škroba bila je signifikantno manja u silažama 364. dan (0. dan: 6,01 sati; 364. dan: 4,32 sati). S druge strane brzina razgradivosti škroba bila je signifikantno veća u silažama 364. dan kao i efektivna razgradivost (c, 0. dan: 0,051 sat^{-1}; c, 364. dan: 0,098 sat^{-1}; ER, 0.

dan: 0,53; ER, 364. dan: 0,78). Kao i kod efektivne razgradivosti u silažama 364. dan zabilježena je signifikantno veća brzo razgradiva frakcija nego u silažama na početku siliranja (0. dan: 0,32; 364. dan: 0,56). Potencijalno razgradiva frakcija bilježila je pad u silažama 364. dan siliranja (tablica 31.).

Jedini utvrđeni utjecaj interakcija nezavisnih varijabli (hibrida kukuruza, dodataka silaži i perioda siliranja) na sadržaj škroba i parametre razgradivosti škroba bio je utjecaj interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na brzinu razgradivosti škroba (slika 44.). Silaže s dodatkom inokulanta imale su signifikantno veću brzinu razgradivosti škroba 364. dan od ostalih dvaju tretmana (kontrola: 0,087 sat^{-1}; inokulant: 0,124 sat^{-1}; mliječna kiselina: 0,083 sat^{-1}). Za razliku od 364. dana kada je zabilježena signifikantna razlika, 0. dan nije zabilježena razlika između dodataka silaži (kontrola: 0,0511 sat^{-1}; inokulant: 0,051 sat^{-1}; mliječna kiselina: 0,0509 sat^{-1}).



Slika 44. Prikaz utjecaja interakcije dodataka silaži i perioda siliranja na brzinu razgradivosti škroba u ispitivanim silažama s utvrđenom signifikantnosti ($P < 0,05$) te s naznačenim razlikama u brzini razgradivosti škroba između silaža s dodatkom inokulanta i silaža ostalih dvaju tretmana u 364. danu ($P < 0,05$; označeno s *).

4.3.3. Mikrobni parametri silaža nakon 364 dana siliranja

Hibrid kukuruza imao je signifikantan utjecaj na broj ukupnih bakterija, laktobacila i ukupnih kvasaca u ispitivanim silažama (tablica 32.). Silaže hibrida Bc 462 imale su signifikantno veći broj ukupnih bakterija, ukupnih laktobacila i ukupnih kvasaca od hibrida Bc 513 pc, ali ne i od Bc 344. Silaže Bc 344 hibrida po svim mikrobnim parametrima bile su između ostalih dvaju hibrida.

Tablica 32. Utjecaj hibrida na mikrobne parametre silaža visoko vlažnog zrna kukuruza nakon godine dana siliranja.

Mikrorganizmi	Hibridi kukuruza			
Log CFU/g ST	Bc 462	Bc 344	Bc 513 pc	*P*
Ukupne bakterije	4,66^{a}	4,00^{ab}	3,01^{b}	*
Lactobacillus	4,45^{a}	3,44^{ab}	2,65^{b}	**
Kvasci	5,09^{a}	3,85^{ab}	3,49^{b}	*

***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05; NS: nesignifikantno
^{ab}Vrijednosti u istom retku označene različitim slovima značajno se razlikuju P < 0,05.

Dodatak silaži imao je signifikantan utjecaj na broj ukupnih bakterija i broj ukupnih kvasaca, ali ne i na broj laktobacila (tablica 33.). Iako je utvrđen veći broj laktobacila u silažama s inokulantom, on nije bio signifikantno različit od ostala dva tretmana. Silaže s inokulantom imale su istovremeno i signifikantno veći broj kvasaca i ukupnih bakterija od silaža ostalih dvaju tretmana.

Tablica 33. Utjecaj dodataka silaži na mikrobne parametre silaža visoko vlažnog zrna kukuruza nakon godine dana siliranja.

Mikrorganizmi	Dodatak silaži			
Log CFU/g ST	Kontrola	Inokulant	Mliječna kiselina	*P*
Ukupne bakterije	3,82^{ab}	4,87^{a}	2,97^{b}	**
Lactobacillus	3,57	4,08	2,90	NS
Kvasci	3,80^{b}	5,24^{a}	3,39^{b}	**

***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05; NS: nesignifikantno
^{ab}Vrijednosti u istom retku označene različitim slovima značajno se razlikuju; P < 0,05.

4.3.4. Korelacije između parametara razgradivosti suhe tvari i škroba te osnovnih parametara kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

Parametri razgradivosti suhe tvari najveće korelacije imali su s fermentacijskim parametrima silaža visoko vlažnog zrna kukuruza (tablica 34.). Tako je efektivna razgradivost suhe tvari imala najveće pozitivne korelacije s mliječnom kiselinom (0,85), titracijskom kiselosti (0,86), udjelom amonijaka (0,84) i udjelom topljivih proteina (0,91). Visoka negativna korelacija, osim između efektivne razgradivosti suhe tvari i pH (-0,90), utvrđena je i između ER i broja kvasaca (-0,64). Brzo razgradiva frakcija (a) imala je nešto niže, ali vrlo slične odnose s parametrima kvalitete silaža kao što je imala efektivna razgradivost. Utvrđena je pozitivna korelacija između brzo razgradive frakcije i mliječne kiseline (0,79), titracijske kiselosti (0,81), udjela amonijaka (0,77) i udjela topljivih proteina (0,86). Kao i kod efektivne razgradivosti utvrđena je negativna korelacija između (a) i pH (-0,85). S druge strane potencijalno razgradiva frakcija (b) imala je obrnute korelacije s parametrima fermentacije. Tako je utvrđena visoka negativna korelacija između (b) i mliječne kiseline (-0,77), titracijske kiselosti (-0,81), udjela amonijaka (-0,76) i udjela topljivih proteina (-0,86), dok je visoka pozitivna korelacija uzvrđena s pH (0,84). Brzina razgradivost suhe tvari (c) ponašala se slično kao i ER te frakcija (a) s nešto nižim vrijednostima korelacija. Utvrđene su pozitivne korelacije između (c) i mliječne kiseline (0,70), titracijske kiselosti (0,69), udjela amonijaka (0,68) i udjela topljivih proteina (0,78) te negativne s pH (-0,72) i brojem kvasaca (-0,60). Lag faza razgradivosti suhe tvari imala je najmanje vrijednosti korelacija od svih parametara razgradivosti (tablica 34.).

Tablica 34. Utvrđene korelacije između parametara razgradivosti suhe tvari i osnovnih parametara kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

Varijabla	ST (ER)	ST (a)	ST (b)	ST (c)	ST (Lag)
ST	$0,24^{NS}$	$0,36^{***}$	$-0,38^{***}$	$0,37^{***}$	$-0,13^{NS}$
MK	$0,85^{***}$	$0,79^{***}$	$-0,77^{***}$	$0,70^{***}$	$-0,46^{***}$
TK	$0,86^{***}$	$0,81^{***}$	$-0,81^{***}$	$0,69^{***}$	$-0,43^{***}$
pH	$-0,90^{***}$	$-0,85^{***}$	0.84^{***}	$-0,72^{***}$	$0,45^{***}$
NH_3	$0,84^{***}$	$0,77^{***}$	$-0,76^{***}$	$0,68^{***}$	$-0,38^{**}$
TP	$0,91^{***}$	$0,86^{***}$	$-0,86^{**}$	$0,78^{***}$	$-0,41^{***}$
Škrob	$0,24^{NS}$	$0,24^{*}$	$-0,19^{NS}$	$0,12^{NS}$	$-0,03^{NS}$

$^{***}P < 0,001$; $^{**}P < 0,01$; $^{*}P < 0,05$; NS: nesignifikantno

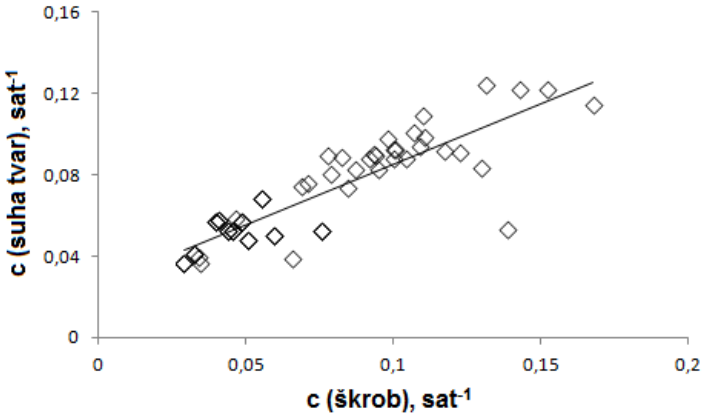
Slični odnosi kao i u korelacijama između parametara razgradivosti suhe tvari i parametara silaža (tablica 34.) utvrđeni su između parametara razgradivosti škroba i parametara kvalitete silaža (tablica 35.). Efektivna razgradivost škroba imala je visoku pozitivnu korelaciju s mliječnom kiselinom (0,88), titracijskom kiselosti (0,93), udjelom amonijaka (0,87) i udjelom topljivih proteina (0,90). Negativna korelacija utvrđena je između efektivne razgradivosti i pH (-0,95). Brzo razgradiva frakcija (a) imala je vrlo slične odnose kao i efektivna razgradivost, s pozitivnom korelacijom s mliječnom kiselinom (0,69), titracijskom kiselosti (0,77), udjelom amonijaka (0,74) i udjelom topljivih proteina (0,71) te negativnom korelacijom s pH (-0,78). Obrnute vrijednosti korelacija u odnosu na ER i (a) škroba utvrđene su između potencijalno razgradive frakcije (b) i parametara silaža. Utvrđene su negativne korelacije između (b) i mliječne kiseline (-0,67), titracijske kiselosti (-0,74), udjela amonijaka (-0,72) i udjela topljivih proteina (-0,69) te pozitivna korelacija s pH (0,76). Brzina razgradivosti škroba ponašala se u skladu s brzinom razgradivosti suhe tvari, s pozitivnim korelacijama između (c) i mliječne kiseline (0,73), titracijske kiselosti (0,63) i udjelom topljivih proteina te nešto nižom pozitivnom korelacijom s udjelom amonijaka (0,58). Između brzine razgradivosti škroba i pH utvrđena je negativna korelacija (-0,70).

Tablica 35. Utvrđene korelacije između parametara razgradivosti suhe tvari i osnovnih parametara kvalitete silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

Varijabla	Škrob (ER)	Škrob (a)	škrob (b)	Škrob (c)	Škrob (Lag)
ST	$0,39^{**}$	$0,35^{***}$	$-0,43^{***}$	$0,45^{***}$	$-0,01^{NS}$
MK	$0,88^{***}$	$0,69^{***}$	$-0,67^{***}$	$0,73^{***}$	$-0,47^{***}$
TK	$0,93^{***}$	$0,77^{***}$	$-0,74^{***}$	$0,63^{***}$	$-0,39^{***}$
pH	$-0,95^{***}$	$-0,78^{***}$	0.76^{***}	$-0,70^{***}$	$0,42^{***}$
NH_3	$0,87^{***}$	$0,74^{***}$	$-0,72^{***}$	$0,58^{***}$	$-0,29^{**}$
TP	$0,90^{***}$	$0,71^{***}$	$-0,69^{**}$	$0,75^{***}$	$-0,42^{***}$
Škrob	$0,24^{NS}$	$0,29^{*}$	$-0,35^{NS}$	$0,25^{*}$	$-0,22^{NS}$

***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05; NS: nesignifikantno

4.3.5. Odnos brzina razgradivosti škroba i suhe tvari – linearna regresija



Slika 45. Odnos brzina razgradivosti škroba i suhe tvari [jednadžba regresije: y = 0,592 (± 0,043) + 0,026 (± 0,003), n = 66, RMSE = 0,01, R^2 = 0,75, *P* < 0.001].

Brzina razgradivosti škroba imala je signifikantan pozitivan utjecaj na brzinu razgradivosti suhe tvari kao što je vidljivo iz regresijske analize za ova dva parametra razgradivosti (slika 45.).

5. RASPRAVA

Silaža visoko vlažnog zrna kukuruza često je korišteno krmivo u hranidbi preživača i monogastričnih životinja jer uklanja potrebu za sušenjem zrna koje, je potrebno prilikom spremanja suhog zrna kukuruza te omogućuje raniju berbu kukuruza s većom vlagom pri nepovoljnim vremenskim uvjetima. Dodatno silaža visoko vlažnog zrna kukuruza omogućava upotrebu kukuruza tijekom cijele godine i ima pozitivan učinak na nutritivnu vrijednost zrna (San Emeterio i sur., 2000; Firkins i sur., 2001; Wu i sur. ,2001; Ferraretto i sur., 2013).

U ovom istraživanju praćene su silaže triju različitih hibrida kukuruza (Bc 462, Bc 344 i Bc 513 pc) koji pripadaju u tri različite skupine tipova kukuruza (polutvrdunac, kvalitetni zuban i kokičar) koje definira različita tvrdoća zrna i sadržaj ukupnih zeina. Osim hibrida, pratio se i utjecaj dodataka silaži. Okosnica istraživanja bio je utjecaj hibrida i dodataka silaži na sadržaj zeina, na razgradivost silaža i općenito na kvalitetu silaža.

5.1. Razlike ispitivanih hibrida kukuruza – tvrdoća

Tvrdoća zrna važan je parametar u kvaliteti zrna kukuruza izražen kroz omjer caklavog (rožnatog, tvrdog) i brašnastog (mekog) endosperma te uvelike vezan uz udio zeina u endospermu zrna kukuruza (Dombrink-Kurtzman i Bietz, 1993; Pratt i sur., 1995).

