

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Irena ŽUPEC

***IN VITRO* FERMENTACIJA ŠKROBA V INOKULUMU,
PRIPRAVLJENEM IZ VSEBINE SLEPEGA ČREVESA KUNCEV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

***IN VITRO* FERMENTATION OF STARCH IN THE RABBIT CAECUM**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2010

Z diplomskim delom končujem univerzitetni študij 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, za somentorico pa viš. pred. mag. Ajdo Kermauner.

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: viš. pred. mag. Ajda KERMAUNER
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.

Irena ŽUPEC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 636.92.084/.087(043.2)=163.6
KG	kunci/prehrana živali/slepo črevo/škrob/ <i>in vitro</i> fermentacija
KK	AGRIS L51/5600
AV	ŽUPEC, Irena
SA	LAVRENČIČ, Andrej (mentor)/KERMAUNER, Ajda (somentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2010
IN	IN VITRO FERMENTACIJA ŠKROBA V INOKULUMU, PRIPRAVLJENEM IZ VSEBINE SLEPEGA ČREVESA KUNCEV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 50 str., 7 pregl., 5 sl., 51 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V poskusu smo <i>in vitro</i> določili kazalnike kinetike produkcije plina sedmim substratom različnih vrst škroba: koruznem, pšeničnem in krompirjevem škrobu, mleti koruzi in pšenici, kuhanemu in surovemu krompirju. Pri tem smo za inokulum uporabili vsebino slepega črevesa kuncev. Kazalnike kinetike produkcije plina smo določili z Gompertzovim modelom, s pomočjo katerega smo izračunali še največjo hitrost fermentacije (MFR), čas, pri katerem je bila dosežena največja hitrost fermentacije (TMFR), in količino plina, nastalo v 10 urah fermentacije (GAS ₁₀). Skupna produkcija plina (kazalnik B) je bila največja pri fermentaciji krompirjevega in koruznega škroba (37 ml/g SS), najmanjša pa pri fermentaciji pšenice (30 ml/g SS). Pri škrobnatih krmilih se je tvorilo manj plina (B) kot pri čistih škrobih, vendar je bil pri škrobnatih krmilih TMFR krajši, zato je pri njih po 10 urah nastalo več plina. Le pri koruzi se je tvorilo manj plina (B) kot pri koruznem škrobu, tudi po 10 urah fermentacije (GAS ₁₀), TMFR in MFR pa se med koruzo in koruznim škrobom nista razlikovala. Najmanj plina se je tvorilo pri fermentaciji pšenice (B = 30 ml/g SS), vendar se je zaradi relativno velike fermentacije (MFR = 2,4 ml/h) v relativno kratkem času (TMFR = 10,9 h) tvorilo kar veliko plina v 10 urah (GAS ₁₀ = 9 ml/g SS). Pri fermentaciji koruze se je po 10 urah tvorilo malo plina (GAS ₁₀ = 3 ml/g SS). Pri fermentaciji surovega krompirja pa se je po 10 urah tvorilo veliko plina (GAS ₁₀ = 10 ml/g SS), predvsem zaradi relativno kratkega časa fermentacije (TMFR = 10,7 h), čeprav je ta substrat imel najmanjšo MFR (2,1 ml/h). Po 10 urah fermentacije se je največja količina plina tvorila pri kuhanem krompirju (GAS ₁₀ = 16 ml/g SS), predvsem zaradi kratkega TMFR (8,5 h), ki je bil tudi najkrajši izmed vseh obravnavanih substratov. Pri ostalih kazalnikih (MFR in B) ni bilo bistvenih razlik med krompirjevim škrobom in kuhanim krompirjem.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 636.92.084/.087(043.2)=163.6
CX rabbits/animal nutrition/caecum/starch/*in vitro* fermentation
CC AGRIS L51/5600
AU ŽUPEC, Irena
AA LAVRENČIČ, Andrej (supervisor)/KERMAUNER, Ajda (co-supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2010
TI IN VITRO FERMENTATION OF STARCH IN THE RABBIT CAECUM
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIV, 50 p., 7 tab., 5 fig., 51 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the course of this experiment, *in vitro* gas production kinetics for seven substrates, differing in various kinds of starch: corn, wheat and potato starch, milled corn and wheat, cooked and raw potato were determined, using caecum content as inoculum. The Gompertz model was applied in order to estimate the gas production kinetics and calculate the maximum fermentation rate (MFR), time of maximum fermentation rate (TMFR) and gas production in 10 h of fermentation (GAS₁₀). The highest amount of gas (parameter B) was produced from potato and corn starch (37 ml/g SS) and the lowest from wheat starch (30 ml/g SS). Less gas (B) was produced from starch forage than from pure starches, but the TMFR of starch forage was shorter which resulted in the higher amount of gas produced during the 10 h fermentation. A lower amount of gas (B) was produced from corn than from corn starch, but there were no differences between the TMFR and MFR of corn and corn starch. Although the lowest amount of gas was produced from wheat (B = 30 ml/g SS), the amount of gas produced was relatively high (GAS₁₀ = 9 ml/g SS), taking into consideration a rapid fermentation of wheat (MFR = 2.4 ml/h) in such a short period of time (TMFR = 10.9 h). A low amount of gas was produced from corn (GAS₁₀ = 3 ml/g SS). Despite having the lowest MFR (2.1 ml/h), the amount of gas produced from raw potato was high (GAS₁₀ = 10 ml/g SS) due to short fermentation time (TMFR = 10.7 h). After 10 h of fermentation the highest amount of gas was produced from cooked potato (GAS₁₀ = 16 ml/g SS) due to short TMFR (8.5 h), which was also the shortest TMFR among all substrates. There were no significant differences between the potato starch and cooked potato in relation to other kinetics (MFR and B).

