

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Aleksandra GOLOB (ARTIČEK)

**PRIMERJAVA *IN VITRO* FERMENTACIJE VOLUMINOZNE
KRME IN MOČNIH KRMIL V VSEBINI SLEPEGA ČREVEESA
KUNCEV IN VAMPA OVC**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF *IN VITRO* GAS FERMENTATION OF FORAGES
AND CONCENTRATES IN CAECUM CONTENT OF RABBITS AND
RUMEN FLUID OF SHEEP**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je konec univerzitetnega študija kmetijstvo - zootehnika. Naloga je bila opravljena na Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Andreja Lavrenčiča.

Recenzent: prof. dr. Janez Salobir

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Ivan ŠTUHEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Član: prof. dr. Andrej LAVRENČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Član: prof. dr. Janez SALOBIR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Aleksandra Golob

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 636.084/.087(043.2)=163.6
KG živinoreja/ovce/kunci/prehrana živali/*in vitro* fermentacija/hlapne maščobne kisline/slepo črevo/vamp
KK AGRIS L51
AV GOLOB, Aleksandra
SA LAVRENČIČ, Andrej (mentor)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Zootehniko
LI 2010
IN PRIMERJAVA *IN VITRO* FERMENTACIJE VOLUMINOZNE KRME IN MOČNIH KRMIL V VSEBINI SLEPEGA ČREVESA KUNCEV IN VAMPA OVC
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 64 str., 11 pregl., 3 sl., 55 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V nalogi smo proučevali razlike v kazalnikih *in vitro* produkcije plina ter razlike v produkciji hlapnih maščobnih kislin (HMK) pri inkubaciji osmih različnih krmil (dehidrirana lucerna, peletirano seno, pšenični otrobi, ječmen, koruza, pesni rezanci, sončnične tropine in sojine tropine) v inokulumih, pripravljenih iz vampovega soka ovc (VS) in iz vsebine slepega črevesa kuncev (SČ). S pomočjo Gompertzovega modela smo ocenili: skupno potencialno produkcijo plina (B), največjo hitrost fermentacije (MFR), čas, ko je bila hitrost fermentacije največja (TMFR), in produkcijo plina po 8 h inkubacije (GAS₈). V inokulumih smo po osmih urah inkubacije določili tudi vsebnosti nastalih hlapnih maščobnih kislin. Vrednosti B in MFR so bile pri vseh krmilih statistično značilno večje, če so bila le ta inkubirana v VS (B: od 180 ml/g SS pri sončničnih tropinah do 404 ml/g SS pri koruzi; MFR: od 6,9 ml/h pri peletiranem senu do 29,1 ml/h pri pesnih rezancih) kot pri inkubaciji v SČ (B: od 83 ml/g SS pri peletiranem senu do 317 ml/g SS pri koruzi; MFR: od 2,5 ml/h pri peletiranem senu do 23 ml/h pri koruzi). TMFR je bil za vsa krmila statistično značilno daljši pri inkubaciji krmil v SČ (od 9,5 ure pri pšeničnih otrobih in pesnih rezancih do 18,4 ure pri peletiranem senu) kot pri njihovi inkubaciji v VS (od 3,1 ure pri sojinih tropinah do 8,8 ur pri peletiranem senu). Produkcija HMK je bila statistično značilno večja, če so bila krmila inkubirana v VS (od 1,83 mmol/g SS pri peletiranem senu do 6,75 mmol/g SS pri sončničnih tropinah) kot v SČ (od 0,8 mmol/g SS pri peletiranem senu do 4,0 mmol/g SS pri pesnih rezancih). Deleža nastale očetne in maslene kisline sta bila za večino krmil statistično značilno večja pri inkubaciji v SČ kot pri inkubaciji v VS, medtem ko je bil delež propionske kisline statistično značilno večji pri inkubaciji v VS. Razlike v fermentaciji krmil med inokulumoma, pripravljenima iz vsebine SČ in VS, so najverjetneje posledica razlik v aktivnosti in vrsti mikroorganizmov v prebavilih, oz. delih prebavil teh dveh živalskih vrst.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 636.084/.087(043.2)=163.6
CX animal husbandry/sheep/rabbits/animal nutrition/ *in vitro* fermentation/volatile fatty acids/caecum/rumen
CC AGRIS L51
AU GOLOB, Aleksandra
AA LAVRENČIČ, Andrej (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of animal science
PY 2010
TI COMPARISON OF *IN VITRO* GAS FERMENTATION OF FORAGES AND CONCENTRATES IN CAECUM CONTENT OF RABBITS AND RUMEN FLUID OF SHEEP
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 64 p., 11 tab., 3 fig., 55 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the study we compared *in vitro* gas productions and volatile fatty acids (HMK) productions of eight different substrates (dehydrated alfalfa, pelleted hay, wheat bran, maize and barley grain, sugarbeet pulp, sunflower and soybean meals) in inoculums prepared from the rabbit caecum contents (CC) and in inoculums prepared from the sheep rumen fluid (RF). The total potential gas production (B), maximum fermentation rate (MFR), time of maximum fermentation rates (TMFR) and gas production in 8 h of incubation (GAS₈) were estimated with the Gompertz model. After eight hours of incubation, short chain fatty acids (SCFA) were measured in inoculums. Parameters B and MFR for substrates incubated in RF were always significantly higher than those incubated in CC (B: from 180 ml/g SS for sunflower meal to 404 ml/g SS for maize grain; MFR: from 6.9 ml/h for pelleted hay to 29.1 ml/h for sugarbeet pulp). TMFR's for all substrates incubated in CC (from 9.5 h for wheat bran and sugarbeet pulp to 18.4 h for pelleted hay) were significantly longer than those incubated in RF (from 3.1 h for soybean meal to 8.8 h for pelleted hay). SCFA production was higher when feeds were incubated in RF (from 1.83 mmol/g SS for pelleted hay to 6.75 mmol/g SS for sunflower meal) than in CC (from 0.8 mmol/g SS for pelleted hay to 4.0 mmol/g SS for sugarbeet pulp). The ratios of acetic and butyric acid were significantly higher when substrates were incubated in CC than those incubated in RF while the ratio of propionic acid was significantly higher when substrates were incubated in RF. Differences in fermentation patterns between substrates incubated in the inoculums prepared from CC and RF are probably linked to the differences in microbial activity and species in gastrointestinal tract and/or part of gastro intestinal tract in the studied animal species.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KRMA IN HRANLJIVE SNOVI	3
2.1.1 Osnovne skupine hranljivih snovi	3
2.1.1.1 Ogljikovi hidrati	3
2.1.1.2 Lignin	5
2.1.1.3 Beljakovine	5
2.1.1.4 Surove maščobe	6
2.1.2 Delitev krmil	8
2.1.2.1 Voluminozna krma	8
2.1.2.2 Energijska krmila	8
2.1.2.3 Beljakovinska krmila	8
2.2 ZNAČILNOSTI FERMENTACIJE (RAZGRADNJE) HRANLJIVIH SNOVI V PREDŽELODCIH PREŽVEKOVALCEV	9
2.2.1 Značilnosti prebavnega sistema prežvekovalcev	9
2.2.2 Vampovi mikroorganizmi	10
2.2.3 Razgradnja hranljivih snovi	12
2.2.3.1 Ogljikovi hidrati	12
2.2.3.2 Beljakovine	14
2.2.3.3 Maščobe	14
2.2.4 Sinteza hlapnih maščobnih kislin in razmerja med njimi	15
2.2.5 Plini nastali ob fermentaciji	17

2.3	ZNAČILNOSTI FERMENTACIJE (RAZGRADNJE) HRANLJIVIH SNOVI V SLEPEM ČREVESU	18
2.3.1	Značilnosti prebavil kuncev	18
2.3.2	Mikroorganizmi v slepem in debelem črevesu kuncev	19
2.3.3	Razgradnja hranljivih snovi.....	20
2.3.3.1	Ogljikovi hidrati	21
2.3.3.2	Beljakovine	22
2.3.3.3	Maščobe	22
2.3.4	Sinteza hlapnih maščobnih kislin in razmerja med njimi	23
2.3.5	Plini nastali ob fermentaciji hranljivih snovi v slepem črevesu kuncev.....	23
2.4	VPLIV PREHRANE NA AKTIVNOST MIKROORGANIZMOV V SLEPEM ČREVESU KUNCEV IN PREDŽELODCIH PREŽVEKOVALCEV	24
2.4.1	Vlaknina	24
2.4.2	Škrob.....	26
2.4.3	Beljakovine.....	27
2.4.4	Maščobe.....	28
2.5	POMEN HLAJNIH MAŠČOBNIH KISLIN	29
3	MATERIAL IN METODE.....	32
3.1	SUBSTRATI	32
3.2	<i>IN VITRO</i> FERMENTACIJA.....	32
3.2.1	Priprava vampovega soka.....	33
3.2.2	Priprava inokuluma iz vsebineslepega črevesa kuncev	33
3.2.3	Izvedba <i>in vitro</i> fermentacije	33
3.3	ANALIZA HLAJNIH MAŠČOBNIH KISLIN.....	35
3.3.1	Potek eterske ekstrakcije hlapnih maščobnih kislin (HMK).....	35
3.3.2	Analitska oprema in pogoji analize	36
3.4	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	37
3.4.1	Kazalniki poteka fermentacije	37
3.4.2	Statistični model	38
4	REZULTATI	39

4.1	REZULTATI ANALIZE VARIANCE KAZALNIKOV IN POTEKA FERMENTACIJE TER HlapNIH MAŠČOBNIH KISLIN	39
4.2	KAZALNIKI IN POTEKA FERMENTACIJE	40
4.2.1	Vpliv vrste inokuluma in substrata na ocenjene kazalnike <i>in vitro</i> fermentacije	40
4.2.1.1	Skupna potencialna produkcija plina	41
4.2.1.2	Specifična hitrost fermentacije.....	42
4.2.1.3	Faktor mikrobne (ne)učinkovitosti.....	42
4.2.2	Vpliv živalske vrste na izračunane parametre <i>in vitro</i> fermentacije.....	42
4.2.2.1	Zakasnitev začetka fermentacije (LAG)	43
4.2.2.2	Največja hitrost fermentacije (MFR)	43
4.2.2.3	Čas, ko je hitrost fermentacije največja (TMFR).....	44
4.2.2.4	Količina nastalega plina v osmih urah inkubacije (GAS ₈).....	44
4.3	HLAPNE MAŠČOBNE KISLINE	44
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	48
5.1	RAZPRAVA	48
5.1.1	Razlike v <i>in vitro</i> fermentaciji hranljivih snovi med prežvekovalci in kunci	48
5.1.2	Vpliv vrste inokuluma na <i>in vitro</i> fermentacijo.....	49
5.2	SKLEPI	53
6	POVZETEK.....	55
7	VIRI.....	58
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Predstavniki vampovih bakterij, njihov vir energije in tipični produkti <i>in vitro</i> fermentacije (McDonald in sod., 2002)	11
Preglednica 2: Kemijska sestava uporabljenih substratov (g/kg SS vzorca).....	32
Preglednica 3: Sestava puferskih raztopin A, B in C	34
Preglednica 4: Sestava resazurina, redukcijske raztopine in končnega pufru	34
Preglednica 5: Sestava standardne raztopine HMK	36
Preglednica 6: Temperaturni pogoji in pretok plinov za plinsko kromatografijo	37
Preglednica 7: Rezultati analize variance za ocenjene in izračunane kazalnike fermentacije	39
Preglednica 8: Rezultati analize variance za količino nastalih hlapnih maščobnih kislin.....	40
Preglednica 9: Ocenjeni kazalniki fermentacije (B, C in A) različnih substratov.....	41
Preglednica 10: Izračunani kazalniki <i>in vitro</i> produkcije plina (LAG, MFR, TMFR in GAS ₈) različnih substratov	43
Preglednica 11: Skupna količina nastalih hlapnih maščobnih kislin in deleži očetne, propionske in maslene kisline	45

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema razgradnje ogljikovih hidratov v predželodcih do piruvata (McDonald sod., 2002).....	13
Slika 2: Presnova piruvata v mikroorganizmih (McDonald in sod., 2002).....	16
Slika 3: Učinek razgradljivih beljakovin na fermentacijo v predželodcih (Chikunya in sod., 1996).....	52

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

SV	surova vlaknina
SB	surove beljakovine
SS	suha snov
VS	inokulum pripravljen iz vampovega soka ovnov
SČ	inokulum pripravljen iz vsebine slepega črevesa kuncev
HMK	hlapne maščobne kisline
B	skupna potencialna produkcija plina
C	specifična hitrost fermentacije
A	konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti
MFR	največja hitrost fermentacije
TMFR	čas, ko je bila hitrost fermentacije največja
LAG	časovni zaostanek na začetku fermentacije
GAS ₈	količina nastalega plina po osmih urah inkubacije
PIPRV	počasi in izjemoma popolnoma razgradljiva vlaknina
HPRV	hitro in popolnoma razgradljiva vlaknina
NVOH	nevlaknati ogljikovi hidrati

1 UVOD

Rastline so nosilke primarne produkcije na Zemlji. Energijo sončnega sevanja so sposobne uporabiti za fiksacijo anorganskih snovi (CO_2 in H_2O) v organske snovi, predvsem v ogljikove hidrate. Neprežvekovalski rastlinojedi, posebej pa še prežvekovalci, imajo prebavni sistem prilagojen na velik vnos z vlakninami bogate rastlinske krme, ki so jo s pomočjo mikroorganizmov sposobni razgraditi in uporabiti za sintezo sebi lastnih snovi.

Na dogajanja v predželodcih prežvekovalcev lahko gledamo kot na dinamične procese različnih mikroorganizmov, ki so med seboj v številnih interakcijah. Pogoste so mutualistične interakcije, ne smemo pa pozabiti na kompeticijo, ki je eden izmed mehanizmov preprečevanja prevlade posameznih skupin mikroorganizmov. Stabilnost mikrobne združbe predželodcev je torej odvisna od vnosa ustrezne krme, ki mikroorganizmom predstavlja substrat za razgradnjo, iz katerega pridobijo hranljive snovi in energijo za rast in razmnoževanje. Pri neprežvekovalskih rastlinojedih se anatomija prebavil precej razlikuje od prebavil prežvekovalcev in sta mikrobni razgradnji namenjena zgolj slepo črevo in kolon, kar pomeni, da se veliko hranljivih snovi prebavi že v predhodnih delih prebavil. Za mikrobno fermentacijo so torej dostopne le določene počasi in težko razgradljive sestavine krme.

Poznavanje razlik v procesu prebave in fermentacije hranljivih snovi v prebavilih gospodarsko pomembnih rastlinojedov je zelo pomembno, saj fermentacija vpliva na produkcijske lastnosti in zdravje živali, nenazadnje pa je vedno bolj aktualen tudi vpliv na okolje (produkcija metana, izločanje dušika...). Pri prežvekovalcih je ta proces že zelo dobro raziskan, medtem ko je pri neprežvekovalskih rastlinojedih še veliko neznanega. Velikokrat se predpostavlja, da je mikrobna sestava vsebine predželodcev enaka mikrobni sestavi vsebine slepega črevesa, kar bi pomenilo tudi podoben potek in učinkovitost fermentacije v omenjenih delih prebavila. To ni nujno res, zato smo s to nalogo skušali preveriti podobnost/različnost poteka fermentacije različnih krmil v predželodcih in slepem črevesu. Presnovki, nastali pri fermentaciji, so pri prežvekovalcih in neprežvekovalcih zelo pomembni z vidika oskrbe z energijo, pri neprežvekovalcih pa so učinki tudi zdravstvene narave, saj je maslena kislina znana po njenem antikancerogenem delovanju v debelem črevesu.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kakšne so razlike v kazalnikih *in vitro* fermentacije pri inkubaciji različnih krmil v vampovem soku ovc (*Ovis aries*) in slepem črevesu kuncev (*Oryctolagus cuniculus*). Krmila, ki smo jih uporabili, se med seboj razlikujejo po kemijski sestavi in jih uvrščamo med energijska (zrnje koruze, pšenice in ječmena ter pesni rezanci), voluminozna (peletirano seno in dehidrirana lucerna) in beljakovinska krmila (sončnične in sojine tropine). Želeli smo ugotoviti tudi, kakšne so razlike v produkciji hlapnih maščobnih kislin med obema vrstama živali, če fermentiramo zgoraj naštete substrate. Predvidevamo, da se bodo kazalniki fermentacije hranljivih snovi med živalskima vrstama razlikovali, pri čemer predvidevamo, da bodo ogljikovi hidrati fermentirali v večjem obsegu in hitreje v vampovem soku ovnov, kot v vsebini slepega črevesa kuncev. Prav tako predvidevamo, da bo produkcija hlapnih maščobnih kislin v vampovem soku večja, kot v vsebini slepega črevesa.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KRMA IN HRANLJIVE SNOVI

Krma je splošen izraz za material, ki ga žival zaužije. Sestavine krme so bolj ali manj prebavljive. Sestavine krme, ki se v prebavilih uspejo prebaviti, se absorbirati v krvni obtok osebka in izkoristiti v njegovi presnovi, imenujemo hranljive snovi ali nutrienti.

2.1.1 Osnovne skupine hranljivih snovi

Glavne skupine hranljivih snovi organskega izvora so ogljikovi hidrati, beljakovine, maščobe, lignin, nukleinske kisline in vitamini. Rudninske snovi, kot prav tako zelo pomembna skupina hranljivih snovi, pa so anorganskega izvora.

2.1.1.1 Ogljikovi hidrati

Splošno so ogljikovi hidrati kemijske spojine, katerih osnovni elementi so ogljik, vodik in kisik. Nekateri lahko vsebujejo tudi fosfor, dušik in žveplo. Skupine ogljikovih hidratov vsebujejo polihidroksi aldehide, ketone, alkohole, kisline, njihove enostavne derivate in vse skupine, ki se v njih lahko hidrolizirajo. V grobem ogljikove hidrate razdelimo na monosaharide, oligosaharide, polisaharide ter kompleksne ogljikove hidrate (McDonald in sod., 2002).

MONOSAHARIDI

Monosaharide razdelimo, glede na število ogljikovih atomov, ki jih vsebujejo, na trioze, tetraze, pentoze, heksoze in heptoze. Njihova struktura je navadno ciklična, le redko se pojavljajo ravne verige. Monosaharidi zaradi aldehydne in ketonske skupine delujejo kot reducirajoče substance in se lahko kemijsko ali encimatsko reducirajo do alkoholov. Trioze in tetraze so pomembni vmesni presnovni produkti, nimajo pa posebne strukturne funkcije, medtem ko se pentoze in heksoze povezujejo v različne disaharide, oligosaharide in polisaharide. Pomembni sladkorji iz skupine pentoz so L-arabinoza in D-ksiloza, ki sta komponenti hemiceluloze, in D-riboza, ki je sestavni del molekule RNA. Najpomembnejši naravni heksozi sta glukoza in fruktoza, medtem ko se manoza in galaktoza pojavljata v polimerizirani obliki, kot manan oziroma galaktan. D-glukoza je osnovni gradnik

oligosaharidov, polisaharidov in glikozidov, kot prosto pa jo najdemo v rastlinah, sadju, krvi, medu, limfi, cerebrospinalni tekočini... D-fruktoza se pojavlja prosto v zelenih listih, sadežih in medu. Tvori disaharid saharozo in fruktane (McDonald in sod., 2002).

DISAHARIDI

Najpomembnejši disaharidi so saharoza, maltoza, laktoza in celobioza. Saharoza je sestavljena iz molekule α -D-glukoze in molekule β -D-fruktoze. Je najbolj razširjen disaharid v rastlinah. Hidroliza saharoze poteka encimsko. Laktoza ali mlečni sladkor je proizvod mlečne žleze pri sesalcih. Sestavljata jo po ena molekula β -D-glukoze in β -D-galaktoze, ki sta povezani z β -(1,4) glikozidno vezjo. Laktozo lahko fermentirajo številni mikroorganizmi. Maltozo gradita dve molekuli α -D-glukoze, povezani z α -(1,4) glikozidno vezjo. Nastaja pri hidrolizi škroba. Celobioza v naravi ne obstaja kot prosti sladkor, najdemo pa jo kot osnovno ponavljajočo se enoto v celulozi. Gradita jo dve molekuli β -D-glukoze, povezani z β -(1,4) glikozidno vezjo. Te vezi prebavni encimi sesalcev ne morejo razgraditi (McDonald in sod., 2002).

POLISAHARIDI

Polisaharide delimo na homoglikane in heteroglikane. Homoglikani so sestavljeni iz velikega števila pentoznih ali heksoznih ostankov. Najpomembnejše skupine homoglikanov so arabinani, ksilani, glukani (škrob, glikogen in celuloza), fruktani, galaktani in manani (McDonald in sod., 2002).