Istraživani hibridi Bc 462, Bc 344 i Bc 513 pc u parametrima Stenvertove analize tvrdoće zrna ponašali su se u skladu s utvrđenim razlikama između mekših (engl. *dent;* hrv. zuban) i tvrđih (engl. *flint;* hrv. tvrdunac) linija kukuruza. U kokičaru tvrdi endosperm čini gotovo cijeli endosperm (Li i sur., 1996), dok zuban ima veći udio mekog endosperma od tvrdunca (Gotlin, 1967). Kukuruz iz tipova zuban ima više volumene samljevenih zrna te niža vremena mljevenja i niže odnose volumena krupnih i sitnih česica Wt C/F od tvrdunaca (Pomeranz i sur., 1985). Hibrid Bc 344 pripada u kvalitetne zubane, hibrid Bc 462 u polutvrdunce, dok je hibrid Bc 513 pc kokičar po pretpostavljenim karakteristikama najtvrđi od ispitivanih hibrida. Rezultati Stenvertove analize (vrijeme mljevenja, volumen samljevenih zrna i Wt C/F) potvrđuju da je Bc 513 pc najtvrđi od ispitivanih hibrida. Vrijeme mljevenja Bc 513 pc bilo je signifikantno veće od vremena mljevenja Bc 344 te je u skladu s istraživanjem Lija i sur. (1996) koje pokazuje da hibridi s većim udjelom tvrdog

endosperma imaju dulja vremena mljevenja. Bc 462 nije imao signifikantno različito vrijeme mljevenja od Bc 513 pc, što je u skladu s njegovom klasifikacijom kao polutvrdunca. Hibrid Bc 344 s obzirom na klasifikaciju kvalitetnog zubana od sva tri ispitivana hibrida ima pretpostavljeno najveći udio mekog endosperma. Signifikantna razlika između vremena mljevenja hibrida Bc 513 pc i Bc 344 potvrđuje pretpostavljenu nižu tvrdoću u hibridu Bc 344. Vrijeme mljevenja od svih parametara Stenvertove analize pokazuje najjaču korelaciju s odnosom tvrdog i mekog endosperma te se smatra jednim od najboljih pokazatelja tvrdoće zrna (Li i sur., 1996; Blandino i sur., 2010). Volumen samljevenih zrna u analiziranim hibridima padao je od Bc 344 (31 mL) do Bc 513 pc (29 mL), što se slaže s razlikom između tipova kukuruza. U radu Radosavljevića i sur. (2000) zubani bilježe volumene samljevenih zrna koji se kreću od 35 do 37 mL, a kokičari 29 ml.

Teoretska podjela analiziranih hibrida potvrđena je ne samo kroz rezultate Stenvertove analize tvrdoće, nego i kroz rezultat prave gustoće. Vrijednosti gustoće ispitivanih hibrida kretale su se od 1,26 do 1,36 g/mL s najnižom vrijednosti u Bc 344 i najvišom u Bc 513 pc. Vrijednost gustoće hibrida Bc 513 pc slagale su se s vrijednostima gustoće visoko tvrdog hibrida u radu Wua i sur. (1992). Hibrid s vrlo tvrdim endospermom imao je gustoću 1,3523 g/mL, a kako je padala tvrdoća, tako je padala i vrijednost gustoće s minimalnim vrijednostima u zrnima mekog endosperma 1,1839 g/mL (Wu i sur., 1992). Slične vrijednosti zabilježili su i Radosavljević i sur. (2000) s rasponom gustoća zrna kukuruza od 1,34 do 1,23 g/mL, s time da se gustoća zubana kretala između 1,27 i 1,23 g/mL, tvrdunaca između 1,31 i 1,29 g/mL, a kokičari su imali vrijednost gustoće 1,34 g/mL. Hibridi u ovom istraživanju su isto imali pad u gustoći od hibrida Bc 513 pc do hibrida Bc 344, kao i pad uvrijednosti gustoća koje se slažu s gustoćama tipova kukuruza kojima pripadaju, a dostupni su u literaturi (Wu i sur., 1992; Radosavljević i sur., 2000). Teoretske skupine kukuruza kojima hibridi kukuruza u ovom istraživanju pripadaju rangirane su u skladu s rezultatima gustoće - s Bc 513 pc kokičarom kao najtvrđim hibridom i Bc 344 kvalitetnim zubanom kao najmekšim hibridom.

Dodatno, iako nije utvrđena signifikantna razlika između srednje veličine čestica ispitivanih hibrida, utvrđen je trend porasta veličine čestica od Bc 344 do Bc 513 pc. Hibridi s mekim endospermom u pravilu imaju manje srednje veličine čestica nego hibridi s tvrđim endospemom kada su samljeveni na istom mlinu s istim porama (Wu i sur, 1992). Ovaj rezultat, iako nesignifikantan, još je jedna potvrda raspodjele ispitivanih hibrida, s najtvrđim zrnima u Bc 513 pc te najmekšim zrnima u Bc 344.

5.2. Kvaliteta silaža visoko vlažnog zrna kukuruza

Parametri kvalitete visoko vlažnog zrna kukuruza govore puno o tipu fermentacije, pa i o mogućoj nutritivnoj vrijednosti silaže, kao i o mogućim zdravstvenim posljedicama u slučaju loše silirane silaže. Važni parametri kvalitete silaža obrađeni su u ovom istraživanju kroz godinu dana siliranja silaža visoko vlažnog zrna kukuruza. Parametri kvalitete praćeni su kroz fazu fermentacije i kroz stabilnu fazu siliranja u kojoj bi silažna masa trebala pokazivati ujednačene vrijednosti (Weinberg i Muck, 1996).

Vrijednosti suhe tvari silaža ispitivanih hibrida kukuruza (tablica 14.) pokazala su da su hibridi silirani u istom stadiju rasta i s optimalnom vlažnosti za siliranje visoko vlažnog zrna kukuruza koja se kreće oko 30 % vlage u silažnoj masi (Ferraretto i sur, 2014). Iako je zamijećen signifikantan porast u suhoj tvari tijekom siliranja, promjena je minimalna te nema utjecaj na karakteristike silaža (McDonald i sur., 1991).

Upotreba triju različita hibrida nije dovela do razlika u sadržajima mliječne kiseline u ispitivanim silažama (tablica 14.), dok je dodatak silaži inokulant s dva soja *Lactobacillus plantarum* DSMZ 8866 i DSMZ 8862 za rezultat imao silaže sa signifikantno najvišim sadržajem mliječne kiseline (tablica 15.). Slično kao i u ovom istraživanju, Hoffman i sur. (2011) u istraživanju na dva različita hibrida kukuruza dobili su signifikantno viši sadržaj mliječne kiseline u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza s dodatkom inokulanta *Lactobacillus buchneri.* Silaže s dodatkom inokulanta u navedenom istraživanju imale su 1,6 puta viši sadržaj mliječne kiseline u odnosu na kontrolne silaže. S druge strane Dawson i sur. (1998) nisu utvrdili signifikantnu razliku u sadržajima mliječne kiseline između kontrolnih silaža i silaža s dodatkom *Propionibacterium acidipropionici*. Contreras-Govea i sur. (2013) prilikom siliranja cijele biljke kukuruza dobili su signifikantno više sadržaje mliječne kiseline u silažama s dodatkom *Lactobacillus plantarum* (66,3 g/kg) nego u kontrolnim silažama bez dodatka inokulanta (61,0 g/kg). Isto tako Pieper i sur. (2011) u istraživanju na silažama pšenoraži, pšenice i ječma: u zelenu masu žitarica s većom i nižom vlagom dodali su inokulant Lactobacillus plantarum DSMZ 8866 i DSMZ 8862 te su dobili signifikantno više sadržaje mliječne kiseline u svim silažama s dodatkom inokulanta, s time da je zamjetno veća razlika bila u sušim silažama.

Upotreba *Lactobacillus plantarum* u pravilu za rezultat ima silaže s boljim fermentacijskim karakteristikama u odnosu na silaže bez dodatka (Weinberg i Muck, 1996), ali krajnji rezultat ne ovisi samo o upotrjebljenom mikroorganizmu, već i o zelenoj masi koja se silira. Kukuruz se smatra povoljnim za siliranje bilo silaža cijele biljke, bilo silaža visoko vlažnog zrna zbog optimalnog udjela lako dostupnih ugljikohidrata, niskog

pufernog kapaciteta i više suhe tvari (McDonald i sur., 1991). Silaže s dodatkom mliječne kiseline imale su signifikantno niži sadržaj mliječne kiseline od silaža s dodatkom inokulanata, no istovremeno su imale signifikantno viši sadržaj od kontrolnih silaža. Dodatak mliječne kiseline za rezultat ima sniženje pH i inhibiranje aktivnosti nepoželjnih mikroorganizama (McDonald i sur., 1991). Kao što je vidljivo iz interakcije hibrida kukuruza i dodataka silaži (slika 32.), dodatak mliječne kiseline i inokulanta djelovali su tako da nije bilo razlike u hibridima, no s druge strane kontrolne silaže imale su signifikantno različit sadržaj mliječne kiseline između silaža Bc 462 i Bc 513 pc, s time da je Bc 513 pc imao viši sadržaj mliječne kiseline. Koji je razlog različitog odgovora hibrida na siliranje bez dodataka silaži, nije jasno.

U svim silažama bez obzira na tip dodatka ili hibrid kukuruza primijećen je porast u sadržaju mliječne kiseline od početka siliranja do 182. dana (ili 274. za silaže s inokulantom hibrida Bc 462), nakon čega je zabilježen blagi pad u sljedeća dva uzorkovanja (274. dan i 364. dan) (Slika 36.). Utvrđen pad u mliječnoj kiselini najvjerojatnije je uzrokovan metaboliziranjem mliječne u octenu kiselinu od strane bakterija mliječne kiseline. U nedostatku supstrata za fermentaciju, primarno glukoze, neki sojevi bakterija mliječne kiseline uključujući *Laktobacillus plantarum* mogu metabolizirati mliječnu kiselinu do octene (Lindgren, 1990). U slučaju da je bila riječ o sekundarnoj fermentaciji mliječne kiseline u maslačnu kroz aktivnost klostridija, paralelno bi utvrdili povećanje pH. Naime sekundarnu fermentaciju s klostridijama prati povećanje pH u silažnoj masi (Weinberg i Muck, 1996). U slučaju aerobne razgradnje kroz aktivnost kvasaca koji oksidiraju mliječnu kiselinu (McDonald i sur., 1991) također bi se bilježio porast pH u ispitivanim silažama, kao i pad u titracijskoj kiselosti, što nije zabilježeno.

Vrijednost pH u ispitivanim silažama bilježila je pad u svim vremenskim točkama bez obzira na tip dodataka silaži ili hibrid kukuruza te se ponašala u skladu s porastom mliječne kiseline kao i s porastom titracijske kiselosti. Titracijska kiselost ukazuje na sadržaj slobodnih oksonijevih iona u silažnoj masi i o jakosti kiselina: što je viša titracijska kiselost, to su veći sadržaj oksonijevih iona i sadržaj kiselina u ispitivanom uzorku. Porast titracijske kiselosti u ispitivanim silažama ukazuje na porast ukupnih kiselina u silažnoj masi tijekom siliranja (Ward, 2000). Isto tako su i silaže s dodatkom inokulanta imale signifikantno veću titracijsku kiselost u odnosu na ostala dva tretmana u ispitivanim silažama. Interakcija između dodataka silaži i vremena siliranja (slika 27.) pokazuje da je najveća razlika između silaža s dodatkom inokulanta i ostala dva tretmana bila na početku siliranja kada je zabilježen i najveći porast mliječne kiseline u silažama s dodatkom inokulanta u odnosu na ostala dva tretmana. Dodatak bakterija mliječne kiseline prilikom siliranja za rezultat ima nagli porast u sintezi kiselina, primarno mliječne kiseline, te nagli pad pH (McDonald i sur., 1991; Weinberg i Muck, 1996). Silaže s dodatkom inokulanta

imale su signifikantno niži pH u odnosu na ostala dva tretmana u svim vremenskim točkama, kao što je vidljivo iz interakcije dodataka silaži i vremena siliranja (slika 28.).

Dodatak inokulanata snižava pH ili u najgorem slučaju nema ni pozitivan ni negativan utjecaj na pH-vrijednost u odnosu na kontrolne silaže (Dawson i sur., 1998; Hoffman i sur., 2011; Contreras-Govea i sur., 2013), iako postoje iznimke. Taylor i Kung (2002) zabilježili su nakon 166. dana stajanja visoko vlažnog zrna kukuruza siliranim s dodatkom inokulanta *Lactobacillus buchneri* s dodatkom enzima u različitim koncentracijama te s dodatkom *Lactobacillus buchneri* i *Lactobacillus plantarum* malo više pH-vrijednosti u odnosu na kontrolnu silažu, iako nije zamijećena značajnija razlika u sadržajima kiselina. Kontrolna silaža u navedenom radu imala je vrijednost pH od 3,94, dok se vrijednost u tretmanima kretala od 3,97 do 4,15. Iako autori nisu objasnili zašto, vidljivo je da je u silažama s dodatkom inokulanata bio veći udio amonijaka u odnosu na kontrolne silaže, pa je to mogući razlog višeg pH u silažama s dodatkom inokulanta. Dodatak mliječne kiseline u ovom istraživanju za rezultat je imao silaže visoko vlažnog zrna kukuruza sa signifikantno nižim pH u odnosu na kontrolne silaže. Iako su silaže sva tri hibrida bilježile pad pH s dodatka mliječne kiseline (McDonald i sur., 1991), najbolji odgovor je bilježio Bc 462, što je vidljivo iz interakcije hibrida kukuruza i dodataka silaži (slika 32.). Očito ne reagiraju svi hibridi jednako na dodatak mliječne kiseline.

Sadržaj sirovog proteina u ispitivanim silažama signifikantno se razlikovao između silaža ispitivanih hibrida. Silaže hibrida Bc 513 pc imale su najviše vrijednosti, dok su silaže Bc 344 imale najniže vrijednosti sirovog proteina (slika 21.; tablica 14.). Razlika u udjelu sirovog proteina očekivana je s obzirom na tipove ispitivanih kukuruza: polutvrdunca (Bc 462), kvalitetnog zubana (Bc 344) i kokičara (Bc 513 pc). Kokičari imaju najveći sadržaj sirovog proteina od svih triju tipova kukuruza, dok tvrdunci imaju veći sadržaj sirovog proteina od zubana (Gotlin, 1967). Iako je zabilježena signifikantna razlika u sadržaju sirovog proteina tijekom perioda siliranja (tablica 16.), ta razlika bila je minimalna (najveća razlika 4,7 g/kg ST) u odnosu na sadržaj sirovog proteina u silažama (oko 116,1 g/kg ST). Sadržaj sirovog proteina u silažama se ne mijenja značajno tijekom siliranja (Der Bedrosian i sur., 2012), iako se udio pojedinih proteinskih frakcija unutar silažne mase mijenja uslijed proteolize (Prigge i sur., 1976).