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	2
2.1 ŠKROB	2
2.1.1 Kemijska sestava škroba	2
2.1.1.1 Amiloza	2
2.1.1.2 Amilopektin	3
2.1.2 Izvor škroba	4
2.1.3 Prebavljivost škroba	5
2.1.3.1 Razmerje med amilozo in amilopektinom	5
2.1.3.2 Oblika, struktura in velikost škrobnih zrn	6
2.1.3.3 Segrevanje škroba	8
2.1.3.4 Rezistentni škrob	8
2.1.3.5 Želatinizacija škroba v prebavnem traktu	9
2.1.3.6 Vpliv neškrobnih polisaharidov na prebavljivost škroba	9

2.1.3.7	Vpliv lipidov na prebavljivost škroba	10
2.1.3.8	Vpliv beljakovin na prebavljivost škroba	10
2.1.3.9	Vpliv encimov na prebavljivost škroba	10
2.1.3.10	Retrogradacija škroba	11
2.1.3.11	Vpliv različnih načinov predelave (temperatura, vlaga) na prebavljivost škroba	11
2.2	PREBAVNI TRAKT KUNCEV IN NJEGOVE POSEBNOSTI	12
2.2.1	Prebavni trakt kuncev	12
2.2.2	Posebnosti prebavnega trakta pri kuncih	13
2.3	OGLJIKOVI HIDRATI V PREHRANI KUNCEV	13
2.4	PREBAVA ŠKROBA PRI KUNCIH	14
2.4.1	Obseg in pomen prebave različnih škrob vsebujočih krmil v tankem črevesu kuncev	14
2.4.1.1	Tok škroba skozi tanko črevo	16
2.4.1.2	Koeficient prebavljivosti organske snovi (OS)	17
2.4.2	Vpliv razmerja med škrobom in vlaknino na prebavljivost HS v slepem črevesu kuncev	18
2.4.3	Obseg prebave različnih vrst škrob vsebujočih krmil v slepem črevesu kuncev	21
2.4.4	Mikrobna fermentacija ogljikovih hidratov v prebavnem traktu kuncev	21
2.4.5	Tvorba HMK	23
2.4.6	Vpliv škroba na zdravstveno stanje kuncev	23
3	MATERIAL IN METODE	28
3.1	SUBSTRATI	28
3.2	IN VITRO FERMENTACIJA	28

3.2.1	Priprava inokuluma iz vsebine slepega črevesa kuncev	29
3.2.2	Izvedba <i>in vitro</i> fermentacije	29
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	31
3.3.1	Kazalniki poteka fermentacije	32
3.3.2	Statistični model	33
4	REZULTATI	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	38
5.1	RAZPRAVA	38
5.2	SKLEPI	42
6	POVZETEK	44
7	VIRI	46
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Vsebnost škroba v g/kg SS v različnih škrobnatih krmilih (DLG, 1997).....	5
Preglednica 2: Razmerje med amilozo in amilopektinom pri pšenici, koruzi in krompirju (Tašner in Komerički, 2008).....	5
Preglednica 3: Kemijska sestava uporabljenih substratov.....	28
Preglednica 4: Sestava puferskih raztopin A, B in C (Golob, 2010).....	30
Preglednica 5: Sestava resazurina, redukcijske raztopine in končnega pufra	31
Preglednica 6: Ocenjeni kazalniki fermentacije različnih škrob vsebujočih substratov v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev (povprečje).....	34
Preglednica 7: Izračunani kazalniki fermentacije različnih škrob vsebujočih substratov v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev (povprečje).....	35

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Struktura molekule amiloze (Kornhauser, 2000)	3
Slika 2: Razlika v kemijski strukturi amiloze in amilopektina (Kornhauser, 2000)	4
Slika 3: Škrobna zrnca pri a) koruzi ((1) zrnca z zarezo in (2) zrnca brez zareze), b) pšenici, c) krompirju (Klein in Marquard, 2005)	7
Slika 4: Sproščanje plina pri fermentaciji v inokulumu iz vsebine slepega črevesa kuncev (KorŠ= koruzni škrob, PšŠ= pšenični škrob, KromŠ= krompirjev škrob, Kor= mleta koruza, Pš= mleta pšenica, KromK= kuhan krompir in KromS= surov krompir).....	35
Slika 5: Hitrost fermentacije v inokulumu iz vsebine slepega črevesa kuncev (KorŠ= koruzni škrob, PšŠ= pšenični škrob, KromŠ= krompirjev škrob, Kor= mleta koruza, Pš= mleta pšenica, KromK= kuhan krompir in KromS= surov krompir) ..	36