Škrob je glukan, ki je v številnih rastlinah prisoten kot rezervna snov. Najpogosteje se nalaga v semena, plodove, gomolje in korenine. Najdemo ga v obliki amiloze in amilopektina. Amiloza je linearna veriga D-glukoznih ostankov, povezanih z α -(1,4) glikozidno vezjo. Amilopektin ima razvejano strukturo. Glukozni ostanki so povezani linearno z α -(1,4) glikozidno vezjo, stranske verige pa z α -(1,6) glikozidno vezjo. V molekuli škroba je navadno od 70 do 80 % amilopektina in od 20 do 30 % amiloze (McDonald in sod., 2002).

Glavna sestavina rastlinske celične stene je polisaharid celuloza. Sestavljena je iz glukoznih enot, ki so povezane v linearno molekulo z β -(1,4) glikozidno vezjo. Osnovne

verige so povezane v osnovno vlakno, osnovna vlakna pa v mikrovlakna, ki so sestavni del celuloznega vlakna (McNeil in sod., 1984).

Med heteroglikane uvrščamo pektine, hemiceluloze, hialuronsko kislino... Najpogostejše hemiceluloze so heteroksilani, heteroglukani, ksiloglukani, arabinoglukani. Hemiceluloze so v glavnem sestavljene iz D-glukoze, D-galaktoze, D-manoze, D-ksiloze in/ali D-arabinoze, ki so povezane med seboj z različnimi glikozidnimi vezmi. Njihova struktura je pogosto razvejana (McDonald in sod., 2002).

Na trdnost in elastičnost primarne celične stene močno vplivajo pektinske snovi. Njihova sestava je odvisna od rastlinske vrste, starosti rastline in vrste rastlinskega tkiva. Najpogostejše so pektinske snovi, sestavljene iz linearne verige D-galakturonske kisline, ki so povezane z α -(1,4) glikozidno vezjo, med katere je vrinjena L-ramnoza. Druga gradnika pektinskih snovi sta še L-arabinoza in D-ksiloza, ki sta najpogostejša v stranskih verigah, vezana na ramnozo. Pektinske snovi v določenih pogojih želirajo (McDonald in sod., 2002).

2.1.1.2 Lignin

Lignin daje biološko odpornost celični steni rastlin ter zagotavlja mehansko trdnost rastlini. Pod tem imenom se ne skriva enotna, dobro definirana snov, ampak gre za cel spekter tesno povezanih fenolnih spojin. Lignin je polimer, ki ga sestavljajo v kompleksno mrežo povezani derivati fenilpropana (p-kumarna kislina, ferulna kislina in sinapilna kislina). Med polisaharidi celične stene in ligninom obstajajo številne vezi, ki so odporne na mehansko (mikro)biološko in kemijsko prebavo. Krmila, ki vsebujejo veliko lignina so zrela mrva, slama in les (McDonald in sod., 2002).

2.1.1.3 Beljakovine

Beljakovine so organske snovi, ki poleg ogljika, vodika in kisika, vsebujejo še dušik in nekatere tudi žveplo. Beljakovine najdemo v vseh živih celicah, kjer so povezane z vsemi fazami celične, tkivne in presnovne aktivnosti, imajo pa tudi pomembne strukturne funkcije (McDonald in sod., 2002).

Osnovni gradniki beljakovin so aminokisljine, ki so povezane med seboj s peptidno vezjo. Tej linearni verigi nanizanih aminokisljin pravimo primarna struktura beljakovine. Linearna veriga obstaja v obliki α -heliksa ali β -ravnine, čemur pravimo sekundarna beljakovinska struktura. S terciarno strukturo označujemo tridimenzionalno strukturo beljakovin, ki odloča o fiziološki aktivnosti posamezne beljakovine. Kvartarno zgradbo zavzamejo beljakovine, ki vsebujejo več kot eno polipeptidno verigo. Takšen agregat stabilizirajo vodikove in elektrostatične vezi ter hidrofobne povezave (McDonald in sod., 2002).

Topnost beljakovin v vodi je zelo različna. Lahko so popolnoma netopne ali pa povsem topne. Beljakovine imajo na svojih terminalnih delih amino in karboksilno skupino, zato delujejo kot pufri. Beljakovine ob visoki temperaturi, ob visoki koncentraciji soli, v prisotnosti kislin in težkih kovin denaturirajo. Denaturacija je lahko povratna ali nepovratna (McDonald in sod., 2002).

Beljakovine delimo na enostavne, sestavljene le iz aminokisljin, in na sestavljene, ki poleg aminokisljin vsebujejo tudi neproteinski del. Med enostavne beljakovine uvrščamo fibrilarne beljakovine (kolagen, elastin, keratin), ki imajo v glavnem strukturno funkcijo. Te beljakovine so netopne in zelo odporne na živalske prebavne encime. Sestavljene so iz dolgih filamentov, ki so med seboj prečno povezani. Druga skupina enostavnih beljakovin so globularne beljakovine. Zanje je značilno, da je polipeptidna veriga zvita v kompaktno strukturo. V tej skupini so encimi, beljakovinski hormoni in antigeni. V skupino sestavljenih beljakovin uvrščamo glikoproteine, lipoproteine in kromoproteine (McDonald in sod., 2002).

2.1.1.4 Surove maščobe

Surove maščobe so skupina v vodi netopnih snovi. Topne so v organskih topilih, kot so benzen, eter in kloroform. V to skupino spadajo večinoma lipidi, ki imajo v celicah številne pomembne funkcije. Lipidi delujejo kot prenašalci elektronov, prenašalci substratov v encimskih reakcijah, nastopajo kot gradniki celičnih membran in igrajo pomembno vlogo kot vir in zaloga energije. Lipide delimo na enostavne, na sestavljene (glikolipidi, fosfolipidi) in na lipide, ki nimajo glicinske osnove (sfingomielin, voski, steroidi, terpeni...) (McDonald in sod., 2002).

Enostavni lipidi ali maščobe so estri glicerola in maščobnih kislin. Maščobe se med seboj razlikujejo po maščobnih kislinah, ki so lahko nasičene ali nenasičene, razlikujejo pa se tudi po številu ogljikovih atomov. Sesalci določenih večkrat nenasičenih maščobnih kislin ne morejo sintetizirati sami, ampak jih morajo pridobiti s krmo, zato so zanje esencialne. Takšne so na primer linolna kislina, linolenska kislina in arahidonska kislina. Hidroliza maščob poteka z lipolitičnimi encimi, ki razcepijo vez med glicerolom in maščobno kislino (McDonald in sod., 2002).

Glikolipidi imajo dve alkoholni skupini glicerola zaestreni z maščobnima kislinama, preostalo pa z sladkornim ostankom. Lipidi trav in detelj, so večinoma galaktolipidi, kjer je na glicerol zaestrena galaktoza (McDonald in sod., 2002).

Fosfolipidi so gradniki kompleksnih bioloških membran. Najpogostejši so fosfogliceridi, ki imajo dve alkoholni skupini glicerola zaestreni z maščobnima kislinama, tretjo pa s fosfatom. Fosfatna skupina je še dodatno zaestrena z nekaterimi alkoholi, najpogosteje s serinom, holinom (lecitin), inositolom in etanolaminom (cefalin). Med fosfolipide spadajo tudi sfingolipidi, ki imajo namesto glicerola sfingosin. Najpogostejši je sfingomielin, ki je glavni gradnik mielinske ovojnice aksonov živčnih celic (McDonald in sod., 2002).

Voski so sestavljeni iz maščobnih kislin z zelo dolgo verigo C atomov in monohidroksi alkoholov večje molekulske mase. Naravni voski so navadno mešanica številnih takšnih estrov. Voski so zelo razširjeni, saj imajo pri rastlinah in živalih, navadno obrambno funkcijo. Hidrofobna narava voskov pri rastlinah zmanjša izgubo vode, pri živalih pa zagotavlja vodoodpornost volne in perja. Pri rastlinah so voski navadno vključeni v kutikularne tvorbe, kjer tvorijo matriks, kamor sta vgrajena kutin in suberin (McDonald in sod., 2002).

Steroidi so spolni hormoni, adrenalni hormoni, žolčne kisline in steroli. Med sterole uvrščamo holesterol, 7-dehidroholesterol in ergosterol (McDonald in sod., 2002).

Terpeni so zgrajeni iz različnega števila izoprenskih enot, ki so povezane v verigo ali ciklično strukturo. Terpeni imajo močan vonj in okus in so pogosta sestavina eteričnih olj. Pomembnejši terpeni so tudi fitolni del molekule klorofila, karotenoidi, rastlinski hormoni (giberelinska kislina) in vitamini A, E in K (McDonald in sod., 2002).

2.1.2 Delitev krmil

Krmo in krmila lahko, glede na različne fizikalne, kemične in druge lastnosti, delimo na najrazličnejše načine (Žgajnar, 1990). Glede na vsebnost hranljivih snovi jih delimo na voluminozno krmo in močna krmila. Slednja lahko nadalje razdelimo na energijska in beljakovinska krmila. Delitev je osnovana na kemični sestavi krmil, ki jo določimo s kemijsko analizo.

2.1.2.1 Voluminozna krma

Voluminozno krmo opredeljuje vsebnost surove vlaknine (SV), ki mora znašati več kot 180 g/kg suhe snovi (SS) in imeti ustrezno strukturo. Vlaknine so skupina hranljivih snovi rastlinskega izvora, ki so glavni gradniki rastlinske celične stene in jih živali s svojimi encimi ne morejo prebaviti. Glavni gradniki rastlinske celične stene so celuloza, hemiceluloze, pektini ter lignin. Med voluminozno krmo uvrščamo zeleno krmo (pridelki s travnikov, pašnikov, njiv, paša), mrvo, silaže in slamo (Žgajnar, 1990).

2.1.2.2 Energijska krmila

Pogoj, da je neko krmilo klasificirano kot energijsko je, da je vsebnost surove vlaknine (SV) manjša od 180 g/kg SS, vsebnost surovih beljakovin (SB) pa manjša kot 200 g/kg SS. Takšna krmila vsebujejo veliko količino škroba in/ali disahridov ter lipidov. Med energijska krmila uvrščamo zrna žit, stranske proizvode mlinarske industrije, pulpe sladkorne pese, melase, gomoljevke, korenovke, maščobe rastlinskega in živalskega izvora in druge (Žgajnar, 1990).

2.1.2.3 Beljakovinska krmila

Za beljakovinska krmila velja, da delež surove vlaknine (SV) ne presega 180 g/kg SS, delež surovih beljakovin pa je večji od 200 g/kg SS. Med beljakovinska krmila prištevamo stranske proizvode oljne industrije (sončnične, sojine, bučne, lanene in druge pogače ter tropine), stranske proizvode mlinarske industrije (gluten), semena metuljnic, krmila živalskega izvora (ribja moka, krvna moka, kostna moka), stranske proizvode industrije alkoholnih pijač (pivske tropine, pivski kvas, posušen izrabljen hmelj...), mlečne izdelke ipd.

2.2 ZNAČILNOSTI FERMENTACIJE (RAZGRADNJE) HRANLJIVIH SNOVI V PREDŽELODCIH PREŽVEKOVALCEV

Hrana različnih rastlinojedov je sestavljena v glavnem iz počasi in nepopolno razgradljivih polisaharidov (celuloza, ksilani...), povezanih z β -glikozidno vezjo, ki jih živali s svojimi encimi ne morejo razgraditi in prebaviti. Pri prežvekovalcih se je v ta namen razvil morfološko in fiziološko prilagojen prebavni sistem, ki vključuje mikrobo fermentacijo (McDonald in sod., 2002).

2.2.1 Značilnosti prebavnega sistema prežvekovalcev

Prebavilo prežvekovalcev ima predželodce (vamp, kapico in prebiralnik) ter pravi želodec, oz. siriščnik. Pri odrasli ovci vamp in kapica predstavljata 85% prostornine predželodcev in siriščnika. Vanj pride krma namočena s slino, ki je ovce izločijo okrog 10 l/dan. Velika prostornina vampa omogoča akumulacijo hrane, kar zagotavlja zadosten čas za razgradnjo celuloze. Vsebina se v vampu kontinuirano meša zaradi ritmičnega krčenja stene vampa, kar omogoča večjo izpostavljenost krme mikroorganizmom. Med prežvekovanjem se del krme vrača v usta, kjer jo žival dobro prežveči (do 50 žvekalnih gibov na prežvek), preden jo spet pogoltne. Glavni dejavnik, ki stimulira prežvekovanje je taktilna stimulacija epitela sprednjega dela vampa. Vendar pa nekatere vrste krme, posebej tiste, ki vsebujejo zelo malo vlaknin, ne zagotavljajo zadostne stimulacije za prežvekovanje, zato lahko le ta tudi izostane (McDonald in sod., 2002).

V vampu in kapici so stalno naseljene bakterije, glive in praživali. Ti organizmi fermentirajo hrano do hlapnih maščobnih kislin, ki se absorbirajo skozi steno vampa, in plinov (večinoma metan in ogljikov dioksid), ki se izločajo z izrigavanjem. Nerazgrajeni delci krme in celice mikroorganizmov nadaljujejo pot skozi prebiralnik in siriščnik do tankega črevesa, kjer je glavno mesto lastne encimske prebave. Nastali produkti prebave se nato absorbirajo. Razgradnja s pomočjo mikroorganizmov poteka ponovno v debelem črevesu. Tam nastale hlapne maščobne kisline se absorbirajo skozi steno debelega črevesa, nerazgrajeni deli krme in celice mikroorganizmov pa se izločijo z blatom (McDonald in sod., 2002).

Za vampove mikroorganizme je zelo pomembno bolj ali manj konstantno okolje, ki jim omogoča nemoteno delovanje. V procesu fermentacije nastajajo kisline, ki bi teoretično lahko znižale pH v vampu na 2,5 do 3, vendar ob normalnih pogojih slina, ki deluje kot pufer, vzdržuje pH okrog 6. Poleg tega v predželodcih poteka stalna absorbcija hlapnih maščobnih kislin skozi njihove stene, kar še dodatno pomaga stabilizirati pH v njih. Stalen je tudi osmotski pritisk, ki je podoben osmotskemu pritisku krvi, vzdržuje pa se s pretokom ionov med krvjo in vampom. Okolje v vampu je anoksično. Manjša količina kisika, ki pride v predželodce s krmo, se zelo hitro porabi, tako da v njih ni kisika. Temperatura v predželodcih je bolj ali manj konstantna in je podobna telesni temperaturi živali (McDonald in sod., 2002).

2.2.2 Vampovi mikroorganizmi

Floro in favno predželodcev sestavljajo številni organizmi (arheje, bakterije, glive in praživali), ki so med seboj povezani v prehranske spletke.

Število bakterij v predželodcih znaša od 10^9 do 10^{10} celic na mililiter vampove vsebine. Do zdaj je bilo identificiranih že preko 200 vrst, večina pa je anaerobnih, ki ne tvorijo spor. Najpogostejši predstavniki vampovih bakterij so prikazani v preglednici 1. Število in relativni delež posamezne vrste bakterij sta precej odvisna od krme, ki jo je žival zaužila. obroki bogati s škrobom, na primer, spodbujajo rast in delitev mlečnokislinskih bakterij (McDonald in sod., 2002).

Najpomembnejše fibrolitične bakterije v vampu so bakterije vrst *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* in rodova *Butyrivibrio* ter *Prevotella* (preglednica 1).

Pomembna skupina bakterij, ki jo najdemo v prebavnem traktu mnogih živali, je skupina acetogenih bakterij, ki iz H_2 in CO_2 tvorijo acetat. Raziskave so pokazale, da so acetogene bakterije dokaj razširjene pri jagnjetih, vse dokler se ne ustali populacija metanogenih arhej (Rieu-Lesme in sod., 1996).

Preglednica 1: Predstavniki vampovih bakterij, njihov vir energije in tipični produkti *in vitro* fermentacije (McDonald in sod., 2002)

Vrsta	Tipičen vir energije	Tipičen produkt fermentacije						Alternativni vir energije
		Acetat	Propionat	Butirat	Laktat	Sukcinat	Format	
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Celuloza	+				+	+	Glukoza (škrob)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Celuloza	+			+	+	+	Ksilan
<i>Ruminococcus albus</i>	Celobioza	+					+	Ksilan
<i>Streptococcus bovis</i>	Škrob				+			Glukoza
<i>Prevotella ruminicola</i>	Glukoza	+				+	+	Ksilan, škrob
<i>Megasphaera elsdenii</i>	Laktat	+	+	+				Glukoza, glicerol
<i>Lachnospira multipara</i>	Pektini	+			+			Glukoza, fruktoza

Pomembni predstavniki prokariontov v predželodcih so tudi metanogeni mikroorganizmi, ki spadajo v kraljestvo *Archaea*. V predželodcih najdemo njihove anaerobne predstavnike, ki iz H₂ in CO₂ tvorijo metan. Tipični predstavniki vampovih metanogenih mikroorganizmov so *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanococcus jannaschii* in *Methanosarcina barkeri* (Madigan in sod., 2003).

Veliko manj je v predželodcih praživali (10⁶ na ml vampove vsebine), vendar so predstavniki te skupine večji, zato so po skupni masi enakovredni bakterijam. Pri odrasli živali najdemo predvsem predstavnike dveh družin iz skupine ciliatov. Najbolj pogosta rodova skupine *Holotricha* sta *Isotricha* in *Dasytricha*. Gre za organizme ovoidne do okrogle oblike, ki imajo telo enakomerno pokrito z migetalkami. Druga je družina *Oligotricha*, ki vsebuje številne, po velikosti in obliki zelo variabilne vrste. Zanje je značilno, da lahko prebavljajo delce hrane, ne morejo pa razgraditi celuloze. Najpogostejši rodovi so *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium* in *Ophryoscolex* (McDonald in sod., 2002).

Glive, ki se nahajajo v predželodcih, so striktno anaerobni organizmi. Njihov razvojni cikel je iz dveh faz: mobilna faza (zoospore) in vegetativna faza (sporangiji). V vegetativni fazi se z rizomi pritrdijo na delce hrane in lahko vanje tudi prodrejo. Zato imajo pomembno vlogo pri razbitju in rahljanju celičnih sten, kar olajša naselitev in fermentacijo bakterijam. Vampove glive so sposobne razgraditi večino polisaharidov in veliko topnih sladkorjev. Sladkorji, ki jih glive ne razgrajujejo so pektini, arabinoza, fruktoza, manoza in galaktoza. Prispevek gliv pri fermentaciji hranljivih snovi še ni bil točno določen, znano pa je, da jih je največ pri krmil bogati z vlaknino (McDonald in sod., 2002). Fonty in sod. (1999) so dokazali pomembno vlogo glive *Neocallimastix frontalis* pri rahljanju sestavin celične stene rastlin. Glive razgrajujejo lignificirana rastlinska tkiva in so sposobne razgraditi do 34 % lignina v rastlinskem tkivu (Krause in sod., 2003). V vampu je bilo odkritih vsaj dvanajst vrst gliv, ki večinoma pripadajo rodu *Neocallimastix* (McDonald in sod., 2002).

2.2.3 Razgradnja hranljivih snovi

Na sposobnost vampovih mikroorganizmov za razgradnjo hranljivih snovi vplivajo razmere v vampu. Russell (1998) je opazil, da že majhen padec pH negativno vpliva na razgradnjo celuloze v vampu, pH pod 5,7 pa njeno fermentacijo močno omeji. Vse to nakazuje na slabo prilagoditev celulolitičnih bakterij na nizek pH v predželodcih. Nasprotno pa so nekatere bakterije, ki razgrajujejo škrob, aktivne tudi pri nižji pH vrednosti v predželodcih.

2.2.3.1 Ogljikovi hidrati

Obroki prežvekovalcev vsebuje velik delež celuloze, hemiceluloz, škroba in pektinov. Razgradnja teh polisaharidov je zagotovo najpomembnejši prebavni proces, ki poteka v predželodcih. Vse ogljikove hidrate razgrajujejo vampovi mikroorganizmi. Najpogostejše so bakterijske vrste *Fibrobacter succinogenus* in vrste rodu *Ruminococcus*, pomembno vlogo pa imajo pri tem tudi glive. Razgradnja poteka v dveh stopnjah. V prvi se kompleksni ogljikovi hidrati razgradijo do enostavnih sladkorjev, v drugi pa ti fermentirajo do hlapnih maščobnih kislin (McDonald in sod., 2002).