Iako je na udio topljivog proteina i amonijaka zabilježena signifikantna trostruka interakcija između testiranih hibrida kukuruza, dodatka siliranju i perioda siliranja (što znači da je u pojedinim uzorkovanjima odgovor hibrida na upotrijebljene dodatke prilikom siliranja bio različit), ipak je vidljivo da je u svim silažama primijećen isti trend (slika 38.; slika 39.). Udio topljivog proteina i amonijaka tijekom godine dana siliranja ispitivanih silaža visoko vlažnog zrna bilježio je rast u svim vremenskim točkama (tablica 16.). Topljivi protein i amonijak smatraju se općim pokazateljima proteolize u silažama (Winters

i sur., 2000; Johnson i sur., 2002; Slottnerr i Bertilsson, 2006), ali amonijak je ipak primarno pokazatelj deaminacije aminokiselina (McDonald i sur., 1991). Iako naglo snižavanje pH dovodi do usporavanja proteolize (Henderson, 1993) uslijed deaktivacije nekih biljnih proteaza, ona ipak nije zaustavljena. Proteolitički enzimi kukuruza imaju pH-optimum u rasponu od 3,5 do 7 (Feller i sur., 1977). Isto tako bakterije mliječne kiseline, aktivne u određenoj mjeri tijekom cijelog procesa siliranja, a ne samo u fazi fermentacije, imaju široki raspon ekstracelularnih proteinaza kao i intracelularnih peptidaza (Kunji i sur., 1996). Porasti topljivog proteina i amonijaka u silažnoj masi su, iako smatrani donekle nepoželjnim procesima, neizbježni (Henderson, 1993; Der Bedrosian i sur., 2012; Ferraretto i sur., 2014). Hoffman i sur. (2011) bilježili su porast od oko 3% topljivog proteina, izraženo na ST, u periodu od 240 dana na silažama dvaju hibrida visoko vlažnog zrna kukuruza siliranih s dodatkom inokulant i bez dodataka. Ferraretto i sur (2014) bilježili su porast od 15,1% topljivog proteina, izraženo na SP, u periodu od jedanaest mjeseci i mjereno na ukupno više od šest tisuća uzoraka silaža visoko vlažnog zrna kukuruza. Paralelno s porastom topljivog proteina isti autori su zabilježili i porast udjela amonijaka od 1,8 na 4,6 % SP u ispitivanim silažama.

U svim vremenskim točkama silaže hibrida najveće tvrdoće, Bc 513 pc, bilježile su signifikantno niži udio topljivog proteina od silaža ostalih dvaju hibrida, dok je Bc 344 hibrid s najmanjim sadržajem sirovog proteina i najmanjom tvrdoćom bilježio najviše vrijednosti topljivog proteina u svim uzorkovanjima osim u 48. i 98. danu gdje su silaže hibrida Bc 344 imale slične vrijednosti topljivog proteina kao i silaže Bc 462 (slika 22.). Sličan trend zabilježili su i Hoffman i sur. (2011): u silažama hibrida manje caklavosti zabilježili su više udjele topljivog proteina (razlika od 1%, izražena na ST). Razliku u topljivim proteinima i općenito razgradnju između testiranih hibrida Hoffman i sur. (2011) su objasnili i kroz manje intenzivnu fermentaciju u caklavom hibridu. Rezultati u ovom istraživanju ne pokazuju značajnu razliku u intenzitetu fermentacije između ispitivanih hibrida. No u silažama hibrida Bc 344 i Bc 462 zabilježen je veći broj ukupnih bakterija i bakterija mliječne kiseline u odnosu na Bc 513 pc te je moguće da je utjecaj proteolitičkih enzima mikroorganizama utjecao na opaženu razliku u udjelu topljivih proteina između hibrida (McDonald i sur., 1991; Kunji i sur., 1996). Isto se ne smije zanemariti utjecaj biljnih proteolitičkih enzima i djelovanje kiselih uvjeta na razgradnju proteina (McDonald i sur., 1991).

U silažama s dodatkom inokulanta zabilježen je viši udio topljivog proteina u odnosu na ostala dva tretmana, iako razlika između tretmana nije u svim točkama signifikantna (slika 29.). Silaže s dodatkom inokulanta imale su veći broj ukupnih bakterija i ukupnih laktobacila, kao i viši sadržaj kiselina koji je praćen kroz sadržaj mliječne kiseline i titracijsku kiselost, što govori da su u silažama s dodatkom inokulanta bili povoljniji uvjeti

za proteolizu u odnosu na ostala dva tretmana (Winters i sur., 2000; Johnson i sur., 2002; Slottnerr i Bertilsson, 2006).

Osim najnižeg udjela topljivog proteina, u silažama hibrida Bc 513 pc izmjereni su i najniži udjeli amonijaka (tablica 14.). Slične rezultate imali su Hoffman i sur. (2011) s nižim topljivim proteinom (razlika oko 1%, izražena na ST) i amonijakom (razlika od oko 4%, izražena na ukupni N) u silažama hibrida veće caklavosti. Za razliku od utjecaja hibrida, silaže s dodatkom inokulanta u ovom istraživanju imale su niži udio amonijaka od ostala dva tipa silaža, što je u suprotnosti s rezultatima za udio topljivih proteina gdje su silaže s dodatkom inokulanta imale najveće vrijednosti. Kako je deaminacija rezultat primarno aktivnosti bakterija mliječne kiseline, za očekivati je nešto veći udio amonijaka u silažama s dodatkom inokulanta (McDonald i sur., 1991). No nemaju sve bakterije mliječne kiseline jednaku aktivnost deaminacije. *Lactobacillus plantarum* od svih aminokiselina može deaminirati samo arginin (Arg) i ornitin (Orn), čime je ograničena sposobnost deaminacije ovog mikroorganizma (Oshima i McDonald, 1979). U kontrolnim silažama moguće je da su prevladali sojevi mikroorganizama koji imaju višu aktivnost deaminacije od *Lactobacillus plantarum.*

Udio ukupnih zeina između ispitivanih hibrida u početnoj zelenoj masi bio je u skladu s njihovim klasifikacijama. Što je veći udio caklavog endosperma u zrnu kukuruza, to je veći udio ukupnih zeina (Paiva i sur., 1991; Dombrink-Kurtzman i Bietz, 1993; Landry i Delhaye, 2007). Landry i Delhaye (2007) ustanovili su udio zeina od 82,6% SP u caklavom endospermu, dok su u brašnastom izmjerili 52% zeina izraženih na SP. Hibrid Bc 462 je polutvrdunac i imao je udio zeina od 55,13% SP, dok je hibrid Bc 344 kvalitetni zuban s udjelom ukupnih zeina nižim od Bc 462 (48,75% SP). Bc 513 pc je kokičar i imao je najviši udio zeina od svih triju ispitanih hibrida (59,96% SP). Kokičari u zrnu imaju najviši udio caklavog endosperma, dok zubani imaju najmanji (Gotlin, 1967). Dodatno i rezultati analize tvrdoće zrna ispitivanih hibrida u ovom istraživanju u skladu su s izmjerenim sadržajima ukupnih zeina. Ono što je iznenađujuće u istraživanju jest – zabilježen porast u ukupnim zeinima tijekom siliranja (tablica 15.), trend prisutan u silažama svih triju hibrida (slika 24.**)** bez obzira na tip dodataka (slika 31.). Hoffman i sur. (2011) u istraživanju na silažama visoko vlažnog zrna kukuruza zabilježili su sličan rezultat. Zabilježili su udio ukupnih zeina, ali izražen na suhu tvar silaža koji se nije mijenjao tijekom siliranja, iako su evidentirali očitu razgradnju pojedinih frakcija zeina. Zaključili su da je nerealan trend u ukupnim zeinima posljedica neprimjerenosti analitičke metode koju su primijenili za određivanje zeina. Isto tako Kung i sur. (2014) u kontrolnim silažama visoko vlažnog zrna kukuruza nisu zabilježili pad u sadržaju ukupnih zeina, dok u silažama s dodatkom proteaza jesu. Navedeni autori su zaključili da silaže visoko vlažnog zrna nemaju izraženu razgradnju zeina bez dodatka proteolitičkih enzima.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima objavljenima u radu Hoffmana i sur. (2011). U ovom istraživanju evidentirana je očita razgradnja zeina, kroz 2-DE zeinskog ekstrakta silaža kukuruza. Zašto je s druge strane evidentiran veći udio zeina a zapravo bi se trebao smanjivati, moguće je kombinacija više razloga.

Tijekom fermentacije i općenito siliranja događa se razgradnja proteina (Messman i Weiss, 1994; Winters i sur., 2000; Johnson i sur., 2002; Slottnerr i Bertilsson, 2006), što je potvrđeno kroz porast u udjelima topljivog proteina i amonijaka zabilježenima u ovom istraživanju. Zeini, proteini koji sastavljaju u vodi netopljiva proteinska tijela, pripadaju u skupinu proteina koji su teže razgradivi; pokazuju nisku razgradivost pod djelovanjem peptidaza pepsina te tripsina/kimotripsina (Hamaker, 1987). Od svih proteina zrna kukuruza zeini se smatraju najslabije razgradivima (Holding i Larkins, 2009). Tijekom siliranja tako raste udio zeina jer pada udio lako razgradivih proteina, iako je to računski malo vjerojatan razlog s obzirom da nije zabilježena značajnija promjena u sadržaju sirovih proteina. Osim toga, zeini su hidrofobni proteini koji pokazuju nisku topljivost u vodenim otopinama, ali uz dodatak jake kiseline ili baze njihova topljivost u vodenim otopinama raste (Shukla i sur., 2001; Lawton, 2002) te je njihova viša ekstraktibilnost razlog povećanja izmjerenog udjela u silažama. Naime prilikom standardne ekstrakcije na sobnoj temperaturi topljivost zeina varira između 2 i 60%, ovisno o upotrijebljenoj koncentraciji etanola (Shukla i sur., 2001). Naposljetku, slično kao i u radu Hoffman i sur. (2011), moguće je da je ekstrakcijska metoda upotrijebljena u ovom istraživanju neadekvatna za kvantificiranje zeina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza.

5.3. Detektirane frakcije zeina

Separacija pojedinih zeina napravljena je pomoću 2-D elektroforeze, nakon koje su pojedini separirani proteini iz različitih lokacija na gelu identificirani pomoću spektrometrije masa. Kvantifikacija pojedinih proteina na pojedinim lokacijama na 2-DE gelovima odredila se denzitometrijom. Ukupno je identificirano šest zeina u trinaest različitih lokacija na gelu.

Zeini su proteini koje definira visoka topljivost u vodenim otopinama alkohola (Osborne, 1897; Osborne, 1908), dok je reducirajući spoj β-merkaptoetanol dodan u smjesu za ekstrakciju zbog disulfidnih mostova. Proteini *γ*-zeini imaju visoki udio aminokiseline Cys (tablica 1.) koje međusobno ulaze u vezu te tako preko disulfidnih mostova uvelike utječu na stabilnost konformacije proteina, ali i na njegovu

ekstraktibilnost (Wu i Messing, 2010). Bez upotrebe reducirajućih spojeva iskoristivost postupka ekstrakcije *γ*-zeina je vrlo niska (Tsai, 1980).

Ekstrakcija frakcije *γ*-zeina za rezultat je imala detekciju 16 kDa i 27 kDa *γ*-zeina (tablica 19.), dok treći 50 kDa *γ*-zein nije detektiran. Ekspresija gena koji kodiraju za 50 kDa *γ*-zein u stanicama endosperma često je niska, što čini ovaj protein teškim za detekciju i kvantifikaciju u nativnim uzorcima (Woo i sur, 2001). Osim ekstrahiranih *γ*-zeina, otopina 70%-tnog etanola i 2%-tnog β-merkaptoetanola ekstrahirala je i *α*-zeine (tablica 18.). *α*-zeini su hidrofobni proteini koji se nalaze u jezgri proteinskih tijela (Guo i sur, 2013), pri čemu je 19 kDa lokaliziran u cijeloj jezgri, a 22 kDa se nalazi u graničnom području između jezgre i ovojnice *γ*-zeina (Holding i sur., 2007). Rezultati analize pokazuju da je samo jedan 19 kDa *α*-zein detektiran u zeinskom ekstraktu *γ*-zeina, dok su ostali 22 kDa *α*-zeini.

Istovremena ekstrakcija *γ*-zeina i 22 kDa *α*-zeina nije iznenađenje. Naime po dosadašnjim strukturalnim saznanjima proteinski tijela i interakcijama između pojedinih frakcija zeina unutar istih, kao i s obzirom na topljivost pojedinih zeina, ovo je očekivani rezultat. 22 kDa *α*-zeini osim lokacije unutar proteinskih tijela (neposredno ispod omotača *γ*-zeina) pokazuju i visoku razinu protein-protein interakcija sa 16 kDa *γ*-zeinima i 15 kDa *β*-zeinima. Općenito *α*-zeini imaju niski nivo međusobnih protein-protein interakcija. Interakcije između *α*-zeina i δ-zeina te *α*-zeina s 16 kDa *γ*-zeinima i 15 kDa *β*-zeinima omogućavaju stabilnost jezgre proteinskih tijela (Holding i Larkins, 2006; Guo i sur., 2013). Zato nije iznenađujuće da su se 16 kDa *γ*-zeini i *α*-zeini zajedno ekstrahirali. Dodatno, 70% etanol smatra se primarnim otapalom u ekstrakciji zeina, tako da nije neočekivano da se prilikom postupka ekstrakcije *γ*-zeina dogodila i ekstrakcija 22 kDa *α*-zeina.