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	faktor mikrobne (ne)učinkovitosti
B	količina sproščenega plina
BDI	brezdušični izvleček
C	specifična hitrost fermentacije
CHO	ogljikovi hidrati
HMK	hlapne maščobne kisline
HS	hranljiva snov
KDL	v kislem detergentu netopen lignin
KDV	v kislem detergentu netopna vlaknina, lignoceluloza
MFR	največja hitrost fermentacije
NDV	v nevtralnem detergentu netopna vlaknina
NSP	neškrobni polisaharidi
OS	organska snov
PSV	prebavljiva surova vlaknina
SB	surove beljakovine
SM	surove maščobe
SS	suha snov
SV	surova vlaknina
TMFR	čas, v katerem je bila dosežena največja hitrost fermentacije

1 UVOD

Fermentacija v slepem črevesu kuncev je zaradi zgradbe prebavnega trakta zelo pomemben del prebave hranljivih snovi (HS). Fermentativna aktivnost mikroflore slepega črevesa igra pomembno vlogo pri ohranjanju zdravja kuncev. S pravilno prehrano zagotavljamo kuncem vse potrebne HS, ki jih potrebujejo za življenje in prirejo. Pravilno krmljenje kuncev povzroča bistveno manj prebavnih motenj, predvsem drisk, katerih končna posledica je lahko tudi pogin. Raziskave o vlogi črevesne mikroflore in o pomenu fermentacije v slepem črevesu kuncev so koristne in uporabne za sestavljanje krmnih obrokov. obroki z veliko vsebnostjo škroba povečujejo pogostost prebavnih težav, zato moramo biti pri pripravljanju krmnih obrokov posebno pozorni na razmerje med škrobom in vlaknino. Upoštevati moramo najnovejša priporočila dnevne vnosa vlaknine in škroba v sestavljenem krmnem obroku tako pri odstavljenih kot tudi rastočih kuncih, da se s tem izognemo težavam. Pomanjkanje vlaknine v obroku je povezano z majhno fermentativno aktivnostjo simbiotične flore v slepem črevesu kuncev, zato nadomeščanje škroba s prebavljivimi vlakninami izboljša zdravstveno stanje kuncev, ne da bi se pri tem zmanjšal dnevni prirast.

V nalogi smo skušali ugotoviti ali obstajajo razlike v fermentaciji različnih škrob vsebujočih substratov v slepem črevesu kuncev, zato smo spremljali potek fermentacije in merili količino sproščenega plina pri koruznem škrobu, pšeničnem škrobu, krompirjevem škrobu, mleti koruzi, mleti pšenici, kuhanem in surovem krompirju. Substrate smo inkubirali v inokulumu, ki je bil pripravljen iz slepega črevesa kuncev, in z *in vitro* plinskim testom ocenili količino nastalega plina. Predvidevali smo, da obstajajo razlike v fermentaciji med izoliranimi škrobi in posamičnimi krmili.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ŠKROB

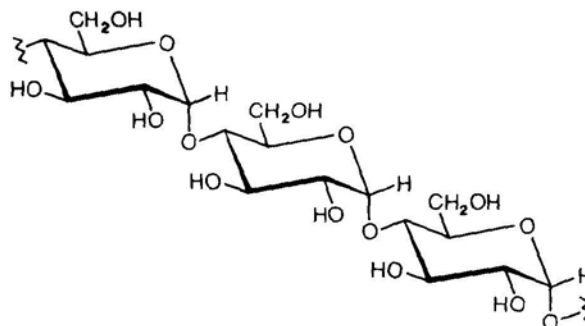
Škrob je glavni rezervni polisaharid zelenih rastlin in je v naravi, poleg celuloze, najbolj zastopan ogljikov hidrat. Je izjemno koristen substrat, saj ga s kemičnimi ali biokemičnimi tehnikami lahko uspešno pretvorimo v najrazličnejše produkte (Škrabanja, 2005), poleg tega pa predstavlja najbolj dostopen vir energije za ljudi in živali.

2.1.1 Kemijska sestava škroba

Škrob je naravni polimer monosaharida D-glukoze in spada med ogljikove hidrate, natančneje polisaharide. V škrobu je D-glukoza v ciklični obliki kot šestčlenski obroč. Molekule D-glukoze so v škrobu med sabo povezane z glikozidnimi vezmi med 1. in 4. ogljikovim atomom ter med 1. in 6. ogljikovim atomom v molekuli. Škrob je sestavljen iz dveh polisaharidov, amiloze in amilopektina, ki imata za osnovni gradbeni element α -D-glukozo oziroma D-glukopiranozo (Tašner in Komerički, 2008).

2.1.1.1 Amiloza

Amiloza ima enostavno, nerazvejano molekulo v obliki dolge linearne verige (slika 1). Molekule glukoze v amilozi so povezane z α -1,4 glikozidnimi vezmi. Ker so med glukozami α -glikozidne vezi, ima amiloza obliko α -vijačnice. Povprečna dolžina verige se giblje od 500 do 2000 molekul glukoze in je odvisna od izvora škroba. Amiloza je pogosto zavita v spiralo (heliks), v katere notranjosti se lahko vežejo proste maščobne kisline, jod in nekateri alkoholi. Značilnost amiloze je, da pri kuhanju želira, zato škrob z večjim deležem amiloze (koruzni škrob, pšenični škrob) uporabljajo za tvorbo gelov. Oblikovanje gela je posledica retrogradacije škroba, ki je proces, pri katerem pride do ponovnega povezovanja škrobnih verig. Le te se zaradi segrevanja predhodno raztapljajo (Tašner in Komerički, 2008).