Razgradnja celuloze poteka s pomočjo encima endo- β -1,4-D-glukan hidrolaza, ki deluje na amorfnih regijah celuloznega vlakna. To naredi kristalinične regije celuloze dostopne

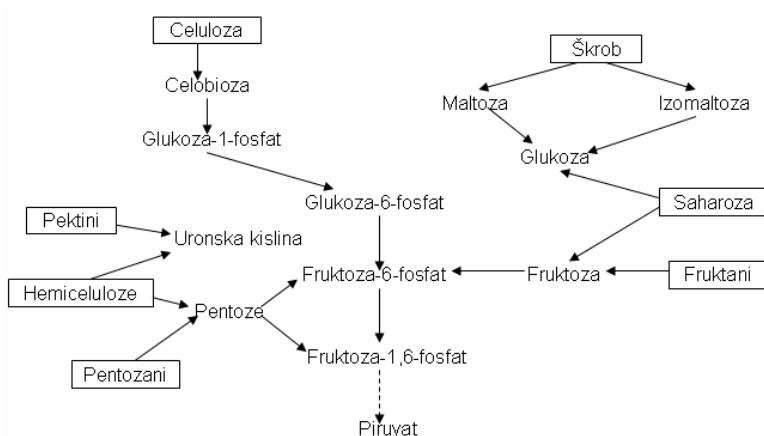
celobioanhidrazam (spada med eksonukleaze), ki odcepljajo dimere celobioze. Iz celobioze nastane glukoza s pomočjo encima β -glukozidaza, s pomočjo encima fosforilaze, pa nastane glukoza-1-fosfat, ki vstopa v proces glikolize (Krause in sod., 2003).

Pri razgradnji hemiceluloz so glavni produkti pentoze, ki nastanejo z delovanjem encimov na β -1,4 vez. Nastanejo ksiloza in uronske kisline, ki se kasneje pretvorijo v ksilozo (McDonald in sod., 2002).

Škrob razgradijo amilaze najprej na maltozo in izomaltozo, nato pa z encimi maltazo, maltoze fosforilazo ali 1,6-glukozidazo do glukoze ali glukoze-1-fosfat (McDonald in sod., 2002).

Pektini se najprej razgradijo na pektinsko kislino in manitol s pomočjo pektinesteraz. Poligalakturonaze nato pektinsko kislino pretvorijo v galakturonsko kislino, nato pa v ksilozo (McDonald in sod., 2002).

Sladkorje, ki nastanejo v prvi stopnji razgradnje, vstopijo v intracelularno presnovo mikroorganizmov, kjer po različnih poteh in na različnih stopnjah vstopajo v proces glikolize, pri čemer nastane piruvat (slika 1).



Slika 1: Shema razgradnje ogljikovih hidratov v predželodcih do piruvata (McDonald sod., 2002)

2.2.3.2 Beljakovine

Beljakovine iz krme v vampovi mikroorganizmi hidrolizirajo do peptidov in aminokislin. Nekatere aminokisliline se nadalje razgradijo na organske kisline, amoniak in ogljikov dioksid. Manjši del beljakovin krme pa lahko nerazgrajen pride do siriščnika in tankega črevesa (McDonald in sod., 2002).

Glavni proteolitični organizmi v vampu so *Prevotella ruminicola*, skupina *Peptostreptococci* in protozoi. Vampovi mikroorganizmi nastale proste aminokisliline, krajše peptide in amoniak uporabijo za sintezo lastnih beljakovin. Nekaj teh mikrobnih beljakovin se, ob njihovem odmrtnju, v predželodcih ponovno razgradi in tako prispevajo k recikliranju dušika (postane spet dostopen za mikrobo sintezo). Mikroorganizmi iz predželodcev pridejo v siriščnik in naprej v tanko črevo, kjer se njihove celične beljakovine prebavijo in absorbirajo skozi steno črevesa. Bakterijske beljakovine omogočajo gostitelju od krme dokaj neodvisno oskrbo z beljakovinami in esencijskimi aminokislinami (McDonald in sod., 2002).

Ključni vmesni produkt mikrobne razgradnje in sinteze beljakovin v predželodcih je amoniak. Če krma vsebuje malo beljakovin, oziroma so le te zaščitene pred razgradnjo v predželodcih, je koncentracija amoniaka v predželodcih majhna, kar upočasni rast in razmnoževanje mikrobov, posledica pa je zavrnjena razgradnja ogljikovih hidratov. V nasprotnem primeru, ko je razgradnja beljakovin obsežnejša kot sinteza, se amoniak v predželodcih akumulira. Ob tem se presežek amoniaka absorbira skozi steno predželodcev v kri, ki amoniak prenese v jetra, kjer se pretvori v sečnino, ki se izloči iz organizma s sečem. Nekaj sečnine se vrne v predželodce s slino, nekaj pa tudi neposredno preko stene vampa (McDonald in sod., 2002).

2.2.3.3 Maščobe

Krma prežvekovalcev vsebuje triacilgliceride, ki imajo visok delež večkrat nenasičenih maščobnih kislin z 18 C atomi (linolna in linolenska kislina). Triacilgliceride in fosfolipide lipaze vampovih mikroorganizmov hidrolizirajo na glicerol in proste maščobne kisline. Nenasičene maščobne kisline bakterije hidrogenirajo do stearinske kisline. Linolna in linolenska kislina imata *cis* konfiguracijo dvojnih vezi, pri hidrogenizaciji pa so

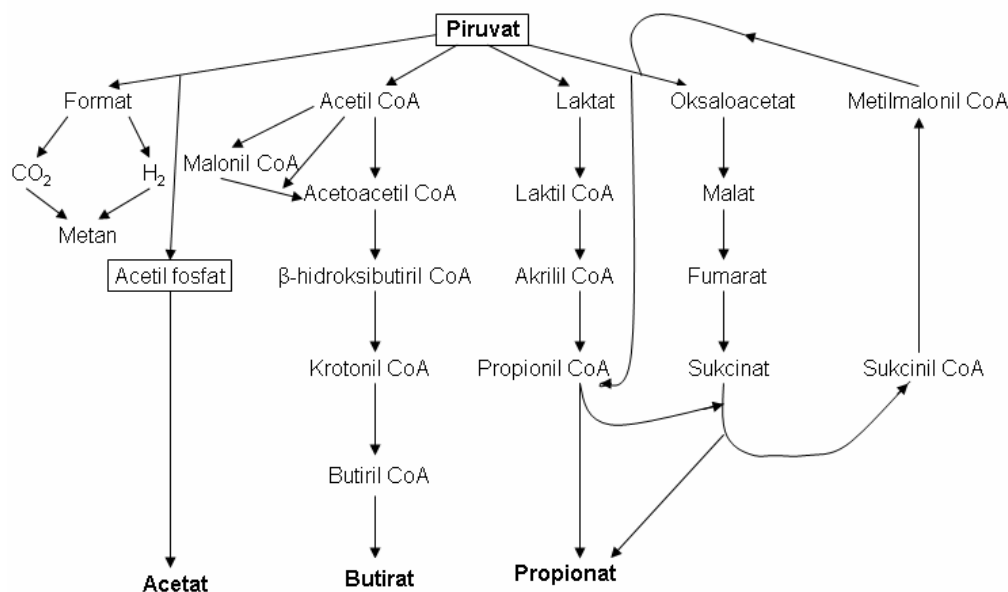
spremenjene v *trans* konfiguracijo, tako da v vsebini vampa lahko določimo tudi veliko *trans* maščobnih kislin, predvsem vakcenske kisline. Vampovi mikroorganizmi lahko tudi sintetizirajo določene maščobne kisline, ki imajo pogosto razvejano verigo. Te maščobne kisline najdemo tudi v mleku ali telesnih maščobah prežvekovalcev (McDonald in sod., 2002).

Pri neprežvekovalcih lahko na sestavo telesnih maščob vplivamo z maščobnimi kislinami v krmi (obroku). Pri prežvekovalcih pa temu ni tako, saj maščobne kisline mikroorganizmi, večinoma že v predželodcih, hidrogenirajo do stearinske kisline in v tej obliki pridejo do tankega črevesa, kjer se absorbirajo v organizem (McDonald in sod., 2002).

2.2.4 Sinteza hlapnih maščobnih kislin in razmerja med njimi

Piruvat je glavni vmesni produkt iz katerega nastanejo končni produkti fermentacije v predželodcih, tj. hlapne maščobne kisline (HMK) in plini. Najpomembnejše hlapne maščobne kisline so očetna, propionska in maslena kislina. V manjši količini nastajajo tudi druge kratkoverižne kisline, kot so isobutirat, 2-metil butirat in 3-metil butirat, ki so produkti deaminacije različnih aminokislin (McDonald in sod., 2002).

Očetna kislina nastane iz piruvata preko vmesnega produkta acetil fosfata. Nastanek propionske kisline je vezan na dve različni presnovni poti. Pot preko mlečne kisline prevladuje takrat, ko obrok živali vsebuje veliko močnih krmil, bogatih s škrobom, pot preko sukcinata pa, ko je v obroku veliko vlaknine (slika 2). Pri obrokih z veliko količino močnih krmil, pogosto pride do kopičenja mlečne kisline v predželodcih, kar živalim povzroča acidozo predželodcev. Nastanek maslene kisline iz piruvata poteka preko acetil koencim A in drugih vmesnih presnovnih produktov (slika 2) (McDonald in sod., 2002).



Slika 2: Presnova piruvata v mikroorganizmih (McDonald in sod., 2002)

Koncentracija HMK, nastalih pri fermentaciji hranljivih snovi, je odvisna od prehrane živali in od časa ki preteče do naslednjega krmljenja. Vsebnost HMK je pri ovcah od 70 do 115 mmol/l (McDonald in sod., 2002).

Teoretično izračunana molarna razmerja očetne, propionske in maslene kisline znašajo: 65% očetne, 20% propionske in 15% maslene kisline (Wolin, 1960). Za izračun teoretičnih razmerij je Wolin (1960) uporablil nekaj poenostavitev, saj ni upošteval drugih produktov fermentacije (npr.: etanola, mlečne kisline, sukcinata, formata...), ki jih je v predželodcih navadno zelo malo in so le vmesni produkti pri nastanku končnih produktov fermentacije. Poleg tega naj bi produkti fermentacije nastali izključno iz ogljikovih hidratov z empirično formulo $C_6H_{12}O_6$, čemur ustreza večina polisaharidov v krmi in krmilih za prežvekovalce, vendar pa obstajajo izjeme, kot so amino sladkorji, uronske kisline, deoksi sladkorji, ki jih je v krmi prežvekovalce relativno malo. V krmi za prežvekovalce se nahajajo tudi beljakovine in maščobe, iz katerih lahko nastajajo HMK.

Razmerja med HMK, ki so bila izmerjena v vampnem soku, se spreminjajo glede na vrsto krme, ki so jo živali zaužile. Kljub temu pa so ta razmerja v glavnem zelo podobna tistim, ki jih je ugotovil Wolin (1960). Večino HMK se absorbira skozi steno predželodcev, kljub temu pa jih od 10 do 20 % preide skozi siriščnik in se absorbirajo v tankem črevesu. Nekaj

produktov razgradnje ogljikovih hidratov (posamezne sladkorje) porabijo tudi mikroorganizmi, za izgradnjo lastnih polisaharidov (McDonald in sod., 2002).

2.2.5 Plini nastali ob fermentaciji

Količina pri fermentaciji nastalega plina je sorazmerna s količino razgrajenega oz. fermentiranega substrata. Manj plina nastane pri večji konverziji razgrajene krme v mikrobnno biomaso (Blümmel in sod., 2005). Pri fermentaciji nastane okrog 40 % ogljikovega dioksida, od 30 do 40 % metana, 5 % vodika in nekaj kisika ter dušika. Večina plina nastane pri fermentaciji ogljikovih hidratov, medtem ko ga pri fermentaciji beljakovin nastane le tretjina tiste količine nastale pri fermentaciji ogljikovih hidratov. Prispevek maščob k produkciji plina je zanemarljiv (Getachew in sod., 1998).

Ogljikov dioksid nastaja delno kot spremljevalni produkt fermentacije, delno pa v reakciji očetne in maslene kisline z bikarbonatom iz sline (Getachew in sod., 1998).

Metan nastaja v procesu metanogeneze, in sicer z redukcijo ogljikovega dioksida z vodikom, ki nastane ob fermentaciji hranljivih snovi. Metan nastaja tudi iz očetne in maslene kisline, ne pa tudi iz propionske kisline. Metanogeneze so sposobne metanogene bakterije, ki delujejo v striktno anaerobnem okolju. Terminalni akceptor elektronov v dihalni verigi pri procesu metanogeneze v predželodcih ni kisik, temveč ogljik (najpogosteje ogljikov dioksid). Produkcija metana je razmeroma velika (na 100 g prebavljenih ogljikovih hidratov nastane 4,5 g metana). Ogljikov dioksid in metan izhajata iz predželodcev z izrigavanjem, pri čemer se izgubi kar 7 % energije iz krme. Ker predstavlja nastanek metana izgubo energije za vampove mikroorganizme in izgubo ogljika iz krme, in ker je metan toplogredni plin (prežvekovalci naj bi prispevali kar 15 % metana v atmosfero), bi redukcija metanogeneze prispevala k boljši konverziji krme in zmanjšala sproščanje metana v atmosfero (Blümmel in sod., 2005). Izgubo energije in ogljika bi lahko zmanjšale acetogene bakterije. Te vodik in ogljikov dioksid uporabijo za sintezo očetne kisline, ki bi jo živali lahko uporabile v svoji presnovi. Raziskave so pokazale veliko gostoto teh bakterij pri novorojenih jagnjetih, preden se uveljavijo metanogene bakterije (Rieu-Lesme in sod., 1996).

2.3 ZNAČILNOSTI FERMENTACIJE (RAZGRADNJE) HRANLJIVIH SNOVI V SLEPEM ČREVESU

Za razliko od rastlinojedih živali s predželodci (pregastrični fermentorji) pa imajo drugi rastlinojedi (postgastrični fermentorji) razvite za fermentacijo hranljivih snovi druge dele prebavila. Pri teh živalih je v ta namen razvito predvsem debelo črevo. Sposobnost za fermentacijo hranljivih snovi v tem delu prebavnega trakta je odvisna od njegove relativne prostornine, saj le ta določa čas zadrževanja krme in s tem obseg fermentacije (McDonald in sod., 2002). Aktivnost mikroflore debelega črevesa je odvisna od interakcij med mikroorganizmi. Interakcije so lahko sinergistične ali antagonistične, vplivajo lahko tako na velikost populacije posamezne vrste (skupine), kot na presnovno aktivnost posameznih skupin. Na izražanje interakcij med mikroorganizmi lahko vplivata tako gostitelj (s svojim imunskim sistemom, starostjo, stresom), kot prehrana gostitelja (Williams in sod., 2001). Substrat, ki pride v debelo črevo, se razlikuje od tistega, ki pride v predželodce, saj pride v tankem črevesu že do absorpcije prebavljenih hranljivih snovi, v debelem črevesu, pa so prisotne tudi številne endogene snovi, kot so mukopolisaharidi in encimi (McDonald in sod., 2002).

V osnovni je fermentacija v debelem črevesu enaka fermentaciji v predželodcih. Tudi v debelem črevesu v procesu mikrobne fermentacije nastajajo HMK, ki se absorbirajo skozi steno debelega črevesa, ter plini, večinoma vodik, metan in ogljikov dioksid. V debelem črevesu se pojavljajo, poleg najpogostejših HMK, tudi mravljična, valerianska in kaprojska kislina ter kisline z razvejano verigo, kot so isomaslena in isovalerianska. Delež slednjih je majhen, prisotnost pa je predvsem rezultat fermentacije beljakovin, ki se niso prebavili v tankem črevesu (Williams in sod., 2001).

2.3.1 Značilnosti prebavil kuncev

Kunce uvrščamo med rastlinojede živali z enostavnim želodcem, ki imajo zaradi tega zelo specifične potrebe po hranljivih snoveh. Zaradi neustrezne oskrbe s hranljivimi snovmi, imajo pogosto prebavne motnje, predvsem drisko, katere končna posledica je pogin. Neuravnotežena oskrba mikroorganizmov slepega črevesa in kolona s hranljivimi snovmi se kaže tudi na moteni mikrobni aktivnosti v tem delu prebavil (Gidenne, 1997).

Slepo črevo, ki predstavlja okoli 40 % prostornine prebavnega trakta kuncev, je pomemben organ za prebavo hranljivih snovi. Kunci tvorijo dve vrsti izločkov: mehko blato (cekotrofi), ki ga žival ponovno zaužije in trdo blato. Cekotrofi so majhne kroglice, ki se v debelem črevesu obdajo z mukoznim ovojem in jih žival izloči skozi zadnjik. Ko cekotrof doseže zadnjik, ga kunec poje in vsebina je znova izpostavljena prebavi. V času, ko cekotrofija ne poteka, skozi črevo neovirano potujejo veliki delci (velikosti nad 300 μm), medtem ko majhni delci ostajajo v slepem črevesu za mikrobnno razgradnjo in fermentacijo. Med cekotrofijo pa gre skozi črevo delno razgrajena vsebina slepega črevesa, iz katere se tvori mehko blato. Prehod skozi slepo črevo ni odvisen samo od aktivnosti mikroorganizmov v slepem črevesu, ampak tudi od aktivnosti mikroorganizmov v teščem črevesu in proksimalnem delu debelega črevesa, ki vsi skupaj tvorijo funkcionalno enoto (Gidenne, 1997).

Zelo pomemben je zadrževalni čas snovi v določenem delu prebavnega trakta. Gidenne in sod. (2002) navajajo, da je povprečno trajanje prehoda trdega dela vsebine prebavil skozi celoten prebavni trakt kuncev okoli 15,5 ur, pri tem pa se vsaj dve tretjini tega časa (okrog 10 h) delci zadržujejo v slepem črevesu in kolonu. Zadrževalni čas tekoče vsebine prebavil je veliko daljši (povprečno 48 h), in se prav tako najdlje časa zadržuje v slepem črevesu in kolonu (povprečno 39 h). Tako dolgo zadrževanje tekoče vsebine prebavil je posledica retrogradnega transporta tekočine iz proksimalnega dela debelega črevesa nazaj v slepo črevo (Gidenne in Bellier, 2000).

2.3.2 Mikroorganizmi v slepem in debelem črevesu kuncev

Združba mikroorganizmov v slepem črevesu in kolonu se nekoliko razlikuje od združbe v predželodcih, vendar med njima ni večji razlik v osnovnih mikrobioloških aktivnostih. Bakterijska združba vsebine slepega črevesa se s starostjo številčno povečuje. Slepo črevo odraslega kunca naseljuje od 10^9 do 10^{10} anaerobnih mikroorganizmov na gram vsebine (Padilha in sod., 1995). Različni avtorji navajajo različne prevladujoče vrste bakterij. Guet in Fonty (1979, cit. po Bennegadi in sod., 2003) navajata, da prevladujejo bakterije iz rodu *Bacteroides*, pogosti pa so tudi producenti maslene kisline, npr. rod *Butyrivibrio*. Nasprotno so Bennegadi in sod. (2003) ugotovili, da prevladujejo skupine bakterij *Flexibacter*, *Cytophaga* in *Bacteriodes*. Dokazali so tudi prisotnost naslednjih

celulolitičnih organizmov: *Fibrobacter succinogenes*, *Fibrobacter intestinalis*, *Ruminococcus flavefaciens* in *Ruminococcus albus*. Delež celulolitičnih bakterij od celotne populacije mikroorganizmov je bil okrog 5 %, takšen delež pa so opazili tudi pri drugih živalskih vrstah. Med prevladujočimi bakterijami v slepem črevesu kuncev je tudi *Prevotella ruminicola* (Boulahrouf in sod., 1991, cit. po Bennegadi in sod., 2003).

V slepem črevesu kuncev so tudi metanogeni mikroorganizmi (Piattoni in sod., 1996; Bennegadi in sod., 2003). Gre za striktno anaerobne arheje, katerih številčnost narašča s starostjo kuncev. Piattoni in sod. (1996) poročajo, da je pred odstavitvijo več reduktivnih acetogenih bakterij kot metanogenih, po odstavitvi pa začnejo prevladovati metanogeni mikroorganizmi.

Delež eukariontov (praživali in gliv) je v slepem črevesu kunca majhen. Bennegadi in sod. (2003) so z določanjem eukarionske rRNA določili, da je njihov delež manjši kot 7 %.

Za stabilnost mikrobne flore je bistvenega pomena vsebnost vlaknine v krmi (Bennegadi in sod., 2003).

2.3.3 Razgradnja hranljivih snovi

Tanko črevo je glavno mesto prebave beljakovin, maščob in nestrukturiranih ogljikovih hidratov. Razgradnja vlaknine pa je vezana v glavnem na slepo črevo in kolon.