Rezultati ekstrakcije *γ*-zeina su pokazali tri definirane lokacije 16 kDa *γ*-zeina i jednu lokaciju 27 kDa *γ*-zeina na 2-DE gelovima (slika 40.; tablica 19.). Rezultati 2-DE separacije 16 kDa *γ*-zeina ukazuju na pomak između lokacija na 2-DE gelu u ovisnosti o izoelektričnim točkama, iako su evidentno istih molekulskih masa, što govori o posttranslacijskim modifikacijama ovog tipa *γ*-zeina (slika 40.). Struktura proteina nije bila tema ovog istraživanja, stoga vrsta posttranslacijskih modifikacija nije dalje utvrđena. Sličan rezultat uočen je i kod *α*-zeina, gdje su pojedini proteini bili utvrđeni u različitim lokacijama u gelu (slika 40.; tablica 19.).

5.3.1. Razlike u detektiranim zeinima uvjetovane hibridima kukuruza te njihova povezanost s tvrdoćom zrna

U hibridu Bc 344 nije detektiran 27 kDa *γ*-zein, a s obzirom na karakteristike i lokalizaciju ovog tipa *γ*-zeina u omotaču proteinskih tijela, to je iznenađujući rezultat. Razlog niske detekcije 27 kDa *γ*-zeina proizlazi iz uvjeta ekstrakcije. Iako je u ekstrakcijsku smjesu radi redukcije disulfidnih mostova dodan reducirajući spoj, što je potrebno da bi se provela ekstrakcija *γ*-zeina, to nije dovelo do potpune ekstrakcije 27 kDa *γ*-zeina. Naime 27 kDa *γ*-zeini zahtijevaju visoki pH za potpunu ekstrakciju. To se postiže najčešće uporabom 0,5%-tnog natrij acetatnog (pH 10) ili 12,5 mM natrij boratnog (pH 10) pufera. No prilikom MALDI-TOF MS analize nehlapivi natrijevi ioni, često rade adukte s proteinima koji za rezultat imaju pomake u molekulskim masama i šire pikove (Adams i sur., 2004), što dovodi do pogrešaka prilikom analize peptida. Zato se u pravilu smanjuje ili, ako je to moguće, izbjegava upotreba natrijevih spojeva prilikom ekstrakcije proteina prije MALDI-TOF MS analiza. Dodatno, prilikom izoelektričnog fokusiranja soli smetaju jer mogu uzrokovati neželjeno zagrijavanje sustava (Figeys, 2005). U ovom istraživanju nije se obrađivala apsolutna kvantifikacija *γ*-zeina, nego su se gledale relativne razlike između sadržaja *γ*-zeina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza uslijed utjecaja hibrida, dodataka silaži i vremena siliranja. Zato smanjena ekstraktibilnost 27 kDa *γ*-zein nije predstavljala problem jer su se poštivali jednaki uvjeti ekstrakcije u svim uzorcima silaža.

Iz rezultata razgradnje *γ*-zeina u silažama ispitivanih hibrida dobiva se dojam da je intenzitet razgradnje nešto viši u silažama Bc 462 i Bc 513 pc u odnosu na silažu Bc 344. No realna usporedba hibrida nije moguća jer se ona u pravilu radi između 2-DE gelova koji su zajedno elektroforetski vođeni. Doduše, zanimljiva je činjenica da su, što se tiče ukupnih zeina i frakcija zeina te općenito tvrdoće zrna, hibridi Bc 462 i Bc 513 pc slični, dok je Bc 344 nešto drugačiji (manje tvrdoće, niži udio ukupnih zeina).

Udio pojedinih frakcija zeina u ukupnim zeinima često se povezuje s tvrdoćom endosperma (Mestres i Matencio, 1996). *α*-zeini se smatraju frakcijom zeina koja uz 27 kDa *γ*-zeine koji su odgovorni za inicijaciju proteinskih tijela ima najviše utjecaja, na tip endosperma odnosno tvrdoću zrna. Dombrink-Kurtzman i Bietz (1993) uveli su pretpostavku o negativnom odnosu između tvrdoće zrna i visokog udjela *γ*-zeina te pozitivnom odnosu tvrdoće zrna i visokog udjela α-zeina uz iznimku za QPM. U QPM kukuruzu nema funkcionalnog opaque-2 proteina koji je aktivator transkripcije *α*-zeina (Schmidt i sur., 1990) te su tako najzastupljenija skupina *γ*-zeini koji jedini mogu bilježiti rast pri povećanju sinteze zeina. No iako se dobiveni rezultati ovog istraživanja ponašaju

do neke mjere u skladu s pretpostavkom danom u radu Dominik-Kurtzmana i Bietza (1993), hibrid Bc 513 pc imao je zamjetno veću tvrdoću u odnosu na ostala dva ispitivana hibrida, dok je istovremeno pokazivao najniže sadržaje *γ*-zeina. Uz iznimku, 27 kDa *γ*-zein u Bc 513 pc bio je manje zastupljen nego u Bc 462, dok taj protein u Bc 344 nije detektiran, te dodatno Bc 513 pc nije imao značajno više udjele detektiranih *α*-zeina od hibrida Bc 344, ali je imao više udjele od Bc 462. Rezultati istraživanja pokazuju veće slaganje s Prattom i sur. (1995) te novijim publikacijama (Holding i Larkins 2006; Holding i Larkins, 2009; Guo i sur., 2013) koji su došli do zaključka da, iako su sadržaj zeina i tvrdoća genotipski određena svojstva, ne postoji jednostavan odnos između sadržaja zeina i tvrdoće zrna. Tako će u nekim hibridima doći do prikazanog odnosa i utjecaja pojedinih frakcija zeina na ukupnu tvrdoću, dok u drugima neće te odnosi između pojedinih tipova zeina zapravo dovode do različitih tipova endosperma i općenito tvrdoće zrna. Iz toga proizlazi činjenica da je neutemeljeno i pojednostavljeno govoriti o utjecaju samo jedne skupine zeina na tvrdoću kada je ona zapravo, rezultat kompleksnih uzročno-posljedičnih odnosa između zeina i još nekih faktora poput veze između škrobnih granula i proteinskih tijela unutar proteinsko-škrobne matrice te sastava samog škroba (Duvick, 1961; Wu i sur., 2010).

Škrob je najzastupljenija frakcija u zrnu kukuruza, gdje čini i do 80% mase zrna. U zrnu veće granule škroba nalaze se u brašnavom endospermu, a manje u caklavom (Duvick, 1961). Dodatno, prilikom analize tvrdoće cijelih zrna i njene povezanosti s ukupnim sadržajem pojedinih zeina treba imati na umu da se zrna kukuruza različitih hibrida sastoje od drugačijih odnosa caklavog i brašnavog endosperma te da se sadržaj pojedinih zeina razlikuje u brašnavom i caklavom dijelu. Brašnavi endosperm sadržava više nezrelih proteinskih tijela koja imaju manje *α*-zeina i δ-zeina u središtu tijela te se sintetiziraju u kasnijim fazama, dok caklavi sadržava zrela proteinska tijela koja imaju više *α*-zeina i δ-zeina (Dombrink-Kurtzman i Bietz,1993; Holding i Larkins, 2006). Kako se u ovom istraživanju nije radila standardna disekcija zrna, nije moguće govoriti o udjelima pojedinih tipova endosperma u ispitivanim zrnima te je teško naći realnu poveznicu koja ne bi bila više od puke teorije između sadržaja pojedinih frakcija zeina i utvrđene tvrdoće ispitivanih zrna kukuruza.

5.3.2. Razgradnja zeina - siliranje i tretman siliranja

Detektirana povećanja u udjelima topljivog proteina i amonijaka (tablica 16.) dokaz su da siliranje uzrokuje razgradnju proteina zrna kukuruza (Johnson i sur., 2002; Slottner i

Bertilsson, 2006; Ferraretto i sur., 2015). U skladu s time u ovom istraživanju evidentirana je redukcija svih detektiranih *γ*-zeina u svim hibridima bez obzira na tip testiranog dodatka u 364 dana starim silažama visoko vlažnog zrna kukuruza (tablica 20.; tablica 21.; tablica 22.). Hoffmann i sur. (2011) u svom istraživanju na silažama dvaju hibrida visoko vlažnog zrna kukuruza silirana 240 dana dobili su slične podatke. Evidentirali su redukciju u *γ*-zeinima, ali bez opažene razlike u razgradnji između 27 kDa i 16 kDa *γ*-zeina. S druge strane ovo istraživanje ukazuje na nešto pojačanu razgradnju 27 kDa *γ*-zeina u odnosu na 16 kDa *γ*-zein. Moguće je da razlika proizlazi iz lokacije 27 kDa *γ*-zeina koji se nalaze na površini proteinskih tijela (Guo i sur., 2013) te su tako prvi u kontaktu s proteolitičkim enzimima mikroorganizama i biljke (McDonald i sur., 1991) te mliječnom kiselinom (Lawton, 2002), glavnim faktorima razgradnje zeina.

Tip dodatka silaži nije imao utjecaja na razgradnju 27 kDa *γ*-zeina, ali jest na razgradnju 16 kDa *γ*-zeina. Kod hibrida Bc 462 i Bc 513 pc silaže s dodatkom inokulanta imale su najveću redukciju u 16 kDa *γ*-zeinima, a najmanju su imale kontrolne silaže. U hibridu Bc 344 situacija je bila nešto drugačija te je najveću razgradnju 16 kDa *γ*-zeina imala silaža s dodatkom mliječne kiseline, a najmanju kontrolne silaže. Evidentna razlika između tretmana u razgradnji 16 kDa *γ*-zeina u suprotnosti je s rezultatima u radu Hoffmana i sur. (2011) koji nisu zabilježili razliku u razgradnji pojedinih frakcija zeina, pa tako ni 16 kDa *γ*-zeina, u silažama s dodatkom inokulanta i kontrolnim silažama. Osnovna dva utjecaja na razgradnju zeina imaju proteolitički enzimi te organske kiseline koje se sintetiziraju tijekom fermentacije, u prvom redu mliječna te nešto slabije octena (McDonald i sur., 1991; Lawton, 2002). U 364. danu sadržaj mliječne kiseline razlikovao se između hibrida u odgovorima na upotrijebljene dodatke, što je vidljivo iz interakcije hibrida, dodataka silaži i perioda siliranja na sadržaj mliječne kiseline (slika 36.). U hibridu Bc 462 utvrđena je signifikantna razlika između sva tri tretmana s najvišom vrijednosti u silažama s dodatkom inokulanta, a najmanjim u kontrolnim silažama. Hibridi Bc 344 i Bc 513 pc imaju slične odgovore sa signifikantno većim sadržajem mliječne kiseline u silažama s inokulantom, dok su ostala dva tretmana imala sličan sadržaj mliječne kiseline. U slučaju da mliječna kiselina ima primarnu ulogu na razgradnju zeina, tada bi silaže s dodatkom inokulanta imale najvišu razgradnju zeina u sva tri hibrida, a silaže s dodatkom mliječne kiseline i kontrolne silaže imale bi sličnu razgradnju u Bc 344 i Bc 513 pc, što nije slučaj. Rezultati potvrđuju hipotezu da na razgradnju zeina, primarno *γ*-zeina, glavni utjecaj imaju proteolitički enzimi (Hoffman i sur., 2011). Proteolitički enzimi mikroorganizama i same biljke vrše razgradnju proteina u silažama (McDonald i sur., 1991). Iako nije utvrđen signifikantan utjecaj interakcije hibrida i dodataka silaži na broj laktobacila, podaci govore o većem broju laktobacila u silažama s dodatkom inokulanta u hibridima Bc 462 i Bc 513 pc (Bc 462, inokulant: 5,53; Bc 462, mliječna kiselina: 3,23; Bc 513 pc, inokulant: 3,94; Bc

513 pc, mliječna kiselina: 2,00 log CFU/g ST). U Bc 344 zabilježen je obrnuti trend s većim brojem laktobacila u silažama s dodatkom mliječne kiseline (inokulant: 2,76; mliječna kiselina: 3,45 log CFU/g ST). Razlike zabilježene između broja ukupnih laktobacila u silažama ispitivanih hibrida s različitim dodacima mogući su odgovor na zabilježenu razliku u razgradnji 16 kDa *γ*-zeina između hibrida Bc 344 i ostala dva.

Iako je opažena i razgradnja *α*-zeina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza svih hibrida bez obzira na tip dodatka, ona je bila manjeg intenziteta nego razgradnja *γ*-zeina (tablica 23.; tablica 24.; tablica 25.). Nije u svim lokacijama na 2-DE gelovima zabilježena redukcija s obzirom na kontrolne uzorke (zrno kukuruza prije siliranja). Smanjeni intenzitet razgradnje *α*-zeina u odnosu na razgradnju *γ*-zeina (Hoffman i sur., 2011) moguće proizlazi iz lokacije *α*-zeina u jezgri proteinskih tijela (Holding i Larkins, 2006) te su tako manje pristupačni djelovanju enzima i kiselina. Nije utvrđen konzistentan trend između silaža različitih tipova dodataka triju ispitivanih hibrida u razgradnji *α*-zeina te je nemoguće utvrditi koji je tretman imao najveći utjecaj na razgradnju *α*-zeina, što je u skladu s radom Hoffmana i sur. (2011).

5.4. Razgradivost silaža

Razgradivost silaža je pojam koji je vezan uz *in situ* metodu određivanja probavljivosti hranjivih tvari, dok buražna *in situ* probavljivost nije jednaka buražnoj probavljivosti. Prilikom određivanja razgradivosti u pravilu se dobivaju nešto niže vrijednosti za sporo razgradive izvore škroba kao što je kukuruz, a nešto više za brzo razgradive izvore kao što je ječam (Huhtanen i Sveinbjörnsson, 2005). *In situ* metode se ne koriste za određivanje apsolutnih vrijednosti buražne probavljivosti, nego kao metode usporedbe različiti tretmana siliranja, hibrida kukuruza te drugih važnih komponenti i parametara u hranidbi preživača. Makro *in vitro* metoda primijenjena u ovom istraživanju koristi se za određivanje razgradivosti kukuruznih silaža u njihovom nativnom obliku (Ferreira i Martens, 2005). Ova metoda koristi najlonske vrećice koje se koriste prilikom *in situ* određivanja razgradivosti, ali koje se inkubiraju u inkubatoru s buražnim sokom a ne u buragu životinje. Metoda kombinira principe *in situ* i *in vitro* polukontinuiranih sustava.