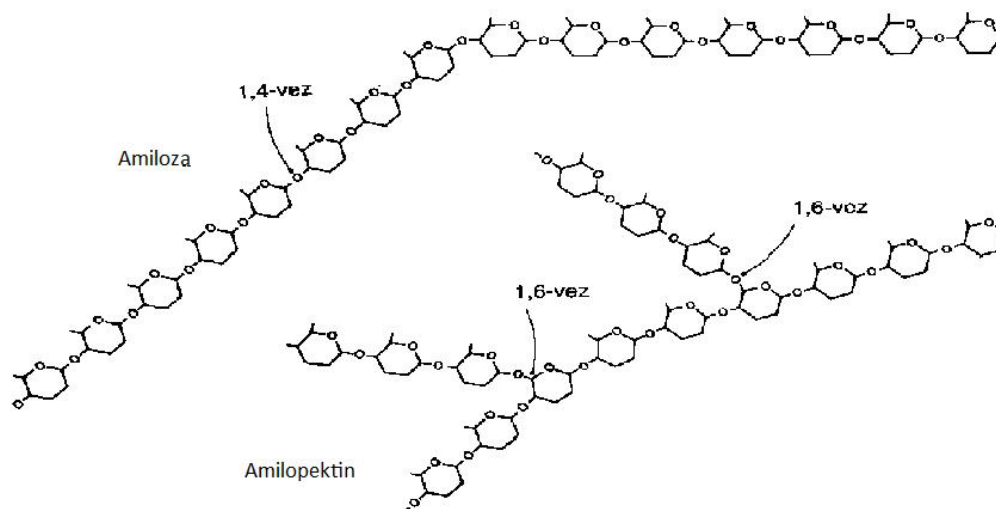


Slika 1: Struktura molekule amiloze (Kornhauser, 2000)

2.1.1.2 Amilopektin

Amilopektin je glavna sestavina škrobnega zrna, saj sestavlja 80 % njegove mase. Molekule glukoze v amilopektinu so povezane z α -1,4 in α -1,6 glikozidnimi vezmi (slika 2). Amilopektinske molekule so zelo velike in razvejane v primerjavi z amilozo. Tvori koncentrično naložene plasti v škrobnem zrnju. Amilopektin je zgrajen iz 600 do 500.000 molekul glukoze, ki se povezujejo v razvejane α -vijačnice (Tašner in Komerički, 2008).

V škrobnem zrnju obstaja značilna ureditev amiloze in amilopektina okrog jedra. Nameščena sta v koncentričnih krogih okrog jedra in, ko škrobno zrnje raste, se radialno širi. Kjerkoli je mogoče, se sosednje molekule amiloze z vodikovimi vezmi povezujejo z zunanji vejami amilopektina in tvorijo svežnje, imenovane micelle. Naloga le teh je, da držijo škrobna zrnca skupaj in dovoljujejo nabrekanje v topli vodi, ne da bi prišlo do razpada in raztopitve škrobnih molekul (Tašner in Komerički, 2008).



Slika 2: Razlika v kemijski strukturi amiloze in amilopektina (Kornhauser, 2000)

2.1.2 Izvor škroba

Radosavljević in sod. (2009, cit. po Vukmirović, 2010) so poročali, da se posamezne vrste škroba med seboj razlikujejo, tako po izvoru kot tudi po kemijski strukturi, po velikosti in obliki škrobnih zrn ter po funkcionalnih in senzoričnih lastnostih.

Škrobna krmila se med seboj razlikujejo po vsebnosti škroba. Pri pšenici je vsebnost škroba najmanjša, nekoliko večja je pri koruzi, pri krompirju pa je največja (preglednica 1). Tudi Mercier in sod. (1989, cit. po Vukmirović, 2010) so poročali, da se škrob nahaja v številnih gojenih rastlinah, kot so semena žit (50 do 80 %) in metuljnice (25 do 50 %).

Preglednica 1: Vsebnost škroba v g/kg SS v različnih škrobnatih krmilih (DLG, 1997)

Viri škroba	škrob
Pšenica	662
Koruza	694
Krompir	710

Vse vrste škroba so sestavljene iz amiloze in amilopektina. Razmerje med amilozo in amilopektinom je eden najpomembnejših kazalnikov, ki pomembno vplivajo na funkcionalne lastnosti škroba (Tašner in Komerički, 2008).

Preglednica 2: Razmerje med amilozo in amilopektinom pri pšenici, koruzi in krompirju (Tašner in Komerički, 2008)

Vrsta škroba	Amiloza (%)	Amilopektin (%)
Pšenica	25	75
Koruza	25	75
Krompir	20	80

Na razmerje med obema vrstama polisaharidov vplivajo različni encimski sistemi v posameznih rastlinah, ki ju sintetizirajo. Razmerje med amilozo in amilopektinom je v pšenici in koruzi 25 proti 75, v krompirju pa 20 proti 80 (preglednica 2).