Razgradnja hranilnih snovi (vlaknine) v slepem črevesu in kolonu je manj učinkovita kot njihova razgradnja v predželodcih, saj je zadrževalni čas substrata v slepem črevesu in kolonu relativno kratek, poleg tega pa se številni produkti, predvsem beljakovine in vitamini, v debelem črevesu ne absorbirajo in jih zato žival ne more izkoristiti. Različni avtorji navajajo, da so v slepem črevesu kuncev prisotne celulolitična (Padilha in sod., 1995; Marounek in sod., 1995; Gidenne in sod., 2002; Lavrenčič, 2007a) pektinolitična (Marounek in sod., 1995; Gidenne in sod., 2002; Lavrenčič, 2007a, b) ksilanolitična (Marounek in sod., 1995; Gidenne in sod., 2002; Garcia in sod., 2002; Lavrenčič, 2007a) ureolitična (Emaldi in sod., 1979, cit. po Gidenne, 1997; Crociani in sod., 1984, cit. po Gidenne, 1997; Forythe in Parker, 1987, cit. po Gidenne, 1997) proteolitična (Makkar in Singh, 1987; Marounek in sod., 2000) in amilolitična (Padilha in sod., 1995) mikrobna

aktivnost. Primerjave fermentacijske aktivnosti v predželodcih in slepem črevesu kunca so pokazale, da je fibrolitična aktivnost mikroorganizmov slepega črevesa manjša, amilolitična in proteolitična pa večja (Makkar in Singh, 1987). Marounek in sod. (1995) so podrobneje opisali fibrolitično aktivnost mikroorganizmov slepega črevesa kuncev. Ugotovili so veliko pektinolitično aktivnost, sledi ksilanolitična, najmanjša pa je bila celulolitična aktivnost. Prav tako so odkrili veliko pektinolitično aktivnost v želodcu kuncev, kar so povezali z zauživanjem cekotrofov. To pomeni, da pektinolitični encimi delujejo tudi med prehodom skozi želodec in tanko črevo, s čimer lahko delno razložimo razgradnjo nekaterih pektinov v teščem črevesu.

2.3.3.1 Ogljikovi hidrati

Razgradnja ogljikovih hidratov v slepem črevesu kuncev je, glede vmesnih ter končnih produktov in mehanizmov razgradnje, v osnovi enaka, kot razgradnja v predželodcih. Sposobnost mikroorganizmov za fermentacijo ogljikovih hidratov je odvisna od vrste ogljikovih hidratov in vrste prevladujočih bakterij v prebavnem traktu.

Lavrenčič (2007a) je pri raziskovanju poteka *in vitro* fermentacije različnih substratov opazil zelo majhno hitrost produkcije plina pri *in vitro* fermentaciji celuloze (3,6 ml/h). Čas do nastopa največje hitrosti fermentacije je znašal dobrih 40 ur, zakasnitev začetka fermentacije pa 25 ur. Ob povprečnem času zadrževanja substrata v slepem črevesu (10 ur) potemtakem pri kuncih do razgradnje celuloze sploh ne pride

Hitro in popolnoma razgradljive vlaknine (HPRV), kot so pektini in hemiceluloze, se v slepem črevesu hitreje in v večjem obsegu razgrajujejo. V primerjavi fermentacije lucerne (več počasi in izjemoma popolnoma razgradljive vlaknine (PIPRV)) in sladkorne pese (vsebuje večinoma HPRV), je pri fermentaciji sladkorne pese nastalo več HMK, medtem ko je bil pH nižji (Candau in sod. 1978, cit po Gidenne, 1997; Bellier, 1994, cit. po Gidenne, 1997). Prav tako so opazili povečan obseg razgradnje vlaknine. Hitrost prehoda skozi celoten prebavni trakt in med slepim črevesom in zadnjikom, je ostala nespremenjena.

Škrob je pomembna sestavina krmnih mešanic za kunce. Količina škroba, ki doseže slepo črevo kunca in je dostopna mikroorganizmom za razgradnjo, je odvisna od vsebnosti

škroba v obroku in od predhodne prebave škroba v tankem črevesu. Vlaknina v obroku lahko prepreči popolno razgradnjo škroba v tankem črevesu, zato lahko škrob zelo hitro fermentira v slepem črevesu. Gidenne in Perez (1993) sta ugotovila, da je bil pri restriktivno krmljenih kuncih povečan pretok škroba skozi tanko črevo (količina vlaknine v obroku pa je ostala enaka) povezan z večjo razgradnjo vlaknin in daljšim časom zadrževanja krme v prebavnem traktu.

2.3.3.2 Beljakovine

Večina zaužitih beljakovin se prebavi že v tankem črevesu, s pomočjo proteolitičnih encimov. Beljakovine, ki pridejo v slepo črevo, so neprebavljive beljakovine krme in endogene beljakovine (encimi, odmrle celice endotela prebavila...). V slepem črevesu te beljakovine proteolitični mikroorganizmi deaminirajo in nadalje fermentirajo do amoniaka, ki predstavlja glavni vir dušika za mikrobnno sintezo. Nivo amoniaka v slepem črevesu kunca se giblje od 4 do 18 mM/l (Gidenne, 1997), čeprav nekateri avtorji (Gidenne, 1986, cit. po Gidenne, 1997; Morisse in sod., 1985, cit. po Gidenne, 1997) poročajo tudi o večji vsebnosti (25 do 30 mM/l).

Mikroorganizmi slepega in debelega črevesa prispevajo velik del pri oskrbi kuncev s hranljivimi snovmi, saj so sestavni del mehkih iztrebkov, ki gredo v ponovno prebavo. Piattoni in sod. (1995) so ocenili, da je približno 50 % dušikovih spojin v slepem črevesu bakterijskega izvora. Z merjenjem vsebnosti diaminopimelične kisline, pa sta Jehl in Gidenne (1996) delež bakterijskega dušika ocenila na 12 % do 24 % vsega dušika v slepem črevesu kuncev.

2.3.3.3 Maščobe

Neprebavljene nenasičene maščobe mikroorganizmi v slepem črevesu hidrogenirajo. Vsebnost maščob v krmi kuncev je majhna, zato je mikrobnna hidrogenizacija v slepem črevesu manj pomembna (Gidenne, 1997).

2.3.4 Sinteza hlapnih maščobnih kislin in razmerja med njimi

Rezultat mikrobne aktivnosti v slepem črevesu so HMK ter amoniak in drugi plini (vodik, ogljikov dioksid, metan), ki nastanejo v glavnem s fermentacijo polisaharidov (hemiceluloz in pektinov). Najpogostejše tri hlapne maščobne kisline nastale v slepem črevesu so očetna, propionska in maslena kislina. Presnovne poti nastanka vseh treh so podobne tistim v predželodcih (slika 1).

Kunci imajo specifično razmerje s fermentacijo nastalih HMK, ki je bolj odvisno od sestave cekalne flore, kot od fermentiranega substrata (Gidenne, 1997). S fermentacijo nastane največ očetne kisline, sledi maslena, najmanj pa nastane propionske kisline. Razmerje je torej pri kuncih drugačno, kot pri prežvekovalcih, kjer je največ očetne, sledi propionska, najmanj pa je maslene kisline. Za takšno razmerje med HMK je kriva specifična mikrobna združba v slepem črevesu kunca, kjer prevladujejo anaerobni predstavniki iz rodu *Bacteroides*, najdemo pa tudi predstavnike rodu *Butyrivibrio*, ki producirajo masleno kislino (Bellier in sod., 1995). Večji delež maslene kisline je tudi zaradi pretvorbe očetne kisline v masleno, ki poteka v slepem črevesu. Razmerje s fermentacijo nastalih maščobnih kislin v slepem črevesu naj bi bilo odvisno od starosti kunca. Ob 25. dnevu starosti so opazili nenaden obrat v razmerju med propionsko in masleno kislino, saj naj bi od takrat naprej nastajalo več maslene kisline (Piattoni in sod., 1995). Te ugotovitve pa se ne ujemajo z ugotovitvami Bellier in sod. (1995), ki so opazili manjšo vsebnost maslene kisline pri odraslih kuncih, kot ob odstavitvi kuncev.

Fermentacijska aktivnost bakterij je odvisna tudi od dnevnega ritma. V času cekotrofije je opazna manjša produkcija HMK, kot v času izločanja trdega blata (Gidenne, 1986, cit. po Gidenne, 1997; Gidenne, 1995, cit. po Gidenne, 1997). Ta dnevni ritem sovпада z ritmom absorpcije HMK (Vernay in sod., 1984, cit. po Gidenne, 1997).

2.3.5 Plini nastali ob fermentaciji hranljivih snovi v slepem črevesu kuncev

Podobno kot v predželodcih, tudi v slepem črevesu kuncev ob fermentaciji nastajajo plini (ogljikov dioksid, metan in vodik). Fermentacija v slepem črevesu in kolonu je učinkovitejša z vidika oskrbe živali s potencialno energijo, kot fermentacija v predželodcih. Razlog za to bi naj bila reduktivna acetogeneza, ki delno nadomesti

metanogenezo (Demeyer in De Graeve, 1991). Acetogeneza je še posebej obsežna v predodstavitvenem obdobju, ko naj bi bila metanogeneza odsotna. Piattoni in sod. (1996) dopuščajo možnost obstoja genetskega vpliva na metanogenezo pri kuncih, saj so opazili veliko variabilnost v produkciji metana med posameznimi gnezdi pri kuncih. Obseg acetogeneze se po odstavitvi kuncev postopno zmanjšuje, povečuje pa se metanogeneza. Nasprotno pa so Bennegadi in sod. (2003) že pri sesnih kuncih odkrili razmeroma velik delež metanogenih bakterij.

2.4 VPLIV PREHRANE NA AKTIVNOST MIKROORGANIZMOV V SLEPEM ČREVESU KUNCEV IN PREDŽELODCIH PREŽVEKOVALCEV

Krma vpliva na mikroorganizme v prebavnem traktu na vsaj dva načina. Z njo imajo živali zagotovljeno ustrezno količino in kakovost hranljivih snovi, obenem pa zagotavlja tudi ustrezno motorično delovanje prebavnega trakta in ustrezno hitrost pretoka vsebine prebavil skozi prebavni trakt.

2.4.1 Vlakenina

Lignoceluloza je bila vedno pomemben del prehrane prežvekovalcev, saj zagotavlja ustrezno delovanje predželodcev. Lignin je odporen na mikrobno razgradnjo v predželodcih, zavira pa tudi razgradnjo celuloze, s katero je povezan preko številnih kemijskih vezi, ter tako mikroorganizmom onemogoča dostop do substrata (celuloze) (Krause in sod., 2003).

Čas zadrževanja krme v predželodcih je bistveno daljši kot tisti v slepem črevesu kuncev, zato je razgradnja celuloze s pomočjo celulolitičnih bakterij večja. Vse vrste vlaknin (HPRV in PIPRV) so zelo pomemben dejavnik za vzdrževanje stabilnega okolja za vampove mikroorganizme. Ob razgradnji vlaknine nastajajo HMK, posebej očetna kislina, ki preprečujejo pretiran razvoj mlečnokislinskih bakterij in drugih bakterij, ki znižujejo pH v predželodcih (Slyter, 1976). Russel (1998) je opazil, da pri zreli voluminozni krmi nastaja veliko očetne in malo propionske kisline, pri nezreli voluminozni krmi pa je razmerje med očetno in propionsko kislino ožje. Ožje razmerje med očetno in propionsko kislino je opazno tudi pri močnih krmilih, vendar vsebnost propionske kisline ni nikoli

večja od vsebnosti očetne kisline. Na vsebnost maslene kisline s prehrano ne vplivamo v tolikšni meri, kot na vsebnosti očetne in propionske kisline (Russel, 1998).

Vlaknina (polisaharidi in fenolne substance) v krmi ima pozitivne vplive na zdravje kuncev, preprečuje pojav prebavnih motenj. Vlaknino lahko razdelimo na dve skupini. Prvo skupino predstavljajo počasi in izjemoma popolnoma razgradljive vlaknine (PIPRV), v glavnem lignin in celuloza, ki vzdržujejo motorično funkcijo prebavila. V drugi skupini so v glavnem vlaknine, ki so glavni substrat za mikrobovno fermentacijo v slepem črevesu. Gre predvsem za hemiceluloze in pektinske snovi (Lavrenčič, 2007b).

Ob zmanjšanju vsebnosti vlaknine v obroku, ne pride do statistično značilnih sprememb koncentracije končnih produktov fermentacije in pH vsebine slepega črevesa. Razlike so le v razmerjih med HMK (Bellier in Gidenne, 1996, cit. po Gidenne, 1997). Ob zožanju razmerja med vlaknino in škrobom se poveča vsebnost maslene kisline, vsebnost očetne kisline pa se zmanjša. Počasi in izjemoma popolnoma razgradljiva vlaknina (PIPRV), ki pride v slepo črevo, ne določa poteka fermentacije, najverjetneje zaradi relativno kratkega časa zadrževanja substrata v slepem črevesu. Ta je dovolj dolg le za razgradnjo hitreje in popolnoma razgradljivo vlaknino (HPRV), kot so pektini in hemiceluloze. O manjšem vplivu celuloze, škroba in beljakovin na fermentacijsko aktivnost mikroorganizmov v slepem črevesu kuncev poročajo tudi Marounek in sod. (2000), Kermauner in Lavrenčič (2005) in Lavrenčič (2007a).

Lignin naj bi bil odporen na bakterijsko razgradnjo. Inhibitoren učinek lignina na fermentacijo je dobro raziskan pri prežvekovalcih, pri kuncih pa so rezultati raziskav zelo različni. Gidenne in Perez (1993) sta opazila, da povečana vsebnost lignina v krmi vpliva na manjšo razgradljivost vlaknine in skrajša čas zadrževanja krme v prebavilih, opazen pa je tudi pozitiven učinek pri zmanjševanju pogina pri odraščajočih kuncih. Nekateri avtorji (Motta Ferreira, 1990, cit. po Gidenne, 1997; Chiou in sod., 1994, cit. po Gidenne, 1997) trdijo, da lignin vpliva na manjšo produkcijo HMK in amoniaka, medtem ko drugi (Gidenne, 1986, cit. po Gidenne, 1997; Falcao e Cunha, 1988, cit. po Gidenne, 1997; Perez de Ayala, 1989, cit. po Gidenne, 1997) niso opazili nobenih sprememb v fermentaciji.

Vpliv celuloze na razgradnjo vlaknine in na prehod krme skozi slepo črevo, je manjši kot vpliv lignina. Celuloza ima pozitiven vpliv na zmanjševanje pogina pri odraščajočih kuncih (Gidenne, 1997).

Raziskava poteka *in vitro* produkcije plina pri različnih čistih substratih (pektin, ksilan, škrob in celuloza) in komercialni krmni mešanici za kunce (Lavrenčič, 2007a) je pokazala, da samo na podlagi skupne produkcije plina (B) in največje hitrosti fermentacije (MFR), še ne moremo sklepati o pomembnosti določenega substrata *in vivo*, saj je čas zadrževanja substrata v slepem črevesu omejen na okoli 10 ur (Gidenne in sod., 2002). V omenjenem poskusu sta le pektin in komercialna krmna mešanica v tem času dosegla največjo MFR. To dokazuje, kako pomembni so pektini za mikroorganizme slepega črevesa kuncev. Tudi hemiceluloze so pomemben substrat za mikroorganizme (Gidenne in sod., 2002), čeprav je bil čas, ko je bila dosežena največja hitrost fermentacije (TMFR) daljši od pričakovanega. Lavrenčič (2007a) predvideva, da je TMFR za hemiceluloze *in vitro* daljši od TMFR *in vivo*, ker je *in vitro* fermentacija upočasnjena zaradi razredčitve inokuluma, zaradi česar je mikrobna kolonizacija substrata počasnejša in zakasnitev začetka fermentacije (LAG) daljša. HPRV pospešijo razgradnjo hranljivih snovi v slepem črevesu in pozitivno vplivajo na vzpostavitev mikrobne združbe pri odraščajočih kuncih. Candau in sod. (1978), cit po Gidenne (1997) so poročali o zgodnejši stabilizaciji fermentacije v slepem črevesu kuncev, ki so zauživali obroke, sestavljene na osnovi sladkorne pese v primerjavi s kunci, ki so zauživali obroke, sestavljene na osnovi lucerne. Jehl in Gidenne (1996) poročata, da zamenjava škroba z HPRV izboljša razgradnjo vlaknine, ne da bi to vplivalo na čas prehoda krme skozi prebavni trakt.

2.4.2 Škrob

Krma prežvekovalcev, ki temelji na žitih lahko vsebuje tudi 500 gramov škroba na kilogram. Fermentacija škroba v predželodcih je zelo obsežna, saj se lahko fermentira tudi 90 % vsega škroba. Tako obsežna fermentacija pogosto pomeni znižanje pH v ampove vsebine, kar inhibira celulolitične mikroorganizme. Rymer in Givens (2002) sta ugotovila, da je razgradljivost sena manjša, če je v krmi velik delež hitro razgradljivega škroba. Nizek pH nudi ugodne razmere za delovanje mlečnokislinskih bakterij, ki so drugače v predželodcih prisotne v zelo omejenem številu. Delovanje mlečnokislinskih bakterij še

dodatno zniža pH v ampove vsebine, kar lahko vodi do acidoze vampa. Uspešni razgrajevalci škroba so poleg bakterij (*Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio brisolvens*, *Succinimonas amylolytica*, *Selenomonas ruminantium...*) in nekaterih gliv predvsem praživali, ki prispevajo od 20 % do 45% amilolitične aktivnosti v predželodcih (McAllister in Cheng, 1996). Povečana vsebnost škroba v krmi povzroči povečanje deleža propionske kisline v predželodcih glede na delež očetne kisline (Keady in Mayne, 2001; Rymer in Givens, 2002).

Rezultati raziskav o vplivu škroba na mikrobo fermentacijo v slepem črevesu so si nekoliko nasprotujoči. Blas in sod. (1994) so ugotovili, da se velik delež koruznega škroba ne prebavi v tankem črevesu, nato pa v slepem črevesu povzroči nezaželeno fermentacijo in vzpostavitev neželjene mikroflore slepega črevesa, kar poveča pogin kuncev. Rezultati te študije potrjujejo že znana dejstva, da mora krma kuncev prve tri tedne po odstavitvi vsebovati manj škroba in več vlaknine. Gutierrez in sod. (2002) so ugotovili tudi, da nadomestitev pšeničnega škroba s škrobom iz graha vodi do statistično značilnega povečanja koncentracije škroba na terminalnem delu tankega črevesa. Večina tega škroba naj bi se fermentirala v slepem črevesu. Tudi Padilha in sod. (1995) poročajo o velikem številu amilolitičnih mikroorganizmov v slepem črevesu. Po drugi strani pa Gidenne in Bellier (2000) in Gidenne in sod. (2004) ugotavljajo, da se večina škroba prebavi že v tankem črevesu, tako da ga malo pride v slepo črevo. Lavrenčič (2007a) je ugotovil, da škrob sicer fermentira v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev, vendar je zakasnitev začetka fermentacije (LAG) daljša od 10 ur, čas, ko je dosežena največja hitrost fermentacije (TMFR) pa daljši od 22 ur, pri tem pa nastane le malo plina (15 ml/g suhe snovi). Četudi predvidevamo, da so LAG in TMFR *in vivo* krajši, so še vedno predolgi, da bi bila fermentacija škroba obsežnejša. S to raziskavo je Lavrenčič (2007a) potrdil, da škrob ni pomemben substrat za mikroorganizme v slepem črevesu kuncev.

2.4.3 Beljakovine

Na splošno velja, da razgradljive beljakovine zvišajo mikrobo aktivnost v predželodcih prežvekovalcev, vendar le, če je istočasno v obroku tudi dovolj energije, saj je zaradi

pomanjkanja energije rast bakterij v predželodcu zmanjšana (Cruz Soto in sod., 1994, cit. po Chikunya in sod., 1996).

Največji delež (dve tretjini) vseh surovih beljakovin v slepem črevesu kuncev predstavljajo prave beljakovine. To so v glavnem bakterijske beljakovine, neprebavljive beljakovine krme in endogene beljakovine (encimi, mucini, odmrle celice endotela prebavil...). Drugi največji delež surovih beljakovin predstavlja nebeljakovinski dušik, ki zajema aminokislino, peptide, amoniak in sečnino (Marounek in sod., 2000). Amoniak v slepem črevesu pa ne nastaja le zaradi mikrobne fermentacije, ampak ga okrog 25 % izhaja iz sečnine iz krvi, ki jo ureolitični encimi pretvorijo v amoniak. Kar polovica sečnine, ki nastane v katabolnih procesih, se iz krvi absorbira v prebavila. Majhna vsebnost sečnine v slepem črevesu nakazuje, da sečnino zelo hitro hidrolizirajo bakterije (Gidenne, 1997).