Silaže kukuruza važno su krmivo u hranidbi visokoproduktivnih životinja, kao što su mliječne krave i tovljene životinje (Peyrat i sur., 2014). Kako bi se maksimizirao odgovor životinje na obrok, potrebno je znati hranidbene potencijale obroka. Razgradivost hranjivih tvari u buragu jedan je od važnih parametara koji definiraju potencijal određene hranjive

tvari i obroka. Siliranje je jedan od načina na koji se može povećati hranidbeni potencijal kukuruza u obroku (Yousif i Tinay, 2000). No ako povećanje probavljivosti škroba nije ukalkulirano u obrok i iskorišteno na optimalan način, ono može dovesti do ozbiljnih proizvodnih nedostataka, pa čak i do zdravstvenih posljedica po životinju, što na kraju producira iznimne financijske gubitke za proizvođača. Odstajala silaža visoko vlažnog zrna kukuruza u usporedbi sa suhim zrnom ima višu i bržu probavljivost škroba u buragu pa junad brže raste, a krave daju jednako ili više mlijeka s višim udjelom proteina, ali manjim mliječne masti te je moguća češća pojava acidoza (San Ementario i sur., 2000; Wu i sur., 2001).

Razgradivost hranjivih tvari u buragu objašnjena je pomoću kinetike prvog reda kroz eksponencijalnu jednadžbu razgradnje denifiranu kod Ørskova i McDonalda (1979) te kasnije upotpunjenu s lag fazom (McDonald, 1981; Dhanoa, 1988). Lag faza je prva faza razgradnje u kojoj kinetika prvog reda ne može objasnit promjene koje se događaju uslijed nepotpune hidratacije supstrata i kolonizacije od strane mikroorganizama buraga (Milgen i Baumont, 1995). Model iskorišten za određivanje parametara razgradivosti silaža visoko vlažnog zrna u ovom istraživanju imao je lag fazu, iako najčešće modeli koji se primjenjuju za razgradivost škroba i suhe tvari silaža zanemaruju utjecaj lag faze (Correa i sur., 2002; Peyrat i sur., 2014). U modelima koji ne koriste lag fazu pretpostavka je da su hidratacija i kolonizacija mikroorganizmima trenutačne (Milgen i Baumont, 1995), što je malo vjerojatno u stvarnim uvjetima. Kako je sama priprema otopine za inkubaciju s buražnim sokom u ovom istraživanju zahtijevala nešto dulju pripremu te je bilo za očekivati da su mikroorganizmi buraga bili podvrgnuti nešto nepovoljnijim okolnostima nego inače, trenutačne kolonizacija i hidratacija ispitivanog uzorka silaže malo su vjerojatne. Dodatno, model bez lag faze uključuje inkubaciju vrećica u buragu, što nije bio slučaj u ovom istraživanju. Lag faza ispitivanih razgradivosti suhe tvari nije se razlikovala signifikantno između ispitivanih hibrida, iako su vrijednosti lag faze bile visoke (od 5,8 sati do 6,31 sati). Vrijednosti su bile očekivane zbog ranije navedenog duljeg vremena pripreme otopine za inkubaciju.

U fazi razgradnje koristi se model reakcije prvog reda u kojoj brzina reakcije ovisi samo o koncentraciji supstrata koji se razgrađuje (hranjiva tvar koja se mjeri). To znači da se zanemaruje utjecaj drugih parametara kao što su mikroorganizmi, enzimi, aktivna površina odnosno smatra se da je utjecaj svih ostalih parametara konstantan (Milgen i Baumont, 1995). Iako ne ulazi izravno u proračun brzine razgradivosti koja je vezana za potencijalno razgradivu frakciju, brzo razgradiva frakcija važan je parametar u određivanju razgradivosti škroba (Peyrat i sur., 2014). Brzo razgradiva frakcija suhe tvari silaža ispitivanih hibrida bilježila je signifikantno nižu vrijednost u Bc 513 pc, hibridu koji je imao najvišu vrijednost tvrdoće zrna (tablica 14.). Slične rezultate s dobivenima u ovom

istraživanju imali su Philippeau i Michalet-Doreau (1998) koji su zabilježili signifikantno nižu brzo razgradivu frakciju u silažama visoko vlažnog zrna tvrđih kukuruza u odnosu na silaže kukuruza mekših zrna (tvrd: 0,56; mekan: 0,71). Isto tako su i Szasz i sur. (2007) dobili više vrijednosti brzo razgradive frakcije u brašnastom endospermu u odnosu na caklavi endosperm, ali ne i u uzorcima s višom suhom tvari te su utvrdili kvadratičan utjecaj vlage na vrijednosti brzo razgradive frakcije u silažama caklavog tipa kukuruza. Kako su brzo razgradiva frakcija i potencijalno razgradiva frakcija u obrnutom odnosu, tako je u Bc 513 pc zabilježena najviša vrijednost potencijalno razgradive frakcije koja je bila slična vrijednosti Bc 462, a obje su bile signifikantno više od vrijednosti u Bc 344. Na temelju visoke potencijalno razgradive frakcije Bc 513 pc je zabilježio i nešto višu brzinu razgradivosti u odnosu na Bc 462, ali bez statističke signifikantnosti. Najvišu vrijednosti brzine razgradivosti imao je Bc 344 (0,074 sat^{-1}). Szasz i sur. (2007) nisu zabilježili signifikantan utjecaj tipa endosperma na brzinu razgradivosti, iako su zabilježili više vrijednosti u brašnastom endospermu u odnosu na caklavi uz izmniku kod silaža s visokom vlagom (36,5%), gdje je zabilježen obrnuti trend. Autori nisu objasnili utvrđenu promjenu u vlažnijim silažama. Rezultati efektivne razgradivosti suhe tvari ispitivanih hibrida u ovom istraživanju u skladu su s utvrđenim vrijednostima potencijalno i brzo razgradive frakcije: kako je hibrid Bc 513 pc imao najnižu brzo razgradivu frakciju, tako je imao i signifikantno nižu efektivnu razgradivost suhe tvari. Efektivna razgradivost je pod najvećim utjecajem brzo razgradive frakcije, dok povećanje brzo razgradive frakcije vodi ka povećanju efektivne razgradivosti (Szasz i sur., 2007; Peyrat i sur., 2014).

Dodatak silaži nije imao signifikantan učinak na lag fazu, kao ni na brzu i potencijalno razgradivu frakciju u ispitivanim silažama, ali je djelovao na brzinu razgradivosti i efektivnu razgradivost suhe tvari. Brzina razgradivosti suhe tvari najviša je u silažama s dodatkom inokulanta, kao i efektivna razgradivost suhe tvari (tablica 27.). Rezultati govore u prilog pozitivnom učinku dodatka inokulanta na probavljivost suhe tvari. U dostupnoj literaturi minimalan je broj radova koji istražuju utjecaj dodatka inokulanta na proizvodne parametre silaža visoko vlažnog zrna kukuruza, pogotovo na razgradivost i probavljivost u buragu. Fellner i suradnici (2001) su ispitivali utjecaj silaža visoko vlažnog zrna kukuruza s dodatkom inokulanta na parametre rasta i iskorištenje obroka tovnih junica te su utvrdili bolje proizvodne karakteristike za silaže s dodatkom inokulanta sa signifikantnim utjecajem tretmana siliranja na porast tjelesne mase. S druge strane isti autori su u drugom istraživanju na silaži visoko vlažnog zrna kukuruza dobili suprotne rezultate koji pokazuju da dodatak inokulanta nema utjecaj na proizvodne parametre i probavljivost silaža u tovu junica (Phillip i Fellner, 1992). Slične rezultate bez značajnog utjecaja dodataka silaži na proizvodne parametre u hranidbi junica dobili su i Diaz i sur.

(2013). Dostupna literatura pokazuje na potrebu za daljnjim ispitivanjem utjecaja dodataka silaži na razgradivost i probavljivost silaža visoko vlažnog zrna kukuruza.

Utvrđen utjecaj interakcije dodataka silaži i perioda siliranja (slika 43.) govori da je vrijednost brzine razgradivosti suhe tvari silažne mase bila različita u silažama različitih tretmana siliranja u različitim vremenskom točkama siliranja. Naime na početku siliranja nije utvrđena razlika u brzini razgradivosti dodataka i kontrolne silaže, ali u 364. danu siliranja situacija je bila zamjetno drugačija. Silaže s dodatkom inokulanta imale su najviše vrijednosti, a silaže s dodatkom mliječne kiseline najniže. Moguće je da zapažena razlika proizlazi iz većeg broja mikroorganizama u silažama s dodatkom inokulanta u odnosu na silaže s dodatkom mliječne kiseline (tablica 33.). Proteolitički enzimi mikroorganizama imaju važan utjecaj na proteolizu u silažnoj masi (McDonald i sur., 1991), a samim time i na razgradivost suhe tvari (pogledaj niže raspravu o korelacijama parametara razgradivosti suhe tvari i parametara kvalitete silaža).

Utjecaj stajanja silaža ili vremena siliranja na pozitivno povećanje *in situ* parametara buražne probavljivosti škroba u silažama visoko vlažnog zrna utvrđen je u ovom istraživanju. Svi parametri silaža uključujući i lag fazu razlikovali su se između samljevenog zrna kukuruza prije siliranja te silaža nakon 364 dana stajanja. Lag faza bila je signifikantno kraća u silažama 364. dan (5,43 sata) u odnosu na početnu masu (7,37 sati). Unutar vrećica za inkubaciju utvrđen je mikrookoliš na koji veći utjecaj ima krmivo za koje se ispituje razgradivost, nego sam buražni sok (Nozière i Michalet-Doreau, 1996). Silirana masa ima niži pH od početne mase, narušenu proteinsko-škrobnu matricu te mikrookoliš koji pozitivno utječe na aktivnost amilolitičkih mikroorganizama (McAllister i Cheng, 1996; Philippeau i Michalet-Doreau, 1998; Hoffman i sur., 2011). Gotovo dvostruko veći porast u brzo razgradivoj frakciji razgradivosti suhe tvari zabilježen je 364. dan (0,28 na početku te na 0,54 na kraju siliranja). Ovaj podatak pokazuje da je u siliranoj masi narastao udio manjih i lakše razgradivih čestica. Porast u brzo razgradivoj frakciji u siliranim uzorcima zabilježili su i ostali autori (Philippeau i Michalet-Doreau, 1998; Peyrat i sur., 2014). Silirana masa isto tako je bilježila i višu brzinu razgradivosti kao i ukupni rezultat razgradivost suhe tvari predočen kroz rezultat efektivne razgradivosti. Rezultati ovog istraživanja su u skladu s ostalim *in situ* istraživanjima razgradivosti kukuruznih silaža (Galyean i sur., 1981; Nocek, 1987; Philippeau i Michalet-Doreau, 1998; Jensen i sur., 2004; Peyrat i sur., 2014) te dodatno pokazuju suodnos s realnim proizvodnim podacima koji govore o značajnijem poboljšanju *in vivo* parametara probavljivosti u siliranoj masi (McKnight i sur., 1973; San Ementario i sur., 2000; Wu i sur., 2001).

Korelacije utvrđene između parametara razgradivosti i parametara fermentacije silaža visoko vlažnog zrna kukuruza ukazuju na važan utjecaj siliranja na razgradivost suhe tvari. Efektivna razgradivost silaža pokazivala je najviše pozitivne relacije (0,91) s

udjelom topljivog proteina koji je važan pokazatelj proteolize u silažama (Winters i sur., 2000; Johnson i sur.., 2002; Slottnerr and Bertilsson, 2006). Proteoliza svih proteina i zeina tijekom fermentacije ali i u kasnijim fazama stajanja silaža (Messman i Weiss, 1994; Hoffman i sur., 2011) za rezultat ima narušavanje strukture proteinsko škrobne matrice (Philippeau i Michalet-Doreau, 1998; Hoffman i sur., 2011), što dovodi do očito više ruminalne razgradivosti suhe tvari, vrlo vjerojatno uslijed više buražne razgradivosti škroba (Philippeau i sur., 1999; Ngonyamo-Majee i sur., 2008).

Razgradivost škroba silaža visoko vlažnog zrna kukuruza ispitivanih hibrida pokazivala je slične odnose kao i razgradivost suhe tvari silaža uz iznimku u hibridu Bc 344 (tablica 29.). Naime Bc 344 imao je zamjetno nižu brzo razgradivu frakciju od ostalih dvaju hibrida, iako ne signifikantno različitu od Bc 513 pc. Razlog tome nije lako objasniti iz rezultata analiza koje su provedene u istraživanju. Moguće je da su ostala dva hibrida imala zamjetno više manjih čestica od Bc 344 koje u pridonijele nerealnom povećenju brzo razgradive frakcije (Huhtanen i Sveinbjörnsson, 2005), iako je to malo vjerojatno jer bi se razlika pojavila i kod brzo razgradive frakcije suhe tvari, što nije slučaj (tablica 26.). Isto tako moguće je da je smanjena razgradnja zeina koja je primijećena u hibridu Bc 344 razlog ovoj razlici. No zanimljivo je da pri vrijednosti brzine razgradivosti potencijalno razgradive frakcije (c) odnos između silaža hibrida bio je u skladu s uvriježenom postavkom o višoj brzini razgradivosti škroba u mekšim hibridima kukuruza (Philippeau i Michalet-Doreau, 1998; Correa i sur., 2002; Szasz i sur., 2007; Peyrat i sur., 2014). Vrijednost efektivne razgradivosti škroba bila je nešto niža u Bc 344 u odnosu na Bc 462, što je neočekivano. No zbog utvrđene niže brzo razgradive frakcije u Bc 344, ovo je računski realan rezultat (Szasz i sur., 2007; Peyrat i sur., 2014). Dodatno, hibrid Bc 462 je imao viši sadržaj škroba od Bc 344, što je zanimljivo s obzirom na to da klasifikacija hibrida Bc 344 kao kvalitetnog zubana u odnosu na Bc 462 kao polutvrdunca pretpostavlja viši sadržaj škroba u Bc 344 (Gotlin, 1967).