2.1.3 Prebavljivost škroba

2.1.3.1 Razmerje med amilozo in amilopektinom

Razmerje med amilozo in amilopektinom je eden izmed dejavnikov, ki močno vpliva na prebavljivost škroba.

Vrste škroba, ki vsebujejo več amiloze kot amilopektina, tvorijo komplekse z maščobami, beljakovinami, polifenoli in so prebavnim encimom težje dostopni ali celo nedostopni in predstavljajo tako imenovani rezistentni škrob (Škrabanja, 2005). Vpliv razmerja med amilozo in amilopektinom je pri žitih precej raziskan. Hitrost hidrolize je negativno

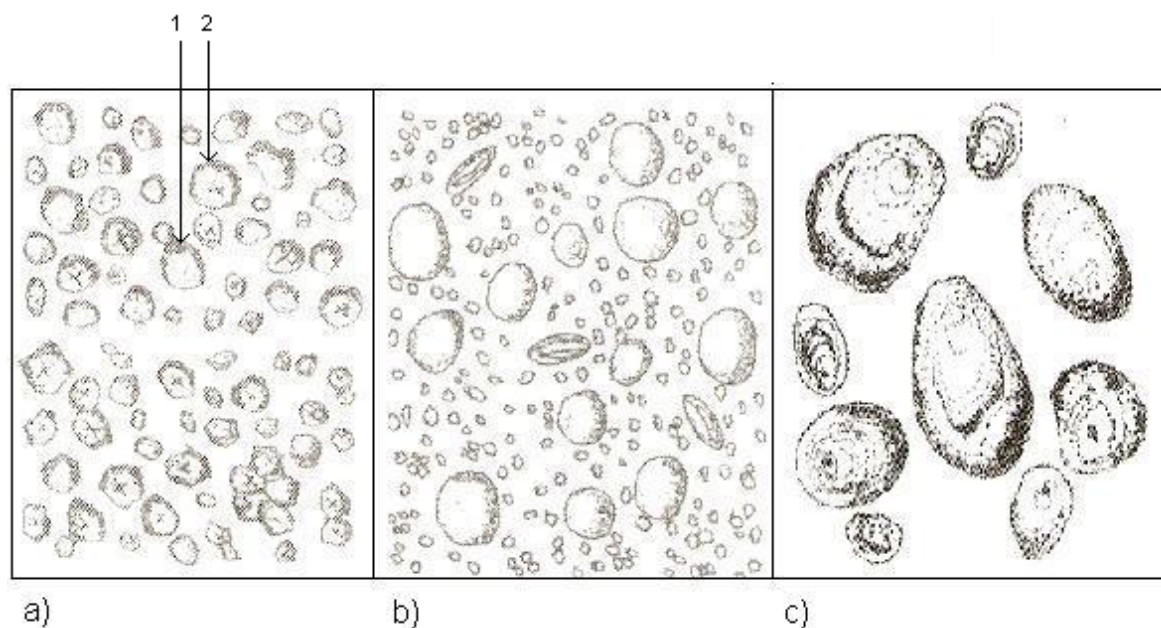
korelirana z deležem amiloze v škrobu oz. z vsebnostjo nastalega rezistentnega škroba (Škrabanja in sod., 1999). Torej, širše kot je razmerje med amilozo in amilopektinom, manjša je prebavljivost škroba.

Škrabanja in sod. (1999) so ugotavljali vpliv različnih razmerij med amilozo in amilopektinom v škrobu graha na njegovo izkoristljivost. Uporabili so tri različne genotipe graha. Škrob prvega genotipa graha je vseboval 23 % amiloze in 77 % amilopektina, drugi 33 % amiloze in 67 % amilopektina, tretji genotip graha pa 65 % amiloze in 35 % amilopektina. Po termični obdelavi (kuhanje ali avtoklaviranje) celih ali zmletih zrn graha so vzorce analizirali na vsebnost izkoristljivega škroba in škroba odpornega na encimsko hidrolizo v tankem črevesu (rezistentni škrob). Z *in vitro* metodo so določili hitrost hidrolize škroba in izračunali hidrolizni indeks. Najmanjšo vsebnost rezistentnega škroba (6,2 % glede na skupni škrob) so določili v genotipu graha z 23 % amiloze in 77 % amilopektina. Širše razmerje med amilozo in amilopektinom je kazalo tudi na večjo vsebnost rezistentnega škroba. Tako se je pri grahu, katerega škrob je vseboval 33 % amiloze, tvorilo 11 % rezistentnega škroba, pri genotipu s 65 % amiloze pa 32 % rezistentnega škroba glede na skupni škrob. Avtorji so ugotovili, da je hitrost hidrolize negativno korelirana z deležem amiloze v škrobu oz. z vsebnostjo nastalega rezistentnega škroba (Škrabanja in sod., 1999).