Nadomeščanje beljakovin v krmi z nebeljakovinskimi viri dušika, se je izkazalo za neuporabno, saj se 90 % sečnine absorbira v kri že pred slepim črevesom. Po drugi strani pa sečnino uspešno porabijo mikroorganizmi, če jo vnesemo direktno v slepo črevo. Makkar in sod. (1990) poročajo o dvigu celulitične aktivnosti ob povečani količini sečnine v krmi. Al - Bar in Al - Aghbari (1996, cit. po Gidenne 1997) sta ugotovila, da povečanje količine beljakovin v krmi iz 12,8 % na 16 % poveča koncentracijo dušika v slepem črevesu in zniža pH vrednost. S povečanjem vsebnosti beljakovin v krmi se poveča tudi koncentracija hlapnih maščobnih kislin v slepem črevesu kuncev. Presežek beljakovin v krmi lahko pri mladih kuncih povzroči prekomerno namnožitev klostridijev in povečano možnost namnožitve *E. coli*, kar lahko vodi do prebavnih motenj in driske (Cortez in sod., 1992, cit. po Gidenne, 1997).

2.4.4 Maščobe

Zmožnost vampovih mikroorganizmov za razgradnjo maščob je omejena in tudi krma prežvekovalcev načeloma vsebuje le malo maščob. Če se delež maščob v krmi poveča nad 100 g/kg se aktivnost mikroorganizmov zmanjša, zaradi česar se zmanjšata fermentacija vlaknine in zauživanje krme. Raziskave *in vitro* razgradljivosti pri prežvekovalcih so pokazale, da maščobe negativno vplivajo na razgradnjo strukturnih ogljikovih hidratov v predželodcih. Po drugi strani pa opazovanja *in vivo* kažejo, da maščobe v krmi ne vplivajo

na bakterijsko floro predželodcev, saj se je negativen vpliv pokazal le pri nekaterih fibrolitičnih bakterijah. Nasprotno pa maščobe negativno vplivajo na število praživali v predželodcih (Doreau in Ferlay, 1995). Nasičene maščobe ne prizadenejo mikrobne fermentacije v predželodcih v takšni meri kot nenasičene maščobne kisline.

Podatkov o učinku maščob na mikroorganizme slepega črevesa kuncev je malo. Falcao e Cunha in sod. (1996, cit. po Gidenne, 1997) poročajo o boljši razgradnji vlaknine, večji masi stene slepega črevesa in povečani teži vsebine slepega črevesa ob dodatku maščob v obroku kuncev.

2.5 POMEN Hlapnih maščobnih kislin

Skupna produkcija hlapnih maščobnih kislin (HMK) ima številne ugodne vplive, tako na energetski metabolizem, kot tudi na zdravje. HMK spodbujajo absorpcijo vode in natrija v debelem črevesu sesalcev in tako preprečujejo osmotsko drisko. Maslena kislina ima pri tem večjo vlogo kot očetna in propionska. Produkcija hlapnih maščobnih kislin ima tudi pomembno vlogo pri vzdrževanju morfološke in funkcionalne zgradbe epitela debelega črevesa, saj HMK spodbujajo proliferacijo epitela debelega črevesa. Visoka koncentracija HMK tudi spodbuja sekrecijo karbonatnega iona v debelo črevo ter s tem vpliva na pufersko kapaciteto vsebine debelega črevesa in na vzdrževanje konstantnega pH (Williams in sod., 2001).

HMK v debelem črevesu vplivajo tudi na krčenje mišic debelega črevesa, vendar je njihova vloga še nejasna (Edwards, 1993). Mortensen in sod. (1990, cit. po Edwards, 1993) poročajo o vplivu HMK na dilatacijo arterijskih kapilar debelega črevesa, kar vpliva na pretok krvi v tem delu in na hitrost absorpcije hranljivih snovi iz vsebine debelega črevesa.

Absorpcija hlapnih maščobnih kislin lahko zagotavlja kar 30% potrebne energije za vzdrževanje bazalnega metabolizma živali. Del hlapnih maščobnih kislin absorbira stena debelega črevesa, vendar pride le acetat v sistemski krvni obtok v večji količini in je dostopen za metabolizem v mišicah. Metabolizem propionata se nadaljuje v jetrih, kjer inhibira glukoneogenezo. Butirat predstavlja pomemben energetski vir za mukozne celice slepega črevesa. Prispeval naj bi 70% energije, ki jo porabijo kolonocite za svoje delovanje (Williams in sod., 2001).

Sunvold in sod. (1995) in Fukuda (1999) ugotavljajo, da je uživanje prehranske vlaknine tesno povezano z manjšim tveganjem za nastanek raka debelega črevesa. Mehanizem preventivnega vpliva prehranske vlaknine na razvoj raka, je v veliki meri povezan z nastankom HMK v debelem črevesu. Zaradi nastalih kislin se pH v vsebini debelega črevesa zniža, kar inhibira delovanje bakterij, katerih presnovki delujejo kancerogeno. Fukuda (1999) poroča tudi o antineoplastičnih učinkih (diferenciacija in apoptoza) maslene kisline proti rakastim celicam debelega črevesa.

Nižji pH v slepem in debelem črevesu zavira delovanje kolibacilov in drugih potencialno patogenih mikroorganizmov, ki povzročajo drisko in druge prebavne motnje pri kuncih (Jehl in Gidenne, 1996), s čimer pripomorejo k ohranjanju dobrega zdravstvenega stanja in k zmanjšanju pogina kuncev v času pitanja.

Z vidika energije so HMK zelo pomembne tudi za prežvekovalce. Skozi stene predželodcev se absorbira velika količina HMK, ki pokrije velik del potreb po energiji prežvekovalcev (Bergman, 1990, cit. po Sehested in sod., 1999). Od prevladujočih HMK ima butirrat največjo energijsko vrednost, najpogosteje pa ga porabijo že celice epitela predželodcev, kar jim pokriva velik del potreb po energiji. Epitelne celice predželodcev porabijo največ maslene kisline, sledi propionska, najmanj pa očetne kisline.

Povečanje koncentracije najpomembnejših HMK v predželodcih (očetna, propionska in maslena kislina) poveča mitotsko delitev celic epitela predželodcev ovc *in vivo*, pri čemer ima maslena kislina na proliferacijo celic največji učinek (Skata in Tamate, 1978, cit. po Baldwin, 1999).

Kratkoverižne maščobne kisline zagotavljajo od 60 % do 70% presnovljive energije pri prežvekovalcih, zato so zelo pomembne tudi pri prireji mleka (Armentano, 1992, cit. po Seymour in sod., 2005; Van Soest, 1982, cit. po Seymour in sod., 2005). Iz očetne in maslene kisline živali z oksidacijo pridobijo energijo, služita pa tudi kot prekurzorja za sintezo maščob, propionska kislina pa je samo glukogena in zagotavlja od 65 % do 80 % glukoze za metabolizem krav v laktaciji. Maslena kislina lahko stimulira glukoneogenezo, čeprav sama ni glukogena. Pri tvorbi mleka pa maslena kislina poleg zagotavljanja energije

in zagotavljanja prekurzorjev za sintezo maščob, spodbuja tudi pretvorbo propionske kisline v glukozo, iz katere nastaja laktoza (Seymour in sod., 2005).

Nenazadnje so pomemben produkt fermentacije pri prežvekovalcih tudi številne mikrobnice, ki so pomemben vir beljakovin in aminokislin za gostitelja. Te se prebavijo in absorbirajo v glavnem v tankem črevesu (McDonald in sod., 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SUBSTRATI

Za substrate smo izbrali osem krmil z različno kemijsko sestavo (preglednica 2). Energijska krmila so vsebovala predvsem škrob (zrnje koruze in ječmena). V sojinih in sončničnih tropinah so prevladovali beljakovine. Celuloza je prevladovala v peletiranem senu in dehidrirani lucerni, medtem ko so hemiceluloze (ksilani) prevladovali v pšeničnih otrobih, pektinske snovi pa v pesnih rezancih. Vsi vzorci so bili pred začetkom *in vitro* inkubacije zmleti na velikost delcev 1 mm.

Preglednica 2: Kemijska sestava uporabljenih substratov (g/kg SS vzorca)

	Pelet. seno	Dehidr. lucerna	Pšen. otrobi	Ječmen	Koruza	Pesni rezanci	Son. tropine	Soj. tropine
SS (na vzorec)	930,6	928,8	883,3	895,0	877,8	933,3	920,7	890,8
SB	110,2	179,3	174,3	106,9	88,0	95,3	387,9	515,4
SM	11,7	24,5	33,0	19,7	34,8	9,6	9,5	12,4
SP	109,8	114,7	56,9	24,7	12,8	94,3	87,6	63,4
NDV	670,0	477,1	466,5	172,9	113,9	326,0	309,9	128,4
KDV	449,4	354,4	157,4	66,6	36,7	190,8	247,1	87,9
KDL	112,6	98,9	44,3	13,6	5,8	15,6	70,5	2,9
Celuloze (KDV - KDL)	336,8	255,5	113,1	53,0	30,9	175,2	176,6	85,0
Hemiceluloze (NDV - KDV)	220,6	122,7	309,1	106,3	77,2	135,2	62,8	40,5
Nevlaknasti ogljikovi hidrati (NVOH)	98,3	204,4	269,3	675,8	750,5	474,8	205,1	280,4

SS=suha snov, SB=surove beljakovine, SM=surove maščobe, SP=surov pepel, NDV=v nevtralnem detergentu netopna vlaknina, KDV=v kislem detergentu netopne vlaknine, KDL=v kislem detergentu netopen lignin, NVOH=nevlaknasti ogljikovi hidrati (NVOH = SS - (SP + SB + SM + NDV), pelet. seno=peletirano seno, dehidr. lucerna=dehidrirana lucerna, pšen. otrobi=pšenični otrobi, son. tropine=sončnične tropine, soj. tropine=sojine tropine

3.2 IN VITRO FERMENTACIJA

In vitro fermentacijo substratov smo izvedli z Hohenheimskim plinskim testom. Metoda je povzeta po avtorjih Menke in Steingass (1988).

3.2.1 Priprava vampovega soka

Vampov sok smo dobili iz dveh fistuliranih ovnov jezersko–solčavske pasme, ki sta bila krmljena s senom po volji in z 250 g koruznega zrnja za pokrivanje potreb za vzdrževanje. Temu obroku smo dodali še 20 g mineralno vitaminskega dodatka na dan. Vampov sok smo odvzeli dve uri po krmljenju in ga v predhodno ogreti (na 39 °C) in s CO₂ prepihani termo steklenici prenesli v *in vitro* laboratorij.

3.2.2 Priprava inokuluma iz vsebineslepega črevesa kuncev

Za pripravo inokuluma iz vsebine slepega črevesa kuncev smo uporabili metodo, ki jo je opisal Calabro in sod. (1999). Žrtvovali smo dva 78 dni stara novozelandska bela kunca (slovenska mesna linija SIKA), ki sta bila od odstavitve krmljena povolji s komercialno krmno mešanico, ki je vsebovala (v sušini) 201 g SB, 22 g SM, 155 g SV, 524 g BDI, 334 g NDV, 190 g KDV in 51 g KDL (Krka, Novo mesto, Slovenija). Približno 16 ur pred klanjem smo jima odvzeli krmo, vodo pa smo jima pustili še vedno na razpolago. Po zakolu smo kuncema odstranili prebavila, slepo črevo pa na obeh koncih prevezali z najlonsko vrvico, da smo preprečili iztok in pomešanje vsebine slepega črevesa z vsebino preostalega dela prebavil. Slep črevesi smo v plastični posodi v nekaj minutah prenesli v *in vitro* laboratorij. Vsebinsi slepih čreves smo stisnili v predhodno ogreto (39 °C) in s CO₂ prepihovano čašo ter vsebini z mešanjem homogenizirali.

3.2.3 Izvedba *in vitro* fermentacije

Čiste in osušene brizgalke smo oštevilčili in vanje zatehtali približno 175 mg substrata. Vsak substrat smo zatehtali v pet brizgalk. Brizgalke smo nepredušno zaprli, jih postavili v stojalo, stojalo pa postavili v kad z deionizirano vodo, segreto na 39 ± 0,5 °C.

Pufer smo pripravili iz raztopin A, B in C, katerih sestava je prikazana v preglednici 3 in raztopine resazurina (preglednica 4). Steklenico s pufrom smo na dan začetka poskusa namestili v vodno kopel v kadi za mešanje pufra, ki smo jo segreli na 39 ± 0,5 °C. Pufer smo mešali z magnetnim mešalom in ga prepihovali s CO₂ pod pritiskom 1,8 do 2,0 bara. Pet do deset minut preden smo pufru dodali vampov sok, smo v pufer dodali redukcijsko raztopino (preglednica 4).

Vampov sok smo filtrirali skozi štiri plasti gaze v ogret (40 °C) in s CO₂ preprihovan merilni valj. Potrebno količino vampovega soka smo, ob stalnem preprihovanju s CO₂, dodali končnemu pufri, in sicer v razmerju tretjina vampovega soka in dve tretjini pufru. Vse skupaj smo preprihovali s CO₂ še 15 minut ob neprestanem mešanju.

Preglednica 3: Sestava puferskih raztopin A, B in C

Raztopina A	Raztopina B	Raztopina C
13,2 g CaCl ₂ x 2H ₂ O	35,0 g NaHCO ₃	5,7 g Na ₂ HPO ₄
10,0 g MnCl ₂ x 4H ₂ O	4,0 g (NH ₄)HCO ₃	6,2 g KH ₂ PO ₄
1,0 g CoCl ₂ x 6H ₂ O	deionizirana voda do 1000 ml	0,6 g MgSO ₄ x 6H ₂ O
0,8 g FeCl ₂ x 6H ₂ O		deionizirana voda do 1000 ml
deionizirana voda do 100 ml		

Preglednica 4: Sestava resazurina, redukcijske raztopine in končnega pufru

Raztopina resazurina	Redukcijska raztopina	Pufer*
100 mg resazurina	47,5 ml deionizirane vode	474 ml deionizirane vode
deionizirana voda do 100 ml	2 ml 1 M NaOH	0,12 ml raztopine A
	285 mg Na ₂ S x 7H ₂ O	237 ml raztopine B
		237 ml raztopine C
		1 ml raztopine resazurina
		40 ml redukcijske raztopine

* količina redukcijske raztopine in pufru zadošča za 50 brizgalk

Pri pripravi inokuluma iz vsebine slepega črevesa kuncev smo najprej pripravili 250 ml čašo s pufrom brez redukcijske raztopine. Ob preprihovanju s CO₂ smo v čašo zatehtali potrebno količino vsebine slepega črevesa in vse skupaj premešali na magnetnem mešalu s termostatom. Homogenizirano vsebino slepega črevesa in pufru smo filtrirali skozi 4 plasti gaze v drugo 250 ml čašo in ostanek vsebine slepega črevesa na gazi prelili manjšo količino pufru. Filtrat smo nato prenesli v 2 l steklenico s preostankom pufru, ki smo mu predhodno dodali redukcijsko raztopino. Tako pripravljen inokulum smo preprihovali s CO₂ še 15 minut pod pritiskom enega bara.

S tako pripravljenim inokulumom iz vsebine slepega črevesa in inokulumom iz vampovega soka smo napolnili brizgalke z zatehtanim substratom in odčitali začetni položaj bata v brizgalki. Vsebino smo nato premešali in brizgalko postavili nazaj v stojalo v kadi, kjer je bila deionizirana voda segreta na 39 °C. Istočasno z vzorci smo inkubirali tudi tri slepe vzorce (brez substrata) in tri vzorce s standardnim senom, za spremljanje aktivnosti inokulumov, pripravljenih iz vsebine slepega črevesa kuncev oz. vampovega soka. Prostornine nastalega plina smo odčitali po 2., 4., 6., 8., 10., 12., 24., 36., 48., 72. in 96. urah inkubacije. Če je prostornina nastalega plina narasla čez 80 ml, smo plin iz brizgalke iztisnili, prostornino plina pa na novo odčitali in nadaljevali z inkubacijo.

3.3 ANALIZA HLAPNIH MAŠČOBNIH KISLIN

Po osmih urah inkubacije smo, po odčitavanju prostornine nastalega plina, izločili po dve brizgalki z istim substratom in ju postavili v hladno vodo. Vsebino brizgalk smo prelili v označene 50 ml centrifugirne epruvete in dodali AgCl₂, da smo ustavili delovanje mikroorganizmov. Epruvete smo shranili v zamrzovalniku na – 20 °C do začetka analize vsebnosti hlapnih maščobnih kislin.

3.3.1 Potek eterske ekstrakcije hlapnih maščobnih kislin (HMK)

Zamrznjene vzorce smo najprej odmrznili na sobni temperaturi nato pa centrifugirali 5 minut pri 2000 rpm. Po centrifugiranju smo po 3 ml supernatanta iz vsake epruvete prenesli v prazne epruvete in dodali H₂SO₄ do pH 2. Supernatant smo nato centrifugirali še 10 minut pri 3000 rpm.

V epruvete smo si pripravili po 0,4 g sušenega NaCl in dodali 1 ml vzorca. Vzoredno smo naredili tudi ekstrakcijo standardne mešanice HMK, katere sestava je prikazana v preglednici 5.

Preglednica 5: Sestava standardne raztopine HMK

Kislina	Koncentracija (g/l)	Količina (ml)
Ocetna kislina (C ₄)	0,525	5
Propionska kislina (C ₃)	0,099	1
Izo-maslena kislina (C ₄)	0,095	1
N-maslena kislina (C ₄)	0,096	1

Vzorcu in standardu smo dodali 100 µl internega standarda (krotonska kislina koncentracije 1 g/l), nato pa še 200 µl 50% H₂SO₄. Na koncu smo dodali še 1 ml dietiletra. Vzorce smo centrifugirali do 2000 rpm, nato pa centrifugo izključili. Po centrifugiranju smo etersko (zgornjo) fazo posesali s Pasteurjevimi pipetami, v spodnjo fazo pa dodali še 1 ml etra. Vsebino smo premešali z obračanjem epruvete (20×) in ponovili postopek centrifugiranja. Etersko fazo smo prenesli v epruveto, kjer smo že imeli ekstrakt ter dodali še približno 0,3 g CaCl₂ (Holdeman in sod., 1977).

3.3.2 Analitska oprema in pogoji analize

Vsebnost HMK v vzorcu smo določili s plinsko kromatografijo. Uporabili smo plinski kromatograf Hewlett Packard 5890 A; proizvajalca Hewlett Packard, ZDA. Za ločevanje hlapnih maščobnih kislin smo uporabili kapilarno kolono NUKOL, dolžine 30 m, premera 0,25 mm in debelino standardne faze 0,25 µm, proizvajalca SUPELCO, ZDA. V preglednici 6 sta navedena temperaturni program analize in pretok plinov.

Preglednica 6: Temperaturni pogoji in pretok plinov za plinsko kromatografijo

T* program		Pretok plinov	
T injektorja	185 °C	Ar (nosilni)	2 ml/min
Začetna T kolone	75 °C	Dušik (make-up)	30 ml/min
Zadrževalni čas	3,5 min	Vodik	30 ml/min
Dvig T	14 °C/min	Zrak	300 ml/min
Končna T kolone	160 °C		
Končni zad. čas	3 min	V [□] INJICIRANJA	1 µl; split 30:1
T detektorja	290 °C		

T=temperatura, ° V=prostornina

3.4 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke o prostornini nastalega plina ob različnih časih inkubacije in količini HMK, sproščenih po 8. urah inkubacije smo za statistično obdelavo pripravili v programu Microsoft Excel. Vse podatke smo korigirali s prostornino plina ali HMK, nastalih iz/v slepem vzorcu ob danem času inkubacije. Dobljene vrednosti smo korigirali še na vsebnost suhe snovi (SS) substratov.

3.4.1 Kazalniki poteka fermentacije

Kazalnike produkcije plina smo ocenili s pomočjo Gompertzovega modela (Bidlack in Buxton, 1992):

$$Y_t = B \times e^{-C \times e^{-At}}$$

kjer je Y_t prostornina plina (ml/g SS) nastalega v času t , B je skupna potencialna produkcija plina (ml/g SS), C je specifična hitrost fermentacije, na katero vpliva parameter A , ki je konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti. Kazalnike B , C in A smo ocenili z Marquardtovo nelinearno regresijo (PROC NLIN) v statističnem programskem paketu SAS/STAT (SAS/STAT, 1994). Iz ocenjenih kazalnikov Gompertzovega modela smo izračunali največjo hitrost fermentacije (MFR; ml/h), čas, ko je hitrost fermentacije največja (TMFR; h), zakasnitev začetka fermentacije (LAG; h). Prostornino plina,

nastalega v 8. urah (Gas_8) fermentacije, smo izračunali tako, da smo v Gompertzov model vstavili čas inkubacije 8 ur.