Parametri razgradivosti škroba silaža s obzirom na upotrijebljene dodatke silaži ponašali su se u istim odnosima kao što je utvrđeno i za parametre razgradivosti suhe tvari, uz razliku lag faze silaža s dodatkom inokulanta i mliječne kiseline koja je bila kraća nego lag faza kontrolnih silaža. To govori da su silaže s dodatkom mliječne kiseline i dodatka inokulanta imale povoljnije uvjete u mikrookolišu od kontrolnih silaža za aktivnost amilolitičkih mikroorganizama (Nozière i Michalet-Doreau, 1996; McAllister i Cheng, 1996). Efektivna razgradivost nije se razlikovala između tretmana, što je zbog utvrđene sličnosti u brzo razgradivoj frakciji između tretmana bilo za očekivati (Szasz i sur., 2007). Isto kao i kod brzine razgradivosti suhe tvari silaža, brzina razgradivosti škroba imala je najvišu vrijednost u silažama s dodatkom inokulanta, dok su silaže s dodatkom mliječne kiseline i kontrolne silaže imale slične signifikantno niže vrijednosti.

U silažama uzorkovanim 364. dan zabilježen je signifikantan, ali minimalno veći sadržaj škroba (0. dan: 639,4 g/kg ST; 364. dan: 655,3 g/kg ST). Iako se sadržaj škroba u pravilu ne mijenja tijekom siliranja, male promjene, u povišenju ili sniženju sadržaja su isto zabilježene i ne pridonose značajno promjeni niti kvalitete niti razgradivosti silaže (Ballard i sur., 2001; Cherney i Cox, 2007; Kung i sur., 2014). Kao i kod razgradivosti suhe tvari, silaže visoko vlažno zrna kukuruza 364. dan imale su signifikantno kraću lag fazu od silaža na početku siliranja (0. dan: 6,01; 364. dan: 4,32). Isto kao i kod lag faze razgradivosti suhe tvari, mikrookolišni uvjeti silaža 364. dan bili su povoljniji za amilolitičke mikroorganizme od silaža na početku siliranja (Nozière i Michalet-Doreau, 1996). Brzo razgradiva frakcija razgradivosti škroba isto je bila signifikantno viša 364. dan nego na početku siliranja, što je bilo za očekivati s obzirom na utvrđene promjene i kod razgradivosti suhe tvari. Peyart i suradnici (2014) su dobili iste odnose između razgradivosti škroba i razgradivosti suhe tvari koji su zabilježeni u ovom istraživanju. Kako su rasle (padale) vrijednosti pojedinih parametara razgradivosti škroba, slični ili isti tren zabilježen je kod razgradivosti suhe tvari. Na razgradivost suhe tvari u zrnu kukuruza, bilo silaži, ili bilo suhom zrnu, primarni utjecaj ima razgradivost škroba (Philippeau i sur., 1999; Ngonyamo-Majee i sur., 2008) zbog najvećeg udjela škroba u suhoj tvari, što je potvrđeno i rezultatom linearne regresije ovisnosti brzine razgradivosti suhe tvari o brzini razgradivosti škroba (slika 45.).

Brzina razgradivosti potencijalno razgradive frakcije škroba bila je signifikantno veća u silažama 364. dan i to zamjetno, kao i efektivna razgradivost škroba (razlika brzina: 0,047 sat^{-1}; razlika efektivnih razgradivosti škroba: 0,25). Slične odnose između svježe mase i silaža dobili su i Peyrat i sur. (2014), ali s nešto manjim odnosima (porast u brzini oko 0,013 sat^{-1} te 0,15 za efektivnu razgradivost škroba). Philippeau i Michalet-Doreau (1998) na silažama visoko vlažnog zrna kukuruza utvrdili su isto porast brzine razgradivosti i efektivne razgradivosti, ali uz isto niže vrijednosti, što je vrlo vjerojatno bilo uvjetovano kraćim periodom siliranja od 90 dana u odnosu na ovdje predočeno istraživanje (364 dana): naime kako raste period stajanja, tako se bilježi viša probavljivost i razgradivost škroba (Stock i sur., 1991).

Korelacije utvrđene između parametara razgradivosti škroba i kvaliteta silaža pokazale su vrijednosti korelacija koje se izrazito slažu s vrijednostima korelacija utvrđenim između razgradivost suhe tvari i parametara kvalitete siliranja. Kao i kod razgradivosti suhe tvari, efektivna razgradivost škroba pokazivala je najviše vrijednosti korelacija s parametrima kvalitete silaža. Udio topljivog proteina i efektivna razgradivost škroba bilježili su visoku pozitivnu korelaciju (0,90). Općenito je udio topljivog proteina bilježio pozitivne korelacije s parametrima razgradivosti škroba, osim sa sporo razgradivom frakcijom. Ferraretto i suradnici (2014) napravili su linearnu regresiju između

udjela topljivog proteina i *in vitro* probavljivosti škroba u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza te su bilježili dobre parametre modela (R^2 = 0,55; RMSE = 6,42) pokazujući da proteoliza ima primaran utjecaj na probavljivost škroba. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na isti zaključak s korelacijom između brzine razgradivosti škroba i udjela topljivog proteina od 0,75. Linearna regresija između *in vitro* probavljivosti škroba i udjela amonijaka (Ferraretto i sur., 2014) dala je još bolje parametre R^2 = 0,61, RMSE = 5,94, što je nešto drugačije nego u ovom istraživanju koje je imalo nižu korelaciju (0,58) između brzine razgradivosti škroba i udjela amonijaka, nego udjela topljivih proteina. Topljivi proteini prvi su produkt proteolize, dok je amonijak produkt sljedeće reakcije, deaminacije aminokiselina (McDonald i sur., 1991), čime je topljivi protein primarni pokazatelj proteolize. Ostale korelacije su pokazale, kao i kod razgradivosti suhe tvari, važan utjecaj siliranja i parametara kvalitete silaža (pH, titracijska kiselost i mliječna kiselina) na razgradivost škroba. To je očekivano jer se dva najvažnija mehanizma odgovorna za razgradnju proteinsko-škrobne matrice, otapanje i proteoliza, događaju u kiselim uvjetima (McDonald i sur., 1991; Lawton, 2002; Ferraretto i sur., 2014).

Proteinska matrica s proteinskim tijelima ima negativan utjecaj na probavljivost i razgradivost škroba, dok kukuruz s većom caklavosti pokazuje niže vrijednosti probavljivosti i razgradivosti od kukuruza s nižom caklavosti (McAllister i sur., 1993; Philippeau i sur., 2000; Correa i sur., 2002; Ngonyamo-Majee i sur., 2008; Lopes i sur., 2009; Ali i sur., 2014). Tri hibrida testirana u ovom istraživanju imala su signifikantno različite sadržaje ukupnih zeina (Bc 513 pc: 59,96% od SP; Bc 462: 55,13% od SP; Bc 344: 48,75% od SP), što je u skladu s njihovim klasifikacijama hibrida Bc 344 kao kvalitetnog zubana, Bc 462 kao polutvrdunca te trećeg Bc 513 pc kao kokičara. Što je veći udio caklavog endosperma u zrnu kukuruza, to je veći udio ukupnih zeina (Paiva i sur., 1991; Dombrink-Kurtzman i Bietz, 1993; Landry i Delhaye, 2007). Između tri testirana hibrida, bez utjecaja silažnih tretmana i siliranja općenito, utvrđena je razlika u brzini razgradivosti škroba (Bc 513 pc: 0,043 sat^{-1}; Bc 462: 0,054 sat^{-1}; Bc 344: 0,055 sat^{-1}) koja se proširila na sveukupni utjecaj i u početnoj i u siliranoj masi (tablica 29.). Hibrid s najvišim sadržajem ukupnih zeina (Bc 513 pc) imao je najmanju brzinu razgradivosti škroba, a hibrid s najmanjim sadržajem ukupnih zeina (Bc 344) najvišu.

Utjecaj razgradnje *γ*-zeina utvrđen u ovom istraživanju pokazao je najveću razgradnju u silažama s dodatkom inokulanta u hibridima Bc 462 i Bc 513 pc, ali ne i u hibridu Bc 344. Kako su silaže s dodatkom inokulanta bilježile višu razgradivost u sva tri hibrida (nije zabilježen signifikantan utjecaj interakcije hibrida i dodataka silaži), iz rezultata proizlazi da se ne može govoriti o jednoznačnom utjecaju zeina na razgradivost škroba, već da i drugi faktori utječu na razgradivost škroba, od kojih su neki: aktivna površina granula škroba, pore na granulama, odnos amiloza/amilopektin (Singh i sur.,

2010). No utvrđena razlika između silaža na početku siliranja i 364. dan pokazuje da razgradnja zeina ima pozitivan učinak na razgradivost škroba, ali intenzitet interakcije nije moguće zaključiti iz dostupnih rezultata.

6. ZAKLJUČCI

Nakon godine dana stajanja silaža smanjio se sadržaj 16 kDa γ-zeina u silažama svih testiranih hibrida u odnosu na početnu zelenu masu s različitim zabilježenim intenzitetom u različitim tretmanima siliranja. U silažama mekšeg hibrida, Bc 344, najveća razgradnja 16 kDa *γ*-zeina utvrđena je kod silaža s dodatkom mliječne kiseline. Slabiju razgradnju imao je tretman s dodatkom inokulanta, dok je najniža razgradnja utvrđena za kontrolnu silažu bez dodataka. Silaže tvrđih hibrida, Bc 462 i Bc kokičar, imale su najveću razgradnju 16 kDa *γ*-zeina u silažama s dodatkom inokulanta, slabiju razgradnju imale su silaže s dodatkom mliječne kiseline, dok je najniža razgradnja utvrđena u kontrolnim silažama.

Tijekom stajanja silaža visoko vlažnog zrna kukuruza zabilježen je porast u ukupnim zeinima. Istovremeno rezultati 2-D elektroforeze ekstrakta *γ*-zeina nakon godine dana stajanja silaža pokazuju razgradnju zeina. Porast udjela ukupnih zeina tijekom stajanja silaža moguće ukazuje na to da metoda za određivanje ukupnih zeina primijenjena u ovom istraživanju nije odgovarajuća za kvantifikaciju ove skupine proteina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza.

Nakon godine dana stajanja silaža povećala se razgradivost škroba i suhe tvari u svim istraživanim hibridima u odnosu na zelenu masu bez obzira na upotrijebljene dodatke.

Utvrđena je veća razgradnja 16 kDa *γ*-zeina i detektiranih *α*-zeina u silažama visoko vlažnog zrna kukuruza koje karakterizira viši početni udio zeina u zelenoj masi prije siliranja.

7. POPIS LITERATURE

1. Adams W. R., Huang S., Kriz A. L., Luethy M. H. (2004). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of zeins in mature maize kernels. Journal of agricultural and food chemistry 52: 1842-1849
2. Adesogan A. T. (2005). Effect of bag type on the apparent digestibility of feeds in ANKOM Daisy II incubators. Animal feed science and technology 119(3), 333-344
3. Aebersold R., Goodlett D. R. (2001). Mass spectrometry in proteomics. Chem. Rev. 101: 269-295
4. Aebersold R., Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. Nature 422, 198-207
5. Ahvenjarvi S., Skiba B., Huhtanen P. (2001). Effect of heterogeneous digesta chemical composition on the accuracy of measurements of fiber flow in dairy cows. J. Anim. Sci. 79: 1611-1620
6. 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
7. Association of Official Analytical Chemists (AOAC International; 2003). Official methods of analysis of AOAC International, 17th edition, 2nd revision. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, Maryland
8. Azarkan M., Huet J., Baeyens-Volant D., Looze Y., Vandenbussche G. (2007). Affinity chromatography: A useful tool in proteomics studies. J. Chromatogr. B 849: 81-90
9. Bagga S., Adams H. P., Rodriguez F. D., Kemp J. D., Sengupta-Gopalan C. (1997). Coexpression of the maize delta-zein and beta-zein genes results in stable accumulation of delta-zein in endoplasmic reticulum-derived protein bodies formed by beta-zein. The Plant Cell 9: 1683-1696.
10. Baker S., Herrman T. J. (1995). Evaluating particle size. Cooperative Extension Service, Kansas State University
11. Ballard C.S., Thomas E.D., Tsang D.S., Mandebvu P., Sniffen C.J., Endres M.I., Carter M.P. (2001) Effect of corn silage hybrid on dry matter yield, nutrient composition, in vitro digestion, intake by dairy heifers, and milk production by dairy cows. Journal of Dairy Science 84: 442–452.
12. Banerjee S., Mazumdar S. (2012) Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. International Journal of Analytical Chemistry: 1-40

13. Below F.E., Seebauer J.R., Uribelarrea M., Schneerman M.C., Moose S.P. (2004). Physiological changes accompanying long-term selection for grain protein in maize. Plant Breed. Rev. 24: 133-15
14. Blandino M., Mancini M. C., Peila A., Rolle L., Vanara F., Reyneri A. (2010). Determination of maize kernel hardness: comparison of different laboratory tests to predict dry-milling performance. Journal of the Science of Food and Agriculture 90: 1870-1878.
15. Blumenthal J. M., Baltensperger D. D., Cassman K. G., Mason S. C., Pavlista A. D. (2008). Importance and effect of nitrogen on crop quality and health. Nitrogen in the environment: sources, problems, and management. 51-70
16. Boston R. S., Larkins B. A. (2009). The Genetics and Biochemistry of Maize Zein Storage Proteins. U: Handbook of Maize (J.L. Bennetzen i S. Hake, ured.). Springer, New York, 715-730
17. Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.
18. Butorac A. (2015). Evolucija bakterije lactobacillus brevis l62 tijekom produljene stacionarne faze rasta. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu
19. Cherney D. J. R., Cox W. J. (2007). Forage quality differences of corn hybrids as influenced by ensiling. Forage and Grazinglands: doi:10.1094/FG-2007-0918-01-RS
20. Cindrić M., Marković A., Horvatić A. (2009) Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. Medicina 45: 218-232
21. Cindrić M., Kraljević P. S., Horvatić A., Dodig I. (2010) Mass spectrometry – based protein identification. Patent PCT Int. Appl. WO 2011089453. Sažetak A2:2011078.
22. Coleman C. E., Herman E. M., Takasaki K., Larkins B. A. (1996). The maize gamma-zein sequesters alpha-zein and stabilizes its accumulation in protein bodies of transgenic tobacco endosperm. The Plant Cell 8: 2335-2345
23. Cone J. W. (1991). Degradation of starch in feed concentrates by enzymes, rumen fluid and rumen enzymes. Journal of the Science of Food and Agriculture 54: 23-34.
24. Contreras-Govea F. E., Muck R. E., Broderick G. A., Weimer, P. J. (2013). Lactobacillus plantarum effects on silage fermentation and in vitro microbial yield. Animal feed science and technology 179: 61-68.
25. 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
26. Cottrell J. S. (2011) Protein identification using MS/MS dana. Journal of Proteomics 74: 1842-1851