2.1.3.2 Oblika, struktura in velikost škrobnih zrn

Amiloza in amilopektin sta sestavna dela škrobnih zrn in ne obstajata prosto v naravi. Škrobna zrnca se razlikujejo po velikosti, obliki in sestavi. V nativnih škrobih poleg molekul amiloze in amilopektina najdemo tudi omejene količine vode, beljakovin, lipidov in rudninskih snovi, ki so organizirane v micelah znotraj obstojnih, morfološko prepoznavnih mikroskopskih struktur, imenovanih škrobna zrna. Zrna, ki jih najdemo v semenih, koreninah, gomoljih, steblih, listih, plodovih in celo pelodu, so različnih velikosti in oblik kot tudi kemičnih in fizikalnih lastnosti. Specifičnost je tako značilna, da služi kot parameter pri identifikaciji nativnega škroba (Škrabanja, 2005). Premeri zrn se gibljejo od 1 μm do več kot 100 μm (Tašner in Komerički, 2008).

Škrobna zrnca imajo orientirano, kristalno molekularno strukturo, kar je osnova za uklanjane polarizirane svetlobe. Z uporabo polarizirane svetlobe lahko določimo za katero vrsto škroba gre, saj pod mikroskopom vidimo različne oblike in velikosti škrobnih zrn (slika 3).



Slika 3: Škrobna zrnca pri a) koruzi ((1) zrnca z zarezo in (2) zrnca brez zareze), b) pšenici, c) krompirju (Klein in Marquard, 2005)

V koruznem škrobu prevladujejo različna škrobna zrnca endosperma koruze. Prisotna so tudi škrobna zrnca endosperma v praškasti obliki. V pšeničnem škrobu so vedno prisotna tako majhna kot velika zrna. Premer velikih zrn lahko znaša tudi do 40 μ m. V splošnem zrna pšeničnega škroba na sredini niso razcepljena. Značilno za škrobna zrnca krompirja pa je njihova jasna razslojenost (Klein in Marquard, 2005).

Čim manjša so škrobna zrnca, tem večja je stična površina encima in substrata in tem boljša je prebavljivost škroba. Žita z manjšimi škrobnimi zrci (oves, riž) imajo večjo prebavljivost škroba kot koruza, pšenica ali krompir, ki imajo v primerjavi z ovsem in rižem večja škrobna zrnca. Poleg večje specifične površine vpliva na večjo prebavljivost manjših škrobnih zrn tudi manjša stopnja kristaliničnosti (molekule amiloze in

amilopektina se združujejo v helikse). Manjša zrnca imajo zaradi tega večjo kapaciteto absorpcije vode, s čimer je delovanje amilolitičnih encimov hitrejše (Vukmirović, 2010).

2.1.3.3 Segrevanje škroba

Naravni škrob je v hladni vodi netopen, ko pa ga v prisotnosti vode segrevamo, pride v škrobnih zrnih do porušanja notranjega reda. Pri različnih škrobnih zrnih (krompir, koruza, pšenica) se to zgodi pri različni temperaturi. Pri krompirju se notranji red poruši pri temperaturi 56 do 67 °C, pri koruzi pri temperaturi 62 do 72 °C, pri pšenici pa pri temperaturi 52 do 85 °C (Tašner in Komerički, 2008). Sestava določenega škroba oziroma količina amiloze in amilopektina opredeljuje obnašanje škroba (Tašner in Komerički, 2008). V kemijskem pogledu pride do tega, da manjše linearne molekule amiloze začnejo zaradi nabrekanja izhajati iz zrn. Ob nadaljevanju segrevanja se iz zrn sproščata še dodatna amiloza kot tudi amilopektin, pri tem pa pride tudi do njihove razgradnje (Tašner in Komerički, 2008). V tkivih (gomolji, semena) je škrob v obliki v vodi netopnih zrn znotraj amiloplastov oz. struktur, obdanih z dvojno membrano, ki omejuje dostop encimov do zrna (Škrabanja, 2005).

2.1.3.4 Rezistentni škrob

Rezistentni škrob je definiran kot prehranski škrob, ki ga živali v tankem črevesu ne prebavijo. Tovrstni škrob se v procesu prebave obnaša podobno kot prehranska vlaknina. Osnovna razlika med prebavljivim in rezistentnim škrobom je v dostopnosti encimov do slednjega v prebavnem procesu (Tašner in Komerički, 2008).

Tipi rezistentnega škroba (Tašner in Komerički, 2008):

- Tip 1: Fizikalno nedostopen škrob, ki ga ščitijo celične stene in druge ovire, tako da ga prebavni encimi in kislo okolje ne dosežejo (delno mleto zrnje in semena).
- Tip 2: Naravni škrob s kristalno strukturo v nekuhani oziroma surovi obliki (surov krompir).

Tip 3: Neprebavljivi škrob, ki se oblikuje po obdelavi s temperaturo in vlago (npr. kuhan krompir). Škrob v živilu zakleji, nato se ohladi in pojavi se proces retrogradacije. Nastane rezistentni škrob. Zaklejitev škroba se kaže v porušenju urejenosti škrobnega zrnca in s tem v nepovratnih spremembah v lastnostih škrobnega zrnca (uničenju strukture škrobnih zrn, povečanju škrobnih zrn in povečanju viskoznosti medija v katerem se škrob segreva).

Tip 4: S kemičnimi in toplotnimi modifikacijami proizveden rezistentni škrob.

2.1.3.5 Želatinizacija škroba v prebavnem traktu

Škrob je pomemben vir energije za živali. Želatinizacija bistveno poveča dovzetnost škroba za encimsko razgradnjo v prebavnem traktu živali. Zaradi izgube kristalne strukture je lažja hidratacija in delovanje prebavnih encimov. Med količino želatiniziranega škroba in njegovo občutljivostjo za amilolitično razgradnjo obstaja močna povezava ($r=0,96$) (Vukmirović, 2010).