Čas, ko je bila hitrost fermentacije največja (TMFR), smo izračunali z drugim odvodom Gompertzovega modela, ki smo ga izenačili z 0 in rešili po t:

$$\frac{d^2Y}{dt^2} = A \times B^2 \times C^2 \times (e^{-At})^2 \times e^{-C \times e^{-At}} - A \times B \times C^2 \times e^{-C \times e^{-At}} = 0$$

Največjo hitrost fermentacije (MFR) smo izračunali tako, da smo vstavili ustrezno vrednost TMFR v enačbo prvega odvoda Gompertzovega modela.

Zakasnitev začetka fermentacije (LAG) smo izračunali z enačbo:

$$LAG = \frac{\log(C) - 1}{A}$$

3.4.2 Statistični model

Morebitne statistično značilne razlike med substrati in med vrstama inokulumov za spremenljivke B, A, C, MFR, TMFR, LAG in GAS_8 smo izračunali z statističnim modelom:

$$Y_{ij} = \mu + I_i + S_j + IS_{ij} + e_{ij},$$

kjer so:

Y_{ij} = B, C, A, MFR, TMFR, LAG in GAS_8 , vsebnost skupne količine HMK, vsebnost očetne, propionske in maslene kisline ter deleže očetne, propionske in maslene kisline od skupne količine HMK

μ = srednja vrednost

I_i = vrsta inokuluma; i = inokulum, pripravljen iz vsebine slepega črevesa kunca ali vampovega soka ovna

S_j = vrsta substrata, j = zrnje ječmen in koruze, dehidrirana lucerna, pesni rezanci, pšenični otrobi, seno, sojine in sončnične tropine

IS_{ij} = interakcija med vrsto inokuluma in vrsto substrata

e_{ij} = ostanek

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI ANALIZE VARIANCE KAZALNIKOV IN POTEKA FERMENTACIJE TER Hlapnih Maščobnih Kislín

Rezultati analize variance kazalnikov fermentacije, kot so skupna potencialna produkcija plina (B), specifična hitrost fermentacije (C) in faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A), ter izračunanih parametrov, kot so zakasnitev začetka fermentacije (LAG), največja hitrost fermentacije (MFR), čas, ko je bila hitrost fermentacije največja (TMFR), ter prostornina plina, nastala po osmih urah inkubacije (GAS₈), so predstavljeni v preglednici 7, kjer smo navedli tudi determinacijske koeficiente za posamezne vplive (R²).

Preglednica 7: Rezultati analize variance za ocenjene in izračunane kazalnike fermentacije

Parameter	B	C	A	LAG (h)	MFR (ml/h)	TMFR (h)	GAS ₈ (ml/g SS)
R²	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99
substrat	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
inokulum	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
substrat*inokulum	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

B – skupna potencialna produkcija plina, C - specifična hitrost fermentacije, A - konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti, LAG - zakasnitev fermentacije na začetku, MFR - maksimalna stopnja fermentacije, TMFR - čas maksimalne stopnje fermentacije, GAS₈ - količina plina po osmih urah inkubacije

Delež pojasnjene variance (R²) je za vse kazalnike in izračunane parametre presegel 0,97. Na vse kazalnike fermentacije sta statistično značilno vplivala tako uporabljen substrat (P<0,0001), kot vrsta inokuluma (P<0,0001). Statistično značilen pa je bil tudi vpliv interakcije substrata in inokuluma (P<0,0001).

Rezultati analize variance za količino nastale očetne, propionske in maslene kisline, skupne količine hlapnih maščobnih kislin (HMK), ter deležev posameznih HMK po osmih urah inkubacije posameznih krmil, so predstavljeni v preglednici 8, kjer je prikazan tudi delež pojasnjene variance (R²).

Preglednica 8: Rezultati analize variance za količino nastalih hlapnih maščobnih kislin

Parameter	Ocetna kislina (mmol/g SS)	Propionska kislina (mmol/g SS)	Maslena kislina (mmol/g SS)	HMK (mmol/g SS)	Delež ocetne kisline	Delež propion. kisline	Delež maslene kisline
R ²	0,98	0,98	0,86	0,97	0,98	0,99	0,98
substrat	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
inokulum	<0,0001	<0,0001	<0,3488	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
substrat * inokulum	<0,0001	<0,0001	<0,0059	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

HMK – skupna produkcija hlapnih maščobnih kislin po osmih urah inkubacije, delež propion. kisline=delež propionske kisline

Delež pojasnjene variance (R²) za količino nastale ocetne in propionske kisline, skupne količine HMK ter za deleže posameznih HMK je bil večji od 0,97, medtem ko je za količino maslene kisline znašal le 0,86. Vsi vplivi, ki smo jih uporabili v statističnem modelu (substrat, inokulum in interakcija med substratom in inokulumom), so bili statistično značilni (P<0,0001) za količino nastale ocetne in propionske kisline, za skupno količino HMK ter za deleže ocetne, propionske in maslene kisline. Vpliv substrata (P<0,0001) in interakcija med substratom in speciesom (P<0,0059) sta bila tudi za količino maslene kisline statistično značilna, medtem ko vpliv inokuluma ni bil statistično značilen (P<0,3488).

4.2 KAZALNIKI IN POTEKA FERMENTACIJE

4.2.1 Vpliv vrste inokuluma in substrata na ocenjene kazalnike *in vitro* fermentacije

Ocenjeni parametri *in vitro* produkcije, kot so skupna potencialna produkcija plina (B), specifična hitrost fermentacije (C) in faktor mikrobne (ne)učinkovitosti različnih substratov, inkubiranih v inokulumih, pripravljenih bodisi z vampovim sokom ovnov, bodisi z vsebino slepega črevesa kuncev, so prikazani v preglednici 9.

Preglednica 9: Ocenjeni kazalniki fermentacije (B, C in A) različnih substratov

Substrat	B (ml/g SS)		C		A	
	ovni	kunci	ovni	kunci	ovni	kunci
Peletirano seno	206 ^e ***	83 ^d ***	2,23 ^c **	4,41 ^c **	0,091 ^c	0,081 ^{cd}
Dehidrirana lucerna	190 ^{fe} ***	117 ^{cbd} ***	1,99 ^d ***	3,11 ^c ***	0,149 ^b **	0,096 ^{cd} **
Pšenični otrobi	259 ^d ***	164 ^b ***	2,02 ^d ***	4,57 ^c ***	0,164 ^b	0,161 ^{ba}
Ječmen	375 ^b ***	300 ^a ***	2,32 ^c ***	11,83 ^c ***	0,157 ^b **	0,191 ^a **
Koruzna	404 ^a **	317 ^a **	3,01 ^a ***	20,61 ^c ***	0,183 ^b *	0,197 ^a *
Pesni rezanci	324 ^c	288 ^a	2,62 ^b *	3,25 ^c *	0,244 ^a **	0,128 ^{bc} **
Sončnične tropine	183 ^f ***	97 ^{cd} ***	2,28 ^c ***	3,92 ^c ***	0,269 ^a ***	0,114 ^{bcd} ***
Sojine tropine	250 ^d ***	137 ^{cb} ***	2,26 ^c ***	3,11 ^c ***	0,172 ^b ***	0,071 ^d ***

B – skupna potencialna produkcija plina; C - specifična hitrost fermentacije; A - konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti; a,b,c,d, - vrednosti z različnimi malimi črkami v stolpcih znotraj vrste inokuluma (z vampovim sokom (ovni) ali iz vsebine slepega črevesa (kunci)), označujejo substrate, ki se med seboj statistično razlikujejo pri P<0,05; *, ** in *** označujejo statistično značilne razlike pri P<0,05, P<0,01 in P<0,001 med vrstama inokulumov znotraj substratov in kazalnikov fermentacije

4.2.1.1 Skupna potencialna produkcija plina

Vrednosti skupne potencialne produkcije plina (parameter B) so se gibale od 404 mg/g SS pri fermentaciji koruznega zrnja v inokulumu, pripravljenem iz vampovega soka (inkubacija v VS), do 83 mg/g SS pri fermentaciji sena v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev (inkubacija v SČ). Med substrati in vrstama inokulumov so v glavnem obstajale statistično značilne razlike. Vrednosti spremenljivke B so bile v povprečju večje pri substratih, inkubiranih v VS, kot pri substratih, inkubiranih v SČ. Največji B smo pri inkubaciji substratov v VS, ugotovili pri koruzi (404 mg/g SS), najmanjšega pa pri sončničnih tropinah (183 ml/g SS). Tudi pri inkubaciji substratov v SČ, smo ugotovili največji B pri koruzi (317 mg/g SS), najmanjšega pa pri senu (83 ml/g SS). Pri inkubaciji pesnih rezancev nismo ugotovili statistično značilne razlike (P<0,1269) v kazalniku B med obema vrstama uporabljenih inokulumov. Zelo veliko razliko v skupni potencialni produkciji plina med obema inokulumoma smo ugotovili pri fermentaciji voluminoznih in beljakovinskih krmilih. Pri senu, inkubiranem v VS, je B znašal 206 mg/g

SS, pri inkubaciji v SČ pa le 83 mg/g SS. Tudi pri inkubaciji sončničnih in sojinih tropin v VS, je bil parameter B večji (183 ml/g SS pri sončničnih in 250 ml/g SS pri sojinih tropinah), kot pri njihovi inkubaciji v SČ (97 mg/g SS pri sončničnih in 137 mg/g SS pri sojinih tropinah).

4.2.1.2 Specifična hitrost fermentacije

Vrednosti specifične hitrosti fermentacije (C) so bile od 1,99 pri inkubaciji dehidrirane lucerne v VS, pa vse do 20,61 pri inkubaciji koruze v SČ. Pri vseh substratih smo ugotovili, da je kazalnik C večji pri njihovi inkubaciji v SČ, kot pri inkubaciji v VS. Največjo razliko med vrstama inokulumov smo zabeležili pri koruzi in ječmenu, najmanjšo pa pri beljakovinskih krmilih in delno pri voluminozni krmi (preglednica 9).

4.2.1.3 Faktor mikrobne (ne)učinkovitosti

Ugotovili smo, da se vrednosti faktorjev mikrobne (ne)učinkovitosti (A) gibljejo med 0,071 pri inkubaciji sojinih tropin v SČ kuncev, in 0,269 pri inkubaciji sončničnih tropin, inkubiranih v VS. V povprečju so bile vrednosti spremenljivke A večje pri inkubaciji substratov v VS, kot pri njihovi inkubaciji v SČ (preglednica 9). Pri krmilih z veliko vsebnostjo škroba (koruza, ječmen), pa so bile vrednosti spremenljivke A večje pri inkubaciji v SČ kot pri inkubaciji v VS. Pri inkubaciji pšeničnih otrobov in sena, vrsta inokuluma ni statistično značilno vplivala na vrednosti kazalnika A.

4.2.2 Vpliv živalske vrste na izračunane parametre *in vitro* fermentacije

Izračunani parametri *in vitro* produkcije plina, kot so zakasnitev začetka fermentacije (LAG), največja hitrost fermentacije (MFR), čas, ko je hitrost fermentacije največja (TMFR) in količina plina, nastala v osmih urah inkubacije (GAS₈), so predstavljeni v preglednici 10.

Preglednica 10: Izračunani kazalniki *in vitro* produkcije plina (LAG, MFR, TMFR in GAS₈) različnih substratov

Substrat	LAG (h)		MFR (ml/h)		TMFR (h)		GAS ₈ (ml/g SS)	
	ovni	kunci	ovni	kunci	ovni	kunci	ovni	kunci
Peletirano seno	-2,2 ^d **	5,8 ^b **	6,9 ^e ***	2,5 ^d ***	8,8 ^a ***	18,4 ^a ***	70,6 ^{de} ***	8,5 ^e ***
Dehidrirana lucerna	-2,1 ^d ***	1,4 ^c ***	10,4 ^d ***	4,1 ^d ***	4,6 ^{cd} ***	11,8 ^{dc} ***	103,9 ^c ***	27,6 ^d ***
Pšenični otrobi	-1,8 ^d ***	3,2 ^c ***	15,6 ^c ***	9,7 ^c ***	4,3 ^d ***	9,5 ^d ***	150,2 ^b ***	46,4 ^c ***
Ječmen	-1,0 ^c ***	7,7 ^b ***	21,6 ^b ***	21,1 ^a ***	5,4 ^{cb} ***	12,5 ^{bc} ***	193,6 ^c ***	23,3 ^b ***
Koruzna	0,56 ^a ***	10,3 ^a ***	27,1 ^a *	23,0 ^a *	6,03 ^b ***	15,3 ^{ba} ***	200,9 ^e ***	4,6 ^b ***
Pesni rezanci	-0,15 ^b **	1,3 ^c **	29,1 ^a ***	13,3 ^b ***	3,9 ^d **	9,5 ^d **	223,6 ^a ***	88,8 ^a ***
Sončnične tropine	-0,67 ^c ***	3,2 ^c ***	18,1 ^c ***	4,1 ^d ***	3,1 ^e ***	12,0 ^{dc} ***	140,0 ^{dc} ***	20,1 ^c ***
Sojine tropine	-1,1 ^c ***	1,9 ^c ***	15,8 ^c ***	3,6 ^d ***	4,7 ^{cd} ***	16,0 ^a ***	141,0 ^c ***	23,6 ^c ***

LAG - zakasnitev začetka fermentacije; MFR - največja hitrost fermentacije; TMFR - čas, ko je hitrost fermentacije največja, GAS₈ - količina plina, nastala po osmih urah inkubacije; a,b,c,d, - vrednosti z različnimi malimi črkami v stolpcih znotraj vrste inokuluma (z vampovim sokom (ovni) ali iz vsebine slepega črevesa (kunci)), označujejo substrate, ki se med seboj statistično razlikujejo pri P<0,05; *, ** in *** označujejo statistično značilne razlike pri P<0,05, P<0,01 in P<0,001 med vrstama inokulumov znotraj substratov in kazalnikov fermentacije

4.2.2.1 Zakasnitev začetka fermentacije (LAG)

Zakasnitev začetka fermentacije (LAG) se je pri inkubaciji vseh substratov vedno statistično značilno razlikovala med vrstama inokulumov. LAG je variral od – 2,2 ur pri inkubaciji sena v VS do 10,3 ur pri koruzi, inkubirani v SČ. Pri vseh substratih je bila LAG daljša pri inkubaciji v SČ kot pri inkubaciji v VS.

4.2.2.2 Največja hitrost fermentacije (MFR)

Največjo hitrost fermentacije (MFR) v VS smo izračunali pri inkubaciji pesnih rezancev (29,1 ml/h), medtem ko je bila največja MFR pri inkubaciji v SČ izračunana za koruzo (23,0 ml/h). Najmanjšo MFR smo izračunali pri obeh vrstah inokulumov za seno, saj je bila pri njegovi inkubaciji v VS 6,9 ml/h, pri inkubaciji v SČ pa 2,5 ml/h. MFR med obema vrstama inokuluma so bile vedno statistično značilno različne, z izjemo ječmena, kjer razlike niso bile statistično značilne. Največje absolutne razlike v MFR med obema vrstama inokuluma smo izračunali pri beljakovinskih krmilih, kjer je bila MFR sojinah in

sončničnih tropin, inkubiranih v VS 15,8 in 18,1 ml/h, pri inkubaciji v SČ pa 3,6 in 4,1 ml/h.

4.2.2.3 Čas, ko je hitrost fermentacije največja (TMFR)

Čas, ko je hitrost fermentacije največja (TMFR) se je statistično značilno razlikoval med obema vrstama inokulumov. TMFR so bili vedno večji pri inkubaciji substratov v SČ kot pri inkubaciji substratov v VS. Najdaljši TMFR smo izračunali pri inkubaciji sena v obeh vrstah inokulumov (8,8 ure pri inkubaciji v VS in 18,4 ure pri inkubaciji v SČ), medtem ko smo najkrajši TMFR izračunali pri inkubaciji sončničnih tropin v VS (3,1 ure), oz. pri inkubaciji pesnih rezancev in pšeničnih otrobov v SČ (obakrat 9,5 ure).

4.2.2.4 Količina nastalega plina v osmih urah inkubacije (GAS_8)

Na prostornino plina, nastalega v osmih urah inkubacije (GAS_8), sta statistično značilno vplivala tako substrat kot vrsta inokuluma. Iz vseh substratov se je veliko več plina tvorilo ob njihovi inkubaciji v VS kot ob inkubaciji v SČ. Največjo razliko v GAS_8 med inokulumoma smo izračunali pri koruzi, saj je v inokulumu iz VS nastalo kar 200,9 ml plina/g SS, v inokulumu iz SČ pa le 4,6 ml plina/g SS. Največji GAS_8 smo pri obeh vrstah inokulumov izračunali pri inkubaciji pesnih rezancev (223,6 ml plina/g SS v inokulumu VS in 88,6 ml plina/g SS v inokulumu SČ).

4.3 HLAPNE MAŠČOBNE KISLINE

V preglednici 11 je prikazana skupna produkcija hlapnih maščobnih kislin (HMK) pri inkubaciji substratov v vampnem soku ovnov in pri inkubaciji v inokulumu slepega črevesa kuncev. Prikazani so tudi deleži posameznih analiziranih maščobnih kislin: ocetna (C2), propionska (C3) in maslena kislina (C4).

Preglednica 11: Skupna količina nastalih hlapnih maščobnih kislin in deleži očetne, propionske in maslene kisline

Substrat	HMK (mmol/g SS)		Delež očetne kisline (%)		Delež propionske kisline (%)		Delež maslene kisline (%)	
	oven	kunec	oven	kunec	oven	kunec	oven	kunec
Peletirano seno	1,83 ^c	1,61 ^{cd}	69,3 ^{bc} **	84,5 ^a **	19,9 ^{cd} **	4,2 ^b **	10,8 ^{bac}	11,3 ^d
Dehidrirana lucerna	2,70 ^{bc}	2,86 ^b	66,6 ^{dc} *	82,7 ^{ba} *	25,1 ^{bcd} *	5,1 ^b *	8,3 ^{bac}	12,2 ^{dc}
Pšenični otrobi	3,14 ^{bc} **	2,23 ^{cb} **	58,5 ^{de} **	68,8 ^c **	26,5 ^{bc} **	5,9 ^{ba} **	15,0 ^a **	25,3 ^b **
Ječmen	4,56 ^{ba} *	1,50 ^{cd} *	55,3 ^e	67,0 ^{dc}	31,4 ^{ba} **	7,3 ^{ba} **	13,3 ^{ba} **	25,7 ^{ba} **
Koruza	4,14 ^{bc^a} *	0,80 ^d *	49,7 ^e *	58,5 ^d *	38,3 ^a ***	9,0 ^a ***	12,0 ^{ba} **	32,5 ^a **
Pesni rezanci	4,63 ^{bac}	3,99 ^a	65,9 ^{dc} *	75,3 ^{bc} *	24,4 ^{bcd} ***	5,6 ^b ***	9,7 ^{bac} *	19,1 ^{bc} *
Sončnične tropine	6,75 ^a **	1,84 ^{cb} **	78,9 ^a *	69,4 ^c *	17,2 ^{cd} *	7,4 ^{ba} *	3,9 ^c *	23,2 ^b *
Sojine tropine	6,28 ^a **	1,79 ^{cb} **	78,0 ^{ba} *	70,6 ^c *	15,4 ^d ***	5,0 ^b ***	6,6 ^{bc} **	24,4 ^b **

HMK – skupna količina hlapnih maščobnih kislin (ml/g SS);

a,b,c,d, - vrednosti z različnimi malimi črkami v stolpcih znotraj vrste inokuluma (z vampovim sokom (ovni) ali iz vsebine slepega črevesa (kunci)), označujejo substrate, ki se med seboj statistično razlikujejo pri $P < 0,05$;

*, ** in *** označujejo statistično značilne razlike pri $P < 0,05$, $P < 0,01$ in $P < 0,001$ med vrstama inokulumov znotraj substratov in kazalnikov fermentacije

Če primerjamo skupno produkcijo hlapnih maščobnih kislin (HMK) po 8. urah inkubacije, je bila ta na splošno vedno večja pri inkubaciji substratov v VS, kot pri inkubaciji v SČ. Pri inkubaciji pesnih rezancev, peletiranega sena in dehidrirane lucerne pa razlike med inokulumoma niso bile statistično značilne. Veliko razliko v produkciji HMK med obema vrstama inokulumov smo opazili pri inkubaciji sončničnih in sojinih tropin (6,75 in 6,28 mmol/g SS v inokulumu iz VS ter 1,84 in 1,79 mmol/g SS v inokulumu iz SČ) ter pri inkubaciji koruze in ječmena (4,14 in 4,56 mmol/g SS pri inkubaciji v VS, ter 0,8 in 1,5 mmol/g SS pri inkubaciji v SČ).