27. Crowley S., Mahony J., van Sinderen D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. Trends in Food Science and Technology 33: 93-109
28. Czerkawski J. W., Breckenridge G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). British journal of nutrition 38: 371-384.
29. Dawson T. E., Rust S. R., Yokoyama M. T. (1998). Improved fermentation and aerobic stability of ensiled, high moisture corn with the use of Propionibacterium acidipropionici. Journal of Dairy Science 81: 1015-1021
30. De Brabander D. L., Cottyn B. G., Boucqué C. V. (1992). Substitution of concentrates by ensiled high-moisture maize grain in dairy cattle diets. Animal feed science and technology: 38 57-67
31. Der Bedrosian M. C., Nestor K. E., Kung L. (2012). The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. Journal of dairy science 95: 5115-5126
32. Dhanoa M. S. (1988). On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. Grass and Forage Science 43:441-444
33. 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
34. Dombrink-Kurtzman M. A., Bietz J. A. (1993). Zein composition in hard and soft endosperm of maize. Cereal Chemistry 70: 105-105
35. Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo (DZNM; 2001). Stočna hrana – Određivanje vode i udjela drugih hlapljivih tvari, Zagreb, Hrvatska.
36. Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo (DZNM; 2010). Hrana za životinje - određivanje količine dušika i izračunavanje količine sirovih proteina – 2 dio: Razaranje u bloku/metoda destilacije parom, Zagreb, Hrvatska.
37. Državni zavod za statistiku (DZS; 2015). Priopćenje. Biljna proizvodnja u 2014. http://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2015/01-01-14_01_2015.htm (pristupljeno dana 07.01.2016)
38. Duvick D. N. (1961). Protein granules in maize endosperm cells. Cereal Chem 38: 374-385.
39. Edman P. (1950). Method for determination of the amino acid sequence in peptides. Acta Chem. Scand 4: 283-293.
40. 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
41. Esen A. (1986). Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. Plant Physiology 80: 623-627

42. Esen A. (1987). A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (Zea mays L.). Journal of Cereal Science 5: 117-128
43. Faichney G.J. (1975). The use of markers in digestion studies: a review. In Digestion and Metabolism in the Ruminant (I. W. McDonald, A. A. I. Warner) University of New England Publishing Unit, Armidale, 277-291
44. Feller U. K., Soong T. S. T., Hageman R. H. (1977). Leaf proteolytic activities and senescence during grain development of field-grown corn (Zea mays L.). Plant Physiology 59: 290-294
45. Fellner V., Phillip L. E., Sebastian S., Idziak E. S. (2001). Effects of a bacterial inoculant and propionic acid on preservation of high-moisture ear corn, and on rumen fermentation, digestion and growth performance of beef cattle. Canadian Journal of Animal Science 81: 273-280
46. Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science 246: 64-71
47. 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
48. Ferraretto L. F., Taysom K., Taysom D. M., Shaver R. D., Hoffman P. C. (2014). Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. Journal of dairy science 97: 3221-3227
49. Ferraretto L. F., Crump P. M., Shaver R. D. (2015a). Effect of ensiling time and exogenous protease addition to whole-plant corn silage of various hybrids, maturities, and chop lengths on nitrogen fractions and ruminal in vitro starch digestibility. Journal of dairy science 98: 8869-8881
50. Ferraretto L.F., Shaver R.D., Massie S., Singo R., Taysom D.M., Brouillette J.P., (2015b). Effect of ensiling time and hybrid type on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch and neutral detergent fiber digestibility in whole-plant corn silage. The Professional Animal Scientist 31: 146–152
51. Ferreira G., Mertens D. R. (2005). Chemical and physical characteristics of corn silages and their effects on in vitro disappearance. Journal of dairy science 88: 4414-4425
52. Figeys D. (2005). Proteomics: the basic overview. U: Industrial proteomics: applications for biotechnology and pharmaceuticals (D Barth, V. Zambare, V. Azevedo, ured.) Wiley, New Jersey, 1-62

53. Filya I. (2003). The effect of Lactobacillus buchneri, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. Journal of Applied Microbiology 95: 1080-1086
54. 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 79: (E-Suppl), E218-E238
55. Fox G., Manley M. (2009). Hardness methods for testing maize kernels. Journal of agricultural and food chemistry 57: 5647-5657
56. Food and agriculture organization of the united nations statistics division (FAOSTAT; 2016). Production/crops/maize/world/2014. http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E (pristupljeno dana 07.01.2016)
57. Galić N., Cindrić M. (2008). Analiza proteina spektrometrijom masa. Kemija u industriji 57: 231-243
58. Galyean M. L., Wagner D. G., Owens F. N. (1981). Dry matter and starch disappearance of corn and sorghum as influenced by particle size and processing. Journal of Dairy Science 64: 1804-1812
59. Garratt R., Oliva G., Caracelli I., Leite A., Arruda P. (1993). Studies of the zein-like α-prolamins based on an analysis of amino acid sequences: Implications for their evolution and three-dimensional structure. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 15: 88-99
60. Giuberti G., Gallo A., Masoero F., Ferraretto L. F., Hoffman P. C., Shaver R. D. (2014). Factors affecting starch utilization in large animal food production system: a review. Starch/Stärke 66: 72-90
61. Goering H. K., Van Soest P. J. (1970) Forage Fibre Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). In: Agric. Handbook No. 379., USDA-ARS: Washington, DC
62. Gotlin J. (1967). Suvremena proizvodnja kukuruza. Agronomski glasnik. Zagreb
63. Graves P. R., Haystead T. A. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews 66: 39-63
64. Grbeša D. (2004) Metode procijene i tablice kemijskog sastava i hranjive vrijednosti krepkih krmiva. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb
65. Guo X. S., Ding W. R., Han J. G., Zhou, H. (2008). Characterization of protein fractions and amino acids in ensiled alfalfa treated with different chemical additives. Animal feed science and technology 142: 89-98

66. Guo X., Yuan L., Chen H., Sato S. J., Clemente T. E., Holding D. R. (2013). Nonredundant function of zeins and their correct stoichiometric ratio drive protein body formation in maize endosperm. Plant physiology 162: 1359-1369
67. Hamaker B. R., Kirleis A. W., Butler L. G., Axtell J. D., Mertz E. T. (1987). Improving the in vitro protein digestibility of sorghum with reducing agents. Proceedings of the National Academy of Sciences 84: 626-628
68. Hedqvist H., Udén P. (2006). Measurement of soluble protein degradation in the rumen. Animal Feed Science and Technology 126: 1-21
69. Henderson N. (1993). Silage additives. Animal Feed Science and Technology 45: 35-56
70. Hill J. E. (1989). U.S. Patent No. 4,842,871. U.S. Patent and Trademark Office. Washington
71. 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
72. Holding D. R., Larkins B. A. (2006). The development and importance of zein protein bodies in maize endosperm. Maydica 51: 243-254
73. Holding D. R., Otegui M. S., Li B., Meeley R. B., Dam T., Hunter B. G., Jung R., Larkins B. A. (2007). The maize floury1 gene encodes a novel endoplasmic reticulum protein involved in zein protein body formation. The Plant Cell 19: 2569-2582
74. Holding D. R., Larkins B. A. (2009). Zein storage proteins. U: Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement (A. L. Kriz, B. A. Larkins, ured.), Springer Berlin Heidelberg, 269-286
75. Horvatić A., Cindrić M. (2008) Analiza farmaceutskih peptida spektrometrijom masa. Medicina 45: 258-263
76. 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.
77. Huntington G. B. (1997). Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. Journal of animal science 75: 852-867
78. International Organization for Standardization (1998). ISO 15214:1998: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria -- Colony-count technique at 30 degrees C
79. International Organization for Standardization (2003). ISO 4833:2003: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms -- Colony-count technique at 30 degrees C

80. International Organization for Standardization (2008). ISO 21527-2:2008: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds -- Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95
81. Jensen C., Weisbjerg M. R., Nørgaard P., Hvelplund, T. (2005). Effect of maize silage maturity on site of starch and NDF digestion in lactating dairy cows. Animal feed science and technology 118: 279-294
82. Johnson L.M., Harrison J.H., Davidson D., Robutti J.L., Swift M., Mahanna W.C., Shinners K. (2002). Corn silage management I: effects of hybrid, maturity, and mechanical processing on chemical and physical characteristics. Journal of Dairy Science 85: 833-853
83. Kim C. S., Woo Y. M., Clore A. M., Burnett R. J., Carneiro N. P., Larkins B. A. (2002). Zein protein interactions, rather than the asymmetric distribution of zein mRNAs on endoplasmic reticulum membranes, influence protein body formation in maize endosperm. The Plant Cell 14: 655-672
84. Kirihara J. A., Petri J. B., Messing J. (1988). Isolation and sequence of a gene encoding a methionine-rich 10-kDa zein protein from maize. Gene 71: 359-370
85. Klose J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik 26: 211-243
86. Kljak K., Grbeša D., Aleuš D. (2011). Relationships between kernel physical properties and zein content in corn hybrids. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture, 68: 188-194
87. Kotarski S. F., Waniska R. D., Thurn, K. K. (1992). Starch hydrolysis by the ruminal microflora. The Journal of nutrition 122: 178-190
88. Krička T., Kiš D., Matin A., Brlek T., Bilandžija N. (2012). Tehnologija mlinarstva. Agronomski fakultet u Zagrebu, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek
89. Kriz, A. L. (2009). Enhancement of amino acid availability in corn grain. In Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement (A. L. Kriz, B. A. Larkins ured). Springer, Berlin Heidelberg, 79-89
90. 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
91. Kunji E. R., Mierau I., Hagting A., Poolman B., Konings W. N. (1996). The proteotytic systems of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70: 187-221

92. Landry J., Moureaux T. (1970). Heterogeneite des glutelines du grain de mais: extraction selective et composition en acides amines des trois fractions isolees. Soc Chim Biol Bull. 52: 1021-1037
93. Landry J., Delhaye S. (2007). Influence of genotype and texture on zein content in endosperm of maize grains. Annals of applied biology 151: 349-356
94. Larkins B. A., Wallace J. C., Galili G., Lending C. R., Kawata E. E. (1989). Structural analysis and modification of maize storage proteins. Dev. Ind. Microbiol 30: 203-209
95. Lawton J. W., Faubion J. M. (1989). Measuring kernel hardness using the tangential abrasive dehulling device. Cereal Chem 66: 519-524
96. Lawton J.W. (2002). Zein: A history of processing and use. Cereal Chem. 79:1-18
97. Lawton J. W., Wilson C. M. (2003). Proteins of the kernel. In: Corn: chemistry and technology (Ed. 2) (P. J. White, L. A. Johnson, ured.), American association of cereal chemists, St. Paul, Minnesota, SAD, 313-354
98. Li P. P., Hardacre A. K., Campanella O. H., Kirkpatrick K. J. (1996). Determination of endosperm characteristics of 38 corn hybrids using the Stenvert hardness test. Cereal chemistry 73: 466-471
99. Lindgren S. E., Axelsson L. T., McFeeters R. F. (1990). Anaerobic L-lactate degradation by Lactobacillus plantarum. FEMS Microbiology Letters 66: 209-213
100. Lopes M. A., Larkins B. A. (1991). Gamma-Zein Content is Ralated to Endosperm Modification in Quality Protein Maize. Crop Science 31: 1655-1662
101. 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
102. Madrid J., Martínez-Teruel A., Hernández F., Megías M. D. (1999) A comparative study on the determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods. Journal of the Science of Food and Agriculture 79: 1722-1726
103. Marvin L. F., Roberts M. A., Fay L. B. (2003). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. Clin. Chim. Acta. 337: 11-21
104. McAllister T. A., Phillippe R. C., Rode L. M., Cheng K. J. (1993). Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. Journal of animal science 71: 205-212
105. McAllister T. A., Cheng K. J. (1996). Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. Animal feed science and technology 62: 29-36
106. McDonald I. (1981). A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. The Journal of Agricultural Science 96: 251-252

107. McDonald P., Henderson N., Heron S. (1991). The Biochemistry of Silage. 2nd ed. Chalcombe, Marlow, UK.
108. McDougall E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochemical Journal *43:* 99-109
109. McKinney L.L. (1958) Zein. In: The encyclopedia of chemistry (G. L. Clark, ured.) Reinhold, N.Y., 319-320
110. McKnight D. R., Macleod G. K., Buchanan-Smith J. G., Mowat D. N. (1973). Utilization of ensiled or acid-treated high-moisture shelled corn by cattle. Canadian Journal of Animal Science 53: 491-496
111. Merck E. (1974). The Testing of Water, 9th ed. Darmstadt, Germany
112. Messman M. A., Weiss W. P. (1994). Use of electrophoresis to quantify ruminal degradability of protein from concentrate feeds. Animal feed science and technology 49: 25-35
113. Mestres C., Matencio F. (1996). Biochemical basis of kernel milling characteristics and endosperm vitreousness of maize. Journal of Cereal Science 24: 283-290
114. Milgen J. V., Baumont, R. (1995). Models based on variable fractional digestion rates to describe ruminal in situ digestion. British journal of nutrition 73: 793-807
115. Nakamura K., Okuya Y., Katahira M., Yoshida S., Wada S., Okuno M. (1992) Analysis of tubulin isoforms by two-dimensional gel electrophoresis using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in the first dimension. J Biochem. Biophys Methods 24: 195-203
116. Naverova I., Eyk J. E. (2005). Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. Journal of Chromatography B 815: 51-63
117. 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: (Suppl. 1):T94 (abst.)
118. Nishino N., Uchida S. (1999). Laboratory evaluation of previously fermented juice as a fermentation stimulant for lucerne silage. Journal of Science Food and Agriculture 79: 1285-1288
119. Ngonyamo-Majee D., Shaver R. D., Coors J. G., Sapienza D., Lauer J. G. (2008). Relationships between kernel vitreousness and dry matter degradability for diverse corn germplasm: II. Ruminal and post-ruminal degradabilities. Animal feed science and technology 142: 259-274
120. 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.