2.1.3.6 Vpliv neškrobnih polisaharidov na prebavljivost škroba

Eden od dejavnikov, ki vplivajo na prebavljivost škroba v prebavnem traktu, je prisotnost topnih neškrobnih polisaharidov (NSP), predvsem β -glukana in arabinoksilana (pentozana). Ti so sestavni deli celičnih sten žit. β -glukani so najpogosteje zastopani v ječmenu in ovsu, pentozani pa v pšenici in rži. NSP tvorijo v prebavnem traktu izrazito viskozne raztopine. Povečana viskoznost črevesne vsebine otežuje difuzijo delcev, zmanjšuje absorpcijo hranljivih snovi in zmanjšuje aktivnost encimov, kar negativno vpliva na razgradnjo škroba. Veldman in sod. (1994, cit. po Vukmirović, 2010), so preučevali razgradnjo škroba pri brojlerjih in ugotovili, da dodajanje encimov β -glukanaz ali arabinoksilanaz poveča prebavljivost glukanov in arabinoksilanov. Viskoznost se je s tem zmanjšala, prebavljivost škroba pa povečala. Dodajanje encimov v krmo je bilo s tega vidika torej utemeljeno, vendar pa so kasnejše raziskave pokazale, da dodatek encimov ne omogoči popolne razgradnje škroba. To pomeni, da obstajajo še drugi dejavniki, ki vplivajo na razgradnjo škroba, predvsem kemična sestava škrobnih zrn (Vukmirović, 2010).

2.1.3.7 Vpliv lipidov na prebavljivost škroba

Škrobna zrnca žit vsebujejo 1 do 14 % lipidov. Najpogosteje (5 do 10 %) so lipidi zastopani v neškrobnih komponentah škrobnih zrn. Sestavljeni so v glavnem iz prostih maščobnih kislin, od katerih je največ palmitinske in linolenske kisline, ter iz fosfolipidov. Škrobno-lipidni kompleks lahko zmanjša prebavljivost škroba zaradi zmanjšanja stične površine med encimom in substratom, saj se največ lipidov nahaja na površini škrobnih zrn. Lipidi negativno vplivajo tudi na nabrekanje škroba. Povečana hidrofobnost, ki jo povzročajo lipidi na površini škrobnih zrn, zmanjša želatinizacijo in prebavljivost škroba (Vukmirović, 2010).

2.1.3.8 Vpliv beljakovin na prebavljivost škroba

Škrobna zrnca najpogosteje vsebujejo manj kot 0,3 % beljakovin. Beljakovine so v glavnem skoncentrirane na površini zrn. V endospermu pšenice je Vukmirović (2010) določil na površini škrobnih zrn prisotnost beljakovine friabilin, ki pomembno vpliva na trdoto endosperma. Trdota škrobnih zrn močno vpliva na proces mletja. Friabilin je prisoten v mehkih zrnih (navadna pšenica), medtem ko ga je v trdih zrnih (durum pšenica) zelo malo. Friabilin verjetno slabi povezavo med škrobom in beljakovinskim matriksom endosperma, zato je mletje mehkih zrn lažje, ob tem pa se poškoduje manj škroba. Friabilin posredno, prek vpliva na proces mletja, vpliva tudi na prebavljivost škroba, saj je pri mehkih zrnih prebavljivost škroba boljša. Neposredni vpliv friabilina na encimsko razgradnjo škroba pa se kaže v manjšem nabrekanju škroba, saj beljakovine podobno kot lipidi, lahko zmanjšujejo nabrekanje, oziroma želatinizacijo škroba, kar pa tudi zmanjša oz. onemogoči kontakt s prebavnimi encimi (Vukmirović, 2010).

2.1.3.9 Vpliv encimov na prebavljivost škroba

V pšenici, rži, tritikali in sirku se nahajajo tudi zaviralci delovanja α -amilaze, medtem ko jih v koruzi, rižu in ječmenu ni. Inhibitorji α -amilaze v pšenici so termolabilni albumini, ki izvirajo v glavnem iz endosperma. Ti zaviralci zmanjšujejo prebavljivost škroba pri podganah in piščancih, če so prisotni v zadostnih količinah (Vukmirović, 2010). Svihus in

sod. (2005) so v kasnejših poskusih uporabili takšno količino inhibitorja α -amilaze, ki odgovarja največji količini v pšenici prisotne, a niso potrdili njihovega negativnega učinka. To je bila posledica razgradnje teh inhibitorjev v želodcu, kjer nanje deluje pepsin. Ugotovili so, da povečana vsebnost inhibitorja α -amilaze privede do povečanja trebušne slinavke pri živalih, zato moramo biti pozorni na vsebnost inhibitorja α -amilaze.