Največjo skupno produkcijo HMK smo pri inkubaciji v VS izmerili pri sončničnih tropinah (6,75 mmol/g SS), najmanjšo pa pri lucerni (2,70 mmol/g SS). Pri substratih, inkubiranih v SČ, smo največjo vsebnost HMK po 8. urah inkubacije izmerili pri pesnih rezancih (3,99 mmol/g SS), najmanjšo pa pri koruzi (0,80 mmol/g SS).

V povprečju je večji delež očetne kisline od skupne produkcije HMK nastal pri inkubaciji substratov v SČ, kot v inokulumu iz VS. Izjeme so bile sojine in sončnične tropine, pri katerih je bil delež očetne kisline večji pri inkubaciji v VS, kot pri inkubaciji v SČ. Največje razlike smo opazili pri inkubaciji lucerne. Delež očetne kisline pri lucerni inkubirani v SČ je znašal kar 82,8 %, medtem ko je pri inkubaciji v VS znašal le 66,3 %. V primeru ostalih substratov je bila razlika v deležu očetne kisline med obema vrstama inokuluma okrog 10 %, ali razlika ni bila statistično značilna, kot je to bilo v primeru inkubacije ječmena (preglednica 11).

Na delež nastale očetne kisline je vplivala tudi vrsta substrata. Pri inkubaciji v VS smo opazili najmanjši delež nastale očetne kisline pri inkubaciji koruze (49,7 %), majhen pa je bil tudi pri inkubaciji ječmena (55,6 %) in pšeničnih otrobov (58,5 %). Pri inkubaciji sončničnih tropin in sojinih tropin v VS, je bil delež očetne kisline največji (78,9 % in 78 %). Največja deleža očetne kisline pri inkubaciji v SČ kuncev smo opazili pri inkubaciji sena (84,5 %) in lucerne (82,8 %), najnižjega pa prav tako ob inkubaciji koruze (58,6 %). Absolutne vrednosti očetne kisline pri inkubaciji v VS so se gibale od 1,27 mmol/g SS (seno) do 5,32 mmol/g SS (sončnične tropine), pri inkubaciji v SČ pa od 0,48 mmol/g SS (koruza) do 3,01 mmol/g SS (pesni rezanci). Vrednost očetne kisline se je med obema inokuluma močno razlikovale ($P < 0,007$) v primeru inkubacije sončničnih tropin (VS 5,32 mmol/g SS, SČ 1,28 mmol/g SS) in sojinih tropin (VS 4,90 mmol/g SS, SČ 1,26 mmol/g SS), v primeru inkubacije lucerne, sena in pesnih rezancev, pa razlike niso bile statistično značilne.

Delež propionske kisline je bil za vse substrate statistično značilno večji pri inkubaciji v VS. Največji razliki smo opazili ob inkubaciji koruze, kjer je, ob inkubaciji v VS, delež propionske kisline znašal 38,3%, pri inkubaciji v SČ pa le 9 % in ječmena (inkubacija v VS 31,2% in inkubacija v SČ 7,3%). Najmanjšo razliko med obema živalskima vrstama, kar se propionske kisline tiče, smo opazili ob inkubaciji sončničnih tropin (inkubacija v VS 17,0% in inkubacija v SČ 7,4%) in sojinih tropin (inkubacija v VS 15,5% in inkubacija v SČ 5%). Absolutna vrednost propionske kisline pri inkubaciji v VS se je gibala od 0,37 mmol/g SS (seno) do 1,59 mmol/g SS (koruza), pri inkubaciji v SČ pa od 0,07 mmol/g SS (seno) do 0,14 mmol/g SS (lucerna in sončnične tropine). Vrednosti propionske kisline so

se med obema inokuluma močno razlikovale ($P < 0,05$), razen v primeru inkubacije peletiranega sena in dehidrirane lucerne, kjer razlike niso bile statistično značilne.

V vseh primerih je višji delež maslene kisline nastal ob inkubaciji substratov v SČ, ali pa razlika ni bila statistično značilna (dehidrirana lucerna in peletirano seno). Posebej izrazita razlika med obema živalskima vrstama je bila v primeru inkubacije sončničnih tropin (inkubacija v VS 4,1 % in inkubacija v SČ 32,2 %), koruze (inkubacija v VS 12 % in inkubacija v SČ 32,4 %) in sojinih tropin (inkubacija v VS 6,6 % in inkubacija v SČ 24,5 %). Zelo majhna razlika pa se je pojavila ob inkubaciji sena (inkubacija v VS 10,8 % in inkubacija v SČ 11,2 %) in lucerne (inkubacija v VS 8,1% in inkubacija v SČ 12,2 %). Absolutne vrednosti maslene kisline pri inkubaciji v VS so se gibale od 0,2 mmol/g SS (seno) do 0,60 mmol/g SS (ječmen), pri inkubaciji v SČ pa od 0,18 mmol/g SS (seno) do 0,76 mmol/g SS (pesni rezanci). Razlike v absolutnih vrednostih maslene kisline med obema inokulumoma za večino krmil niso bile statistično značilne (ječmen, kuruza, seno, sojine tropine in sončnične tropine).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Pri fermentaciji hranljivih snovi, bodisi v predželodcih, ali v slepem črevesu, nastajajo hlapne maščobne kisline (ocetna, propionska in maslena kislina), plini (večinoma ogljikov dioksid in metan) ter mikrobnna biomasa. Kazalniki, ki jih dobimo ob meritvah *in vitro* produkcije plina, so zato pomembni za ugotavljanje dinamike in obsega razgradnje topnih in netopnih hranljivih snovi krme v različnih delih prebavil (Getachew in sod., 1998).

5.1.1 Razlike v *in vitro* fermentaciji hranljivih snovi med prežvekovalci in kunci

Krma za živali se med seboj razlikuje po lastnostih in kemijski sestavi. Zato se potek njihove fermentacije v prebavilih razlikuje. Nastanek plina je v glavnem rezultat pretvorbe ogljikovih hidratov v ocetno, propionsko in masleno kislino, pri fermentaciji beljakovin pa v primerjavi z ogljikovimi hidrati nastane zelo malo plina (Wolin, 1960; Cone in van Gelder, 1999). To smo potrdili tudi z našimi rezultati, saj je bila potencialna produkcija plina največje pri močnih krmilih, najmanjša pa pri beljakovinskih krmilih. Pri tem so izstopale sojine tropine, ki so imele večjo skupno potencialno produkcijo plina kot sončnične tropine, seno in lucerna, kar je verjetno posledica manjše vsebnosti vlaknine (hemiceluloze, celuloze in lignina) in nekoliko večje vsebnosti v vodi topnih ogljikovih hidratov (NVOH: škrob, sladkorji, pektini...).

Krmila, ki vsebujejo večji delež HPRV (npr. škrob) na splošno v prebavilih obsežneje in hitreje fermentirajo, kot krmila z veliko vsebnostjo PIPRV (npr. celuloza). Hitrost in obseg razgradnje škroba se razlikuje med vrstami žit (McAllister in Cheng, 1996). Na splošno pšenica in ječmen v predželodcih hitreje fermentirata kot kuzuza (Nordin in Campling, 1976). Endosperm koruznega zrna je obdan z zelo odpornim beljakovinskim matriksom, ki ga lahko predrejo le nekatere glive (McAllister in sod., 1990). V našem poskusu je bila skupna potencialna produkcija plina pri inkubaciji kuzuze, tako v inokulumu vsebine vampa, kot v inokulumu iz vsebine slepega črevesa kunca, večja kot pri inkubaciji ječmena in pšenice, zakasnitev začetka fermentacije pa daljša. Prav tako je pri inkubaciji kuzuze preteklo več časa do trenutka, ko je bila hitrost fermentacije največja, kar je v skladu z ugotovitvami McAllister in sod. (1990). Manjšo skupno potencialno produkcijo plina,

manjšo največjo hitrost fermentacije ter daljši čas, do nastopa največje hitrosti fermentacije pri senu in lucerni povezujemo z večjo vsebnostjo PIPRV (predvsem celuloze in lignina).

Kemična sestava krme vpliva tudi na razmerje s fermentacijo nastalih hlapnih maščobnih kislin, tako v predželodcih, kot v slepem črevesu. Večja vsebnost HPRV v krmi povečuje tvorbo propionske kisline in zmanjšuje sintezo očetne kisline (Rymer in Givens, 2002). Naši rezultati se s to ugotovitvijo ujemajo, saj smo pri inkubaciji zrnja koruze in ječmena v obeh uporabljenih inokulumah ugotovili večji delež propionske in manjši delež očetne kisline, kot jih je izračunal Wolin (1960); 65 % očetne, 20 % propionske in 15 % maslene kisline. Nasprotno pa pri fermentaciji voluminozne krme v predželodcih nastaja več očetne in manj propionske kisline od teoretično izračunanih (Wolin, 1960), kar so potrdili tudi naši rezultati. Te ugotovitve se skladajo z ugotovitvami McDonald in sod. (2002), ki navajajo, da fermentacija s škrobom bogatih krmil v predželodcih vodi v tvorbo propionske kisline, medtem ko fermentacija voluminozne krme vodi v tvorbo očetne kisline.

5.1.2 Vpliv vrste inokuluma na *in vitro* fermentacijo

Med obema živalskima vrstama (ovca in kunec) obstajajo razlike v vzorcu fermentacije, ki so posledica razlik v zgradbi prebavil, mestu poteka fermentacije, času zadrževanja krme v prebavilih in razlik v sestavi mikroorganizmov. Pomembna razlika med obema živalskima vrstama je tudi ta, da v predželodce pride vsa krma popolnoma nerazgrajena, pred vstopom v slepo črevo pa se škrob, sladkorji, beljakovine in nekatere maščobe v krmi skoraj v celoti prebavijo.

Fermentacija v slepem črevesu kunca je manj obsežna kot v predželodcih ovce. Skupna produkcija plina iz vseh substratov inkubiranih v SČ, kot je razvidno iz naših podatkov, je manjša od skupne produkcije plina v inokulumu iz VS. Prav tako je bila ob uporabi inokuluma iz SČ, občutno manjša tudi produkcija hlapnih maščobnih kislin. Razloge za to gre verjetno iskati v drugačni sestavi mikroorganizmov, ki se nahajajo v slepem črevesu kunca v primerjavi z mikroorganizmi v predželodcih ovce, kar je posledica dejstva, da do slepega črevesa pridejo nerazgrajene le določene hranljive snovi.

Še očitnejša razlika med obema živalskima vrstama je v količini nastalega plina po osmih urah *in vitro* inkubacije, saj je pri inkubaciji substratov v SČ, nastalo do desetkrat manj plina, kot pri inkubaciji v VS. Poleg tega je pri inkubaciji v SČ kasneje nastopil trenutek, ko je bila fermentacija najhitrejša (TMFR), saj je bil TMFR le pri inkubaciji pesnih rezancev in pšeničnih otrobov krajši od 10 ur, kolikor znaša povprečen čas zadrževanja krme v slepem črevesu (Gidenne in sod.; 2002, Lavrenčič, 2007a). To pomeni, da so le pesni rezanci in pšenični otrobi lahko v večjem obsegu fermentirani *in vivo*. To se lahko dogodi tudi zato, ker je največja hitrost fermentacije obeh omenjenih substratov razmeroma velika. Pektini in hemiceluloze, ki jih je v pesnih rezancih in pšeničnih otrobih relativno veliko, so pomembne sestavine krme za kunce in hkrati pomemben substrat za črevesne mikroorganizme (Gidenne in Bellier, 2002). To potrjujejo tudi naši rezultati (preglednica 2), saj je kemijska analiza pšeničnih otrobov pokazala visoko vsebnost hemiceluloz (predvidoma ksilanov), pesni rezanci pa vsebujejo poleg hemiceluloz še dokaj veliko NVOH, ki jih sestavljajo predvsem pektinske snovi in topni sladkorji. Tako pektini kot hemiceluloze pa so snovi, ki pridejo v slepo črevo praktično nerazgrajene.

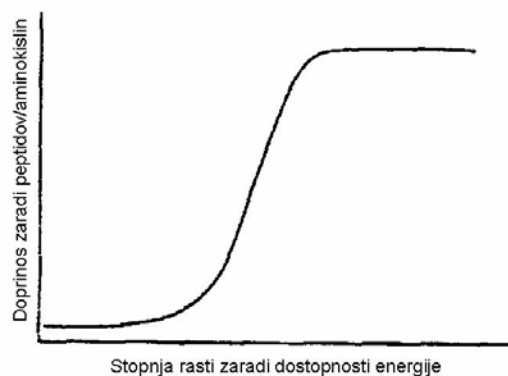
Največjo MFR pri *in vitro* inkubaciji v SČ, sta imela kuruza in ječmen, katerih glavna sestavina je škrob, vendar je bil pri obeh substratih TMFR daljši od 10 ur. Prav tako sta imela oba substrata dolg časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG), zaradi tega menimo, da škrob nima pomembnega vpliva na potek fermentacije v slepem črevesu kuncev, kar je ugotovil tudi Lavrenčič (2007a), ki je pri inkubaciji čistega krompirjevega škroba v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev, ugotovil, da sta LAG in TMFR veliko predolga, da bi škrob lahko imel pomembno vlogo pri *in vivo* fermentaciji v slepem črevesu kuncev. Tudi Giddene in Bellier (2000) ugotavljata, da škrob ne more pomembno značilno vplivati na aktivnost mikroorganizmov v slepem črevesu, saj se večina škroba razgradi in absorbira že v tankem črevesu, tako da le majhna količina pride v slepo črevo.

Pri prežvekovalcih je potek *in vitro* fermentacije s škrobom bogatih krmil precej drugačen, saj sta TMFR in LAG zelo kratka, daljši pa je čas zadrževanja krmil v predželodcih (Lavrenčič in Stefanon, 2001). Škrob je zato pomemben substrat za vampove mikroorganizme in povečuje obseg fermentacije v predželodcih. Zaradi hitre in obsežne

fermentacije v predželodcih pride tam do kopičenja HMK in posledično znižanja pH (Rymer in Givens, 2002). Nižji pH (nižji od 5,2) zavira rast in aktivnost celulolitičnih bakterij. Če se ob znižanem pH namnožijo mlečnokislinske bakterije, v predželodcih prevlada nefiziološko nizka vrednost pH, začnejo pa se kopičiti mlečna kislina in drugi toksični presnovki, kar povzročajo akutno acidozo in obolenja parkljev (Slyter, 1976).

Gidenne (1997) poroča, da je fibrolitična aktivnost mikroorganizmov slepega črevesa v primerjavi s tistimi v predželodcih manjša. Celulolitična aktivnost je pri kuncih do 15 krat manjša kot pektinolitična (Bennegadi-Laurent in sod, 2004). Inhibitorno učinkovanje lignina na fermentacijo v predželodcih je dobro proučeno. Tudi pri kuncih lignin zmanjša razgradnjo vlaknine in skrajšuje čas zadrževanja substrata v slepem črevesu (Gidenne, 1997). To potrjujejo tudi naši rezultati, saj je bila največja hitrost fermentacije (MFR) sena in lucerne zelo majhna, majhna pa je bila tudi količina plina, ki je nastala v prvih osmih urah inkubacije. Pri inkubaciji sena je bila relativno majhna tudi produkcija hlapnih maščobnih kislin (HMK), medtem ko je bila produkcija HMK pri inkubaciji lucerne relativno velika v primerjavi z ostalimi substrati, kar bi lahko pripisali veliki vsebnosti NVOH (pektinov in drugih sladkorjev). Poleg majhne celulolitične aktivnosti mikroorganizmov v slepem črevesu, na obseg fermentacije vpliva tudi čas zadrževanja krme v slepem črevesu, ki je v povprečju krajši od 10. ur (Gidenne in Bellier, 2000). TMFR v našem poskusu so bili pri fermentaciji sena in lucerne v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa, daljši od 10. ur, pri senu celo daljši od 18. ur (preglednica 10). PIPRV v prehrani kuncev torej ne vpliva na fermentacijo v slepem črevesu in ima večjo vlogo pri skrajševanju časa zadrževanja krme v celotnem prebavnem traktu in zmanjšanju razgradljivosti drugih hranljivih snovi v slepem črevesu, s tem pa prispeva k zmanjšanju prebavnih motenj pri kuncih (Gidenne, 2003).

Na splošno velja, da v predželodcih razgradljive beljakovine stimulirajo fermentacijo, vendar le v primeru, če je istočasno na voljo dovolj energije (slika 3) (Chikunya in sod., 1996). Naši rezultati to potrjujejo, saj so pokazali zelo veliko (največjo) produkcijo HMK ob inkubaciji obeh beljakovinskih krmil v inokulumu, pripravljenem iz vampovega soka, prav tako pa tudi veliko MFR. Omenjeni krmili poleg velikega deleža beljakovin vsebujejo tudi veliko hemiceluloz, pektinov in sladkorjev, ki so vir energije za mikroorganizme.



Slika 3: Učinek razgradljivih beljakovin na fermentacijo v predželodcih (Chikunya in sod., 1996)

Učinkovitost fermentacije beljakovinskih krmil v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev, je majhna in je podobna kot pri senu in ječmenu. Večina beljakovin krme za mikroorganizme v slepem črevesu ni dostopnih, saj se jih večina prebavi že pred vstopom v slepo črevo. Kljub temu pa Emaldi in sod. (1979, cit. po Gidenne, 1997) poročajo o proteolitični aktivnosti mikroorganizmov v slepem črevesu kuncev. Gidenne (1997) poroča o nekoliko večji produkciji HMK ob povečani vsebnosti beljakovin v krmi. Presežek beljakovin lahko tudi favorizira proliferacijo klostridijev in rahlo poveča število *E. coli* (Cortez in sod., 1992, cit. po Gidenne, 1997).

Profil HMK v slepem črevesu kuncev je specifičen. Pri tem prevladuje očetna kislina (60 do 80 %), sledi maslena (8 do 20%), najmanj pa je propionske (3 do 10%). Razmerja se zelo razlikujejo od razmerij, opaženih pri fermentaciji v predželodcih, kjer je delež propionske kisline večji kot delež maslene kisline. Adjiri in sod. (1992, cit. po Gidenne, 1997) so ugotovili tudi, da je takšen profil HMK pri kuncih vezan na specifično sestavo cecalne mikroflore, kjer prevladuje rod *Bacteroides*, ne pa na vrsto fermentabilnega substrata. Vendar maslena kislina ni glavni produkt rodu *Bacteroides*, ampak rodu *Fusobacterium* (Holdenman in sod., 1984, cit. po Bennegadi-Laurent in sod., 2004). Naši rezultati podpirajo trditev, da med HMK prevladuje očetna kislina, ki ji sledi maslena kislina, tej pa propionska kislina. Ne podpirajo pa tudi trditev Adjiri in sod. (1992, cit. po Gidenne, 1997), da na profil HMK vrsta substrata ne vpliva. Tudi Vernay in Raynaud (1975), cit. po Gidenne, 1997; Gidenne in Bellier (1992), cit. po Gidenne, 1997; Piattoni in sod. (1997), cit. po Gidenne, 1997 ugotavljajo, da je aktivnost cecalnih mikroorganizmov pri kuncu tesno povezana z oskrbo s hranljivimi snovmi.

5.2 SKLEPI

Pomembna razlika v *in vitro* fermentaciji med obema živalskima vrstama je, da v predželodce pride krma popolnoma nerazgrajena in so vse hranljive snovi podvržene razgradnji v ampovih mikroorganizmov, medtem ko v slepo črevo pridejo le hranljive snovi, ki se v želodcu in tankem črevesu niso prebavile, to pa je predvsem vlaknina (pektini, hemiceluloze, celuloza in lignin).

Potencialna produkcija plina (B) je bila za vsa krmila večja pri inkubaciji substratov v VS kot pri inkubaciji v SČ. Pri obeh živalskih vrstah je bila največja potencialna produkcija plina ob fermentaciji koruze in ječmena, najmanjša pa ob fermentaciji beljakovinskih krmil. Tudi največja hitrost fermentacije (MFR) je bila večja ob inkubaciji substratov v VS, kot ob inkubaciji v SČ. Od krmil sta za obe živalski vrsti imeli največjo MFR ječmen in koruza, najmanjšo pa seno in obe beljakovinski krmili. Čas, ko je bila hitrost fermentacija (TMFR) največja je bil pri inkubaciji v VS za vsa krmila krajši kot pri inkubaciji v SČ. Najdaljši TMFR je bil pri obeh živalskih vrstah pri fermentaciji sena, najkrajši pa pri pesnih rezancih in pšeničnih otrobih. Le pri teh dveh krmilih je bil TMFR pri inkubaciji v SČ dovolj kratek, da bi ti krmili lahko fermentirali *in vivo*.