121. Nocek J. E. (1987). Characterization of in situ dry matter and nitrogen digestion of various corn grain forms. Journal of dairy science 70: 2291-2301
122. Nocek J. E. (1988). In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. Journal of Dairy Science 71: 2051-2069
123. Nozière P., Michalet-Doreau B. (1996). Validation of in sacco method: influence of sampling site, nylon bag or rumen contents, on fibrolytic activity of solid-associated microorganisms. Animal feed science and technology 57: 203-210
124. O'Farrell P. H. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. J. Biol. Chem 250: 4007-4021
125. Ohshima M., McDonald P. (1978). A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. Journal of the Science of Food and Agriculture 29: 497-505
126. Ørskov E. R., McDonald I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. The Journal of Agricultural Science 92: 499-503
127. Ørskov E. R. (1986). Starch digestion and utilization in ruminants. Journal of Animal Science 63: 1624-1633
128. Osborne T.B. (1897) Amount and properties of the proteins of the maize kernel. J. Amer. Chem. Soc. 19: 525-532.
129. Osborne T. B. (1908) Our present knowledge of plant proteins. Science 28: 417-427
130. Paiva E., Kriz A. L., Peixoto M. J. V. V. D., Wallace J. C., Larkins B. A. (1991) Quantitation and distribution of γ-zein in the endosperm of maize kernels. Cereal Chem. 68: 276-279
131. Paulis J. W., Wall J. S. (1971). Fractionation and properties of alkylated-reduced corn glutelin proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure 251: 57-69
132. Paulsen M. R., Watson S. A., Singh M., White P. J., Johnson L.A. (2003). Measurement and maintenance of corn quality. U: Corn: Chemistry and technology, (Ed. 2) (P. J. White, L. A. Johnson ured.) American association of cereal chemists, St. Paul, Minnesota, SAD,159-219
133. Peyrat J., Nozière P., Le Morvan A., Férard A., Protin P. V., Baumont R. (2014). Effects of ensiling maize and sample conditioning on in situ rumen degradation of dry matter, starch and fibre. Animal Feed Science and Technology 196: 12-21
134. 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

135. 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
136. Phillip L. E., Fellner V. (1992). Effects of bacterial inoculation of high-moisture ear corn on its aerobic stability, digestion, and utilization for growth by beef steers. Journal of Animal Science 70: 3178-3178
137. Pitt J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. Clin Biochem Rev 30: 19-34
138. Pomeranz Y., Czuchajowska Z., Martin C. R., Lai F. S. (1985). Determination of corn hardness by the Stenvert hardness tester. Cereal Chem 62: 108-112
139. Pratt R. C., Paulis J. W., Miller K., Nelsen T., Bietz J. A. (1995). Association of zein classes with maize kernel hardness. Cereal chemistry 72: 162-166
140. Prigge E. C., Johnson R. R., Owens F. N., Williams D. (1976). Soluble nitrogen and acid production of high moisture corn. Journal of Animal Science 42: 490-496
141. Rabilloud T., Lelong C. (2011). Two-dimensional gel electrphoresis in poteomics: a tutorial. Journal of proteomics 74: 1829-1841
142. Radosavljević M., Bekrić V., Božović I., Jakovljević J. (2000). Physical and chemical properties of various corn genotipes as a criterion of technological quality. Genetika 32: 319-329
143. San Emeterio F., Reis R. B., Campos W. E., Satter L. D. (2000). Effect of coarse or fine grinding on utilization of dry or ensiled corn by lactating dairy cows. Journal of dairy science 83: 2839-2848
144. Schmidt R. J., Burr F. A., Aukerman M. J., Burr B. (1990). Maize regulatory gene opaque-2 encodes a protein with a" leucine-zipper" motif that binds to zein DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences 87: 46-50
145. Seideler J., Zinn N., Boehm M. E., Wolf D. L. (2010). De novo sequencing of peptides by MS/MS. Proteomics 10: 634-649
146. Shi Y., Xiang R., Csaba H., Wilkins J. A. (2004). The role of liquid chromatography in proteomics. Journal of Chromatography A 1053: 27-36
147. Shukla R., Cheryan M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. Industrial crops and products 13: 171-192
148. Siddons R. C., Paradine J., Beever D. E., Cornell P. R. (1985). Ytterbium acetate as a particulate-phase digesta-flow marker. British Journal of Nutrition 54: 509-519
149. Singh J., Dartois A., Kaur L. (2010). Starch digestibility in food matrix: a review. Trends in Food Science & Technology 21: 168-180
150. Slottner D., Bertilsson J., (2006). Effect of ensiling technology on protein degradation during ensilage. Anim. Feed Sci. Technol. 127: 101-111

151. Sniffen C. J., O'connor J. D., Van Soest P. J., Fox D. G., Russell J. B. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. Journal of Animal science 70: 3562-3577
152. 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
153. Svečnjak Z., Varga B., Grbeša D., Štafa Z. and Uher D. (2007). Prinos i kvaliteta vlažnog zrna i klipa kukuruza u optimalnim i naknadnim rokovima sjetve. Mljekarstvo 57: 321-335
154. Szasz J. I., Hunt C. W., Szasz P. A., Weber R. A., Owens F. N., Kezar W., Turgeon, O. A. (2007). Influence of endosperm vitreousness and kernel moisture at harvest on site and extent of digestion of high-moisture corn by feedlot steers. Journal of animal science 85: 2214-2221
155. Tagliapietra F., Cattani M., Hindrichsen I. K., Hansen H. H., Colombini S., Bailoni L., Schiavon S. (2012). True dry matter digestibility of feeds evaluated in situ with different bags and in vitro using rumen fluid collected from intact donor cows. Animal production science 52: 338-346
156. Taylor C. C., Kung L. (2002). The effect of Lactobacillus buchneri 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. Journal of Dairy Science 85: 1526-1532
157. Tenaillon M. I., Charcosset A. (2011). A European perspective on maize history. Comptes rendus biologies 334: 221-228
158. Tilley J. M. A., Terry R. A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. Grass and forage science 18: 104-111
159. Tothi R., Lund P., Weisbjerg M. R., Hvelplund T. (2003). Effect of expander processing on fractional rate of maize and barley starch degradation in the rumen of dairy cows estimated using rumen evacuation and in situ techniques. Animal Feed Science and Technology 104: 71-94
160. Tsai C. Y., Huber D. M., Warren, H. L. (1978). Relationship of the kernel sink for N to maize productivity. Crop Science 18: 399-404
161. Tsai C. Y. (1980). Note on the effect of reducing agent on zein preparation. Cereal Chemistry 57: 288-290
162. Udén P., Colucci P. E., Van Soest P. J. (1980). Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. Journal of the Science of Food and Agriculture 31: 625-632
163. Van Soest P. J., Robertson J. B. (1985). Analysis of forages and fibrous foods. A Laboratory Manual for Animal Science, vol. 613. Cornell University. NY, 195-199

164. Vidaček Ž. , Sraka M. , Husnjak S. , Pospišil M. (1994). Lizimetrijsko mjerenje otjecanja vode iz tla u uvjetima agroekološke postaje Zagreb-Maksimir. Znanstveni skup "Poljoprivreda i gospodarenje vodama", Bizovačke Toplice, 17.-19. studenog 1994. godine, 223-232
165. Wallace J. C., Lopes M. A., Paiva E., Larkins B. A. (1990). New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of γ-zein in modified opaque-2 maize. Plant physiology 92: 191-196
166. Ward R. T. (2000). Fermentation analysis: use and interpretation. In: Tri-State Dairy Nutrition Conference, Fort Wayne, Indiana, USA, 117-135
167. Wee Y. J., Kim J. N., Ryu, H. W. (2006). Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. Food Technology and Biotechnology 44: 163-172
168. 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
169. Weinberg Z. G. (2003). Effect of Lactic acid bacteria on animal performance. Indian Journal of Biotechnology 2: 378-381
170. Whittenbury R. (1962). An investigation of the lactic acid bacteria. Doctoral dissertation, University of Edinburgh
171. Winters A. L., Cockburn J. E., Dhanoa M.S., Merry R.J. (2000). Effects of lactic acid bacteria in inoculants on changes in aminoacid composition during ensilage of sterile and non-sterile ryegrass. J. Appl. Microbiol. 8: 442-551
172. Woo Y. M., Hu D. W. N., Larkins B. A., Jung R. (2001). Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. The Plant Cell 13: 2297-2317
173. Wu Y. V. (1992). Corn hardness as related to yield and particle size of fractions from micro hammer-cutter mill. Cereal Chem 69: 343-347
174. Wu Z., Massingill L. J., Walgenbach R. P., Satter L. D. (2001). Cracked dry or finely ground high moisture shelled corn as a supplement for grazing cows. Journal of dairy science 84: 2227-2230
175. Wu Y., Goettel W., Messing J. (2009). Non-Mendelian regulation and allelic variation of methionine-rich delta-zein genes in maize. Theoretical and applied genetics 119: 721-731
176. Wu Y., Holding D. R., Messing, J. (2010). γ-Zeins are essential for endosperm modification in quality protein maize. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 12810-12815
177. Wu Y., Messing J. (2010). RNA interference-mediated change in protein body morphology and seed opacity through loss of different zein proteins. Plant physiology, 153: 337-347

178. Yates J.R., Ruse C.I., Nakorchevsky A. (2009). Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. Annu. Rev. Biomed. Eng. 11: 49-79
179. Young T. E., Gallie D. R. (2000). Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. Plant molecular biology 42: 397-414
180. Yousif N. E., El Tinay A. H. (2000). Effect of fermentation on protein fractions and in vitro protein digestibility of maize. Food Chemistry 70: 181-184

ŽIVOTOPIS

Marija Duvnjak rođena je 07. prosinca 1983. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku gimnaziju (5. gimnazija). Diplomirala je 2009. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, studij: Biotehnologija, smjer: Biokemijsko-mikrobiološki s diplomskim radom *Priprava kvaternih soli n-etilmorfolina* pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Furač. Drugi smjer: Biokemijsko inženjerstvo na studiju Biotehnologija Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu završila je 2012. godine s temom *Predviđanje specifičnosti izbora supstrata domena za adenilaciju* pod mentorom doc. dr. sc. Antonia Starčevića.

Sredinom 2010. godine zapošljava se kao asistent na Zavodu za hranidbu životinja Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u timu prof. dr. sc. Darka Grbeše. Sljedeće godine upisuje doktorski studij Poljoprivredne znanosti pod mentorstvom prof. dr. sc. Darka Grbeše. U sklopu radnog mjesta asistenta sudjeluje u izvedbi nastavnog programa modula na dodiplomskom i diplomskom studiju Agronomskog fakulteta: Hranidba životinja, Opća hranidba životinja, Kemija i kontrola hrane za životinje, Hrana za životinje te Hranidba preživača. Član je Hrvatskog mikrobiološkog društva te dva odbora u Hrvatskom zavodu za norme: HZN/TO34/ PO 17, Poljoprivredni i prehrambeni proizvodi; Sustavi upravljanja za sigurnost hrane i HZN/TO569, Hrana za životinje. U sklopu ERASMUS programa boravila je 2013. godine pet mjeseci na Scotland's Rural College, Edinburgh Campus. Koautor je jednog znanstvenog rada A1 kategorije, dvaju znanstvenih radova A2 kategorije, jednog rada A3 kategorije te više znanstvenih radova prezentiranih na međunarodnim kongresima u obliku oralne prezentacije ili postera.

Radovi A1 kategorije:

Duvnjak M., Kljak K., Grbeša D. (2016). Effect of inoculant and storage time on whole plant protein fractions and grain total zein content in corn silage. Journal of Animal and Feed Sciences

Radovi A2 kategorije:

Grbeša D., Duvnjak M., Kljak K. (2014). Ublažavanje pojave mikotoksina u krmi i njihovih učinaka na životinje. Krmiva 56: 15-32

Zadravec M., Duvnjak M., Pleadin J., Kljak K., Jaki Tkalec V., Majnarić D., Mitak M. (2013). Kakvoća kukuruzne silaže s obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava Koprivničko-križevačke županije tijekom 2012. godine. Veterinarska stanica 44: 187-193

Radovi A3 kategorije:

Kljak K., Grbeša D., Janječić Z., Bedeković D., Duvnjak M., Kiš G. (2011): Utjecaj oblika škroba i proteina zrna kukuruza na proizvodna svojstva nesilica. Zbornik IX. Savjetovanja "Peraradski dani 2011" s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik, 11. – 14. svibnja 2011.: 164-170

Radovi predstavljeni na kongresima:

Duvnjak M., Kiš G., Kljak K., Grbeša D. (2015). The influence of lactic acid bacteria additive on the level of residual water-soluble carbohydrates in corn silage. 6th Congres of European Microbiologists, 7-11.06.2015, Maastricht Nizozemska

Duvnjak M., Butorac A., Perica K., Cindrić M., Bačun-Družina V., Grbeša D. (2015). The effect of lactic acid bacteria additive on gamma zeins content in high moisture corn silages. Book of Abstracts „Hot Topics in Microbiology 2015.“, Conference for Young Scientists, 23th-26th April 2015., Štrbske Pieso: 13

Grbeša D., Kljak K., Pleadin J., Zadravec M., Duvnjak M. (2013). Mjere za ublažavanje pojave aflatoksina u mlijeku. 9. Međunarodna konferencija „Kompetentnost laboratorija 2013“, Opatija, 06. – 09. 11. 2013.

Duvnjak M., Škvorc S., Kljak K., Grbeša D. (2013). Utjecaj dodatka inokulanta na frakcije proteina kukuruzne silaže u uvjetima induciranog kvarenja. Zbornik sažetaka - 48. Hrvatski i 8. Međunarodni simpozij agronoma Dubrovnik, 17. – 22. 02. 2013.: 271-272