Učinkovitost mikroorganizmov slepega črevesa za fermentacijo je manjša od učinkovitosti v ampovih mikroorganizmov. Fibrolitična aktivnost mikroorganizmov v slepem črevesu je manjša kot v predželodcih. V slepem črevesu kunca so najučinkovitejši pektinolitični in ksilanolitični mikroorganizmi. V predželodcih ovnov so, poleg pektinolitičnih in ksilanolitičnih, zelo učinkoviti tudi celulozolitni mikroorganizmi.

Produkcija HMK je v inokulumu SČ manjša kot v VS. Produkcija HMK je pri kuncih največja pri fermentaciji krmil z veliko vsebnostjo pektina in/ali hemiceluloz (pesni rezanci in pšenični otrobi), najmanjša pa pri fermentaciji škrobnih krmil in sena. Pri ovnih je največja količina HMK nastala pri fermentaciji beljakovinskih krmil (sojine in sončničnične tropine), najmanjša pa pri voluminoznih krmilih (seno in lucerna). Med obema uporabljenima inokulumoma smo opazili tudi razlike v razmerjih med posameznimi, s fermentacijo nastalimi, HMK. Pri inkubaciji substratov v VS je značilen vzorec produkcije HMK: acetat > propionat > butirat, pri inkubaciji v SČ pa: acetat >

butirat > propionat. Na razmerja med omenjenimi HMK pri obeh inokulacijah vpliva tudi krma. Fermentacija škrobnih krmil producira predvsem propionsko kislino, medtem ko fermentacija voluminoznih krmil producira očetno kislino. Razmeroma velik delež očetne kisline smo opazili tudi ob fermentaciji beljakovinskih krmil.

6 POVZETEK

Posebnost prebave pri prežvekovalcih je razgradnja hranljivih snovi v predželodcih. Krma pride vanj prežvečena in prepojena s slino, tako da so vse hranljive snovi dostopne simbiotskim mikroorganizmom za razgradnjo in fermentacijo. Do mesta, kjer poteka fermentacija pri kuncih, pridejo le hranljive snovi, ki se v želodcu in tankem črevesu niso uspele prebaviti. Razlika med obema živalskima vrstama je tudi v sestavi mikrobne populacije v omenjenih delih prebavil ter v mikrobni učinkovitosti za razgradnjo določenih snovi. Pri fermentaciji hranljivih snovi, tako v predželodcih kot v slepem črevesu, nastajajo plini (ogljikov dioksid in metan) ter hlapne maščobne kisline (ocetna, propionska in maslena kislina). *In vitro* produkcija plina je metoda, s katero lahko prikažemo, kakšen je potek fermentacije krme v predželodcih, lahko pa jo uporabimo tudi za ugotavljanje poteka fermentacije v slepem črevesu drugih živalskih vrst, na primer v slepem črevesu kuncev (Marounek in sod., 2000; Calabro in sod., 1999; Kermauner in Lavrenčič, 2005; Lavrenčič 2007a).

Namen naše naloge je bil ugotoviti, kakšne so razlike v kazalnikih fermentacije različnih skupin krmil pri dveh vrstah rastlinojedih živali (ovce in kunci). Zanimale so nas razlike v fermentaciji energijskih močnih krmil (koruza, pšenični otrobi, ječmen in pesni rezanci), voluminoznih (dehidrirana lucerna in peletirano seno) in beljakovinskih močnih krmil (sončnične in sojine tropine). Želeli smo ugotoviti tudi, kakšna je razlika med temi krmili in med živalskima vrstama v produkciji hlapnih maščobnih kislin.

In vitro fermentacijo substratov smo izvedli z metodo po Menke in Steingass (1988) (Hohenheimski plinski test). Zgoraj naštetih substratov smo inkubirali 96 ur v inokulumu, pripravljenem iz vampovega soka ovnov in v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev. Po osmih urah inkubacije smo odvzeli še vzorce substratov in inokulmov za analizo hlapnih maščobnih kislin, ki smo jih določili s plinskim kromatografom. Meritve nastalega plina smo opravljali prvi dan vsaki dve uri, drugi dan vsakih 12 ur in nato na vsakih 24 ur. Zbrane podatke smo nato korigirali glede na produkcijo plina in vsebnosti suhe snovi v substratih. S tako korigiranimi podatki smo s pomočjo Gompertzovega modela ocenili kazalnike fermentacije, ki so skupna potencialna produkcija plina (B), specifična hitrost fermentacije (C) in faktor mikrobne

(ne)učinkovitosti (A). S temi kazalniki smo izračunali še druge kazalnike fermentacije, ki so največja hitrost fermentacije (MFR), čas, ko je bila hitrost fermentacije največja (TMFR), zakasnitev začetka fermentacije (LAG) in količino nastalega plina v osmih urah inkubacije (GAS_8). V vzorcih substratov in inokulumov odvzetih po 8. urah inkubacije smo določili tudi vsebnosti očetne, propionske in maslene kisline.

Na ocenjene in izračunane kazalnike fermentacije so statistično značilno vplivali tako vrsta substrata ($P < 0,0001$) in vrsta inokuluma ($P < 0,0001$) kot interakcija med substratom in vrsto inokuluma ($P < 0,0001$). Tudi na skupno količino hlapnih maščobnih kislin, na količino nastale očetne in propionske kisline so statistično značilno vplivali vrsta substrata ($P < 0,0001$), vrsta inokuluma ($P < 0,0001$) in interakcija med substratom in vrsto inokuluma ($P < 0,0001$). Na količino nastale maslene kisline sta statistično značilno vplivala le vrsta substrata ($P < 0,0001$) in interakcija med vrsto substrata in vrsto inokuluma ($P < 0,0059$), vpliv vrste inokuluma pa je bil statistično neznačilen ($P < 0,3488$).

Skupna produkcija plina (B) je bila za vse uporabljene substrate večja v primeru inkubacije v VS. Pri obeh vrstah inokulumov je bila skupna produkcija plina največja pri inkubaciji škrobnih krmil, tj. koruze (VS 404 ml/g SS, SČ 317 ml/g SS) in ječmena (VS 375 ml/g SS, SČ 300 ml/g SS), najmanjši pa pri inkubaciji v VS ob inkubaciji sončničnih tropin (183 ml/g SS), pri inkubaciji v SČ pa ob inkubaciji sena (83 ml/g SS). Specifična hitrost fermentacije (C) je bila pri vseh substratih večja pri inkubaciji v SČ. Razpon vrednosti kazalnika C je bil pri substratih inkubiranih v SČ (od 3,11 pri lucerni do 20,61 pri koruzi), veliko večji kot pri substratih inkubiranih v VS (od 1,99 pri lucerni do 3,01 pri koruzi). Vrednosti konstantnega faktorja mikrobne (ne)učinkovitosti (A) so se gibale od 0,071 do 0,269. Vrednosti kazalnika A so bile statistično značilno večje pri inkubaciji substratov v VS, kot v SČ, razen pri inkubaciji ječmena in koruze, kjer je bil kazalnik A ocenjen z inkubacijo teh dveh substratov, v inokulumu iz SČ (0,197 pri koruzi in 0,191 pri ječmenu) večji kot v inokulumu iz VS (0,157 pri ječmenu in 0,183 pri koruzi).

Zaostanek začetka fermentacije (LAG) je bil pri vseh krmilih daljši pri inkubaciji substratov v SČ v primerjavi z inkubacijo v VS. Pri inkubaciji v VS so bile vse vrednosti LAG negativne, razen pri koruzi (0,56 h). Najdaljšo zakasnitev smo izračunali pri inkubaciji koruze v SČ (10,3 h). Kratke LAG smo izračunali pri inkubaciji pesnih rezancev

(1,3 h), lucerne (1,4 h) in soje (1,9 h) v SČ. Največjo hitrost fermentacije (MFR) smo izračunali pri obeh vrstah inokuluma pri inkubacije koruze (VS 27,1 ml/h, SČ 23,0 ml/h) in ječmena (VS 21,6 ml/h, SČ 21,1ml/h), najmanjše pa v primeru inkubacije sena (VS 6,9 ml/h, SČ 2,5 ml/h). MFR je bil v primeru inkubacije vseh krmil večji pri inkubaciji v VS, kot v SČ. Čas, v katerem je bila dosežena največja hitrost fermentacije (TMFR), je bil v primeru vseh krmil krajši ob inkubaciji substratov v VS. Najdaljši TMFR pri inkubaciji v VS je bil izračunan za inkubacijo sena (8,8 h), dolg je bil tudi pri inkubaciji koruze (6,03 h) kratek pa pri inkubaciji sončničnih tropin (3,1 h). Najdaljši TMFR smo izračunali pri inkubaciji substratov v SČ; pri inkubaciji sena je bil TMFR dolg 18,4 h, pri sojinih tropinah pa 16,0 h. Najkrajši TMFR v SČ smo izračunali pri inkubaciji pesnih rezancev in pšeničnih otrobov (9,5 h). Prostornina plina, nastala po osmih urah inkubacije (GAS_8), je bila pri vseh krmilih občutno večja pri inkubaciji v VS kot pri inkubaciji v SČ. Pri inkubaciji substratov v VS je v osmih urah nastalo največ plina iz pesnih rezancev (223,6 ml/g SS) in koruze (200,9 ml/g SS), najmanj pa iz sena (70,6 ml/g SS) in beljakovinskih krmil (140 ml/g SS). Pri inkubaciji v SČ je po osmih urah nastalo največ plina ob inkubaciji pesnih rezancev 88 ml/gSS) in pšeničnih otrobov (46,4 ml/g SS), najmanj pa ob inkubaciji koruze (4,6 ml/g SS) in sena (8,5 ml/g SS).

Skupna količina hlapnih maščobnih kislin (HMK), je bila večja ob inkubaciji krmil v VS v primerjavi z inkubacijo v SČ, ali pa razlika ni bila statistično značilna (lucerna, pesni rezanci in seno). Največje razlike med obema vrstama so se pojavile pri inkubaciji sončničnih tropin (VS 6,75 mmol/g SS, SČ 1,84 mmol/g SS), sojinih tropin (VS 6,28 mmol/g SS, SČ 1,79 mmol/g SS) in koruze (VS 4,14 mmol/g SS, SČ 0,8 mmol/g SS). V povprečju je večji delež očetne kisline od skupne koncentracije HMK nastal pri inkubaciji krmil v SČ v primerjavi z inkubacijo v VS, razen v primeru inkubacije sojinih tropin (VS 77,9%, SČ 70,5%) in sončničnih tropin (VS 78,9 %, SČ 69,4%). Delež propionske kisline je bil za vsa krmila občutno večji ob inkubaciji v VS. Delež maslene kisline je bil za vsa krmila večji ob inkubaciji v SČ.

7 VIRI

- Baldwin R.L. 1999. The proliferative actions of insulin, insulin-like growth factor-I, epidermal growth factor, butyrate and propionate on ruminal epithelial cells in vitro. *Small Ruminant Research*, 32: 261-268
- Bellier R., Gidenne T., Vernay M., Colin M. 1995. In vivo study of circadian variations of the caecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Science*, 73: 128-135
- Bennegadi N., Fonty G., Millet L., Gidenne T., Licois D. 2003. Effects of Age and Dietary Fibre Level on Caecal Microbial Communities of Conventional and Specific Pathogen-Free Rabbits. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 5: 23-32
- Bennegadi-Laurent N., Gidenne T., Licois D. 2004. Nutritional and sanitary statuses alter postweaning development of caecal microbial activity in the rabbit. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 139: 293-300
- Bidlack J.E., Buxton D.R. 1992. Content and deposition rates of cellulose, hemicellulose and lignin during regrowth of forage grasses and legumes. *Canadian Journal of Plant Science*, 72: 809-818
- Blas E., Cervera C., Fernandez-Carmona J. 1994. Effect of two diets with varied starch and fibre levels on the performances of 4-7 weeks old rabbits. *World Rabbit Science*, 2, 4: 117-121
- Blümmel M., Givens D.I., Moss A.R. 2005. Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an *in vitro* gas procedure. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124: 379-390

- Calabrò S., Ninzza A., Pinna W., Cutrignelli M.I., Piccolo V. 1999. Estimation of digestibility of compound diets for rabbits using the *in vitro* gas production technique. *World Rabbit Science*, 7, 4: 197-201
- Chikunya S., Newbold C.J., Rode L., Chen X.B., Wallace R.J. 1996. Influence of dietary rumen-degradable protein on bacterial growth in the rumen of sheep receiving different energy sources. *Animal Feed Science and Technology*, 63: 333-340
- Cone J.W., Van Gelder A.H. 1999. Influence of protein fermentation on gas production profiles, *Animal Feed Science and Technology*, 76: 251-264
- Demeyer D., De Graeve K. 1991. Differences in stoichiometry between rumen and hindgut fermentation. *Advanced Animal Physiology and Animal Nutrition*, 22, 50-61
- Doreau M. in Ferlay A. 1995. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in rumen: a review. *Livestock Production Science*, 43: 97-110
- Edwards C. 1993. Interactions between nutrition and the intestinal microflora. *Proceedings of the Nutrition Society*, 52: 375-382
- Fonty G., Chavarod M., Lepetid J., Canistro J., Favier R. 1999. Mechanical resistance of wheat straw after incubation in cultures of ruminal cellulolytic microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 80: 297-307
- Fukuda K. 1999. Induction of tissue transglutaminase expression by propionate and n-butyrate in colon cancer cell lines. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10: 397-404
- Getachew G., Blümmel M., Makkar H.P.S., Becker K. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72: 261-281

- Gidenne T., Perez J.M. 1993. Effect of dietary starch origin on digestion in rabbit: 2. Starch hydrolysis in the small intestine, cell wall degradation and rate of passage measurements. *Animal Feed Science and Technology*, 43: 249-257
- Gidenne T. 1997. Caeco-colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors and related disturbances. *Livestock Production Science*, 51: 73-88
- Gidenne T., Bellier R. 2000. Use of digestible fibre in replacement to available carbohydrates. Effect on digestion, rate of passage and caecal fermentation pattern during the growth of the rabbit. *Livestock Production Science*, 63: 141-152
- Gidenne T., Jehl N., Segura M., Michalet-Doreau B. 2002. Microbial activity in the caecum of the rabbit around weaning: Impact of a dietary fiber deficiency and of intake level. *Animal Feed Science and Technology*, 99: 107-118
- Giddene T. 2003. Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science*, 81: 105-117
- Gidenne T., Mirabito L., Jehl N., Perez J.-M., Arveux P., Bourdillon A., Briens C., Duperray J., Corrent E. 2004. Impact of replacing starch by digestible fibre, at two levels of lignocellulose, on digestion, growth and digestive health of the rabbit. *Animal Science*, 78: 389-398
- Gutiérrez I., Espinosa A., Garcia J., Caratano R., De Blas J.C. 2002. Effect of starch and protein sources, heat processing and endogenous enzymes in starter diets for early weaned rabbits. *Animal Feed Science and Technology*, 98:175-186
- Holdeman L.V., Cato E.P., Moore W.E.C. 1977. *Anaerobe laboratory manual*, 4th edition, Virginia, Blacksburg, VPI
- Jehl N., Gidenne T. 1996. Replacement of starch by digestible fibre in feed for the growing rabbit. 2. Consequences for microbial activity in the caecum and on incidence of digestive disorders. *Animal Feed Science Technology*, 61: 193-204

- Keady T.W.J. in Mayne C.S. 2001. The effect of the concentrate energy source on feed intake and rumen fermentation parameters of dairy cows offered a range of grass silages. *Animal Feed Science and Technology*, 90: 117-129
- Kermauner A., Lavrenčič A. 2005. The effect of rabbit's age on *in vitro* fermentation of starch, compound feed and its fibre. *Krmiva*, 47: 303-309
- Krause O.D., Denman S.E., Mackie R.I., Morrison M., Rae A.L., Attwood G.T., McSweeney C.S. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 663-693
- Lavrenčič A. in Stefanon B. 2001. Prediction of *in situ* degradability of dry matter and neutral detergent fibre of temperate forages with *in vitro* gas production and fibre fractions. *Zootecnica e Nutrizione Animale*, 27: 179-192
- Lavrenčič A. 2007a. The effect of rabbit age on *in vitro* caecal fermentation of starch, pectin, xylan, cellulose, compound feed and its fibre. *Animal*, 1: 241-248
- Lavrenčič A. 2007b. Comparison of *in vitro* fermentation of different pectins in inoculums prepared from caecotrophs and from the caecum content of rabbits. V: 15. Internationale Tagung über Haltung und Krankheiten der Kaninchen, Pelztier und Heimtiere. Celle, 9-10. maj 2007. Giessen, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft: 186 str.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. Tenth edition. London, Pearson Prentice Hall: 1019 str.
- Makkar H.P.S., Singh B. 1987. Comparative enzymatic profiles of rabbit caecum and bovine rumen content. *Journal of Applied Rabbit Research*, 10: 172-174
- Makkar H.P.S., Singh B., Krishna L. 1990. Effect of feeding urea on some hydrolytic and ammonia assimilation enzymes in rabbit caecum. *Journal of Applied Rabbit Research*, 13: 35-38

- Marounek M., Vovk S.J., Skrivanova V. 1995. Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *British Journal of Nutrition*, 73: 463-469
- Marounek M., Skřivanová V., Dušková D. 2000. *In vitro* caecal fermentation of nitrogenous substrates in rabbits. *Journal of Agricultural Science*, 135: 437-442
- McAllister T.A., Rode L.M., Major D.M, Cheng K.J., Buchanan-Smith J.G. 1990. Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. *Canadian Journal of Animal Science*, 70: 571-579
- McAllister T.A. in Cheng K.-J. 1996. Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Animal Feed Science Technology*, 62: 29-36
- McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. 2002. *Animal nutrition*. 6th edition. Harlow, Pearson Prentice Hall: 639 str.
- McNeil M., Darvill A.G., Fry S.C., Albersheim P. 1984. Structure and function of primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*, 53: 625-663
- Menke K.H., Steingass H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28: 7-55
- Nordin M., Campling R.C. 1976. Digestibility studies with cows given whole and rolled cereal grains. *Animal Production*, 23: 305-313
- Padilha M.T.S., Licois D., Gidenne T., Carré B., Fonty G. 1995. Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. *Reproduction and Nutrition Development*, 35: 375-386
- Piattoni F., Demeyer D.I., Maertens L. 1996. *In vitro* study of age-dependent caecal fermentation pattern and methanogenesis in young rabbits. *Reproduction and Nutrition Development*, 36: 253-261

- Rieu-Lesme F., Morvan B., Collins M.D., Fonty G., Willems A. 1996. A new H₂/CO₂ - using acetogenic bacterium from the rumen: Description of *Ruminococcus schinkii* sp. nov. FEMS Microbiology Letters, 140: 281-286
- Rymer C., Givens D.I. 2002. Relationships between patterns of rumen fermentation measured in sheep and in situ degradability and the in vitro gas production profile of the diet. Animal Feed Science and Technology, 101: 31-44
- Russell J.B. 1998. The Importance of pH in the Regulation of Ruminal Acetate to Propionate Ratio and Methane Production In Vitro. Journal of Dairy Science, 81: 3222-3230
- SAS/STAT: User's guide. 1994. 6th edition. Cary, SAS Institute: 890 str.
- Sehested J., Diernaes L., Møller D., Skadhauge E. 1999. Ruminal transport and metabolism Short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: effect of SCFA chain length and pH. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 123: 359-368
- Seymour W.M., Campbell D.R., Johnson Z.B. 2005. Relationship between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. Animal Feed Science and Technology, 119: 155-169
- Slyter L.L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. Journal of Animal Science, 43: 910-929
- Sunvold G.D., Hussein H.S., Fahey G.C., Merchen N.R., Reinhart G.A. 1995. *In vitro* fermentation of cellulose, beet pulp, citrus pulp and citrus pectin using fecal inoculum from cats, dogs, horses, humans and pigs and ruminal fluid from cattle. Journal of Animal Science, 73: 3639-3648
- Williams B.A., Verstegen M.W.A., Tamminga S. 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. Nutrition Research Reviews, 14: 207-227

Wolin M. J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*, 43:
1452-1459

Žgajnar J. 1990. Prehrana in krmljenje govedi. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 564 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Andreju Lavrenčiču za strokovno usmerjanje in nasvete.

Zahvala recenzentu prof. dr. Janezu Salobirju za strokovni pregled diplomskega dela.

Iskrena hvala tudi vsem najbližjim za spodbudo in podporo pri študiju in pri pisanju diplomske naloge.