2.1.3.10 Retrogradacija škroba

Poleg kemijske strukture na razgradnjo škroba v prebavnem traktu živali pomembno vpliva tudi pojav retrogradacije. Retrogradacija je proces, pri katerem želatiniziran škrob kristalizira. Pri tem procesu pride do združevanja dvojne vijačnice (dvojnega heliksa) amiloze in amilopektina. Ta proces je nezaželen, saj je retrogradiran škrob neprebavljiv. Retrogradacija amilopektina je zelo počasna, nekaj tednov ali mesecev, retrogradacija amiloze pa je hitrejša, kar moramo upoštevati pri skladiščenju škrobnatih krmil. Da pride do retrogradacije, morajo krmila vsebovati vsaj 20 % vode, potrebna pa je tudi visoka temperatura. Retrogradacija škroba je bila opažena pri vzorcih, ki so vsebovali 20, 30 in 40 % vode, in pri visoki temperaturi skladiščenja. Tako je prišlo pri temperaturi skladiščenja 60 °C do največje retrogradacije škroba po 5,2 dneh, pri temperaturi 80 °C pa že po 34 minutah. To pomeni, da se z višanjem temperature in povečanjem vsebnosti vlage, pospešuje retrogradacija škroba (Vukmirović, 2010).

2.1.3.11 Vpliv različnih načinov predelave (temperatura, vlaga) na prebavljivost škroba

Naravni škrob v obliki zrn lahko pri sobni temperaturi absorbira zelo malo vode. Zrnca škroba pri segrevanju in v prisotnosti vode nabrekajo in pokajo. Woodorf (1993, cit. po Vukmirović, 2010) je poročal, da se pri teh pogojih oblikuje gel z gosto naloženimi molekulami amiloze in amilopektina, ki ima veliko kapaciteto absorpcije vode. Verjetno je, da postane škrob s segrevanjem in v prisotnosti vode bolj prebavljiv. Različne vrste škroba želatinirajo pri temperaturi med 50 in 70 °C v prisotnosti vode (Vukmirović, 2010).

2.2 PREBAVNI TRAKT KUNCEV IN NJEGOVE POSEBNOSTI

2.2.1 Prebavni trakt kuncev

Prebavni kanal (trakt) kunca se začne z ustno votlino, kjer so zobje, s katerimi krmo prežveči in zdrobi, jezik in različne žleze, ki izločajo slino. Slina vsebuje amilazo, encim za razgradnjo škroba, vendar le ta pri razgradnji, zaradi kratkotrajnega zadrževanja krme v ustih, nima pomembnejše vloge. Usta so s tanko mišično cevjo (požiralnikom) povezana z želodcem. Sluznica želodca izloča želodčni sok, ki vsebuje solno kislino in encime za razgradnjo beljakovin. Solna kislina močno zakisa vsebino želodca (pH = 1,5 do 2,5), kar zaustavi razgradnjo škroba, začne pa se prebava beljakovin (Grün, 2002). Želodec je slabo omišičen, vsebina želodca pa se zaradi slabih kontrakcij slabo meša, zato se krma pomika naprej v tanko črevo predvsem zaradi dodatnega pritiska krme ali cekotrofov, ki prihajajo v želodec (Gjurić, 1985; Stanford, 1980, cit. po Kermauner, 1994).

Iz želodca potuje krma naprej v tanko črevo. Tanko črevo je dolgo in ima tanko steno, ki je dobro ožiljena. V prvi del tankega črevesa (dvanajstnik) vodita izvodila jeter (žolč) in trebušne slinavke, stena tankega črevesa pa izloča črevesni sok. Žolč raztopi maščobo iz krme v drobne kroglice, ki jih zatem encimi iz trebušne slinavke in črevesnega soka lahko razgradijo. Tudi prebava beljakovin se nadaljuje z encimi trebušne slinavke in črevesnega soka (Grün, 2002).

Encimi v tankem črevesu med ogljikovimi hidrati razgradijo le škrob in sladkorje, medtem ko gredo vlaknina in drugi NSP (celuloza, hemiceluloze, pektinske snovi) skozi tanko črevo neprebavljeni. Na koncu tankega črevesa se razgradi večina hranljivih snovi krme. Beljakovine se razgradijo do aminokislin, maščobe do maščobnih kislin in glicerola, škrob in sladkorji pa do glukoze in drugih monosaharidov. Po absorpciji HS skozi črevesno sluznico ostanejo v črevesni vsebini ob tem še neprebavljene snovi, ki potujejo naprej v slepo črevo (Grün, 2002). Slepo črevo je največji del prebavnega trakta pri kuncih, ki zavzema kar 40 % celotnega gastrointestinalnega trakta. V njem se vrši večina mikrobne fermentacije (Kermauner, 1994).

2.2.2 Posebnosti prebavnega trakta pri kuncih

Za kunce je značilen proces nastajanja in zauživanja mehkega blata, imenovan cekotrofija (Heymer, 1977). Mehko blato kunec zaužije neposredno iz anusa, s tem pridejo produkti fermentacije slepega črevesa na začetek prebavne poti in doprinesejo precejšen delež HS. Cekotrofi vsebujejo delno prebavljene HS, na katerih poteka mikrobná razgradnja, in precejšen delež bakterijske mase. Zaradi pojava cekotrofije potujejo določeni delci večkrat skozi prebavni kanal, zaradi česar se čas zadrževanja HS v prebavilih kunca podaljša (Kermauner, 1994). Kolon je odgovoren tudi za tvorbo mukoznega ovoja cekotrofov (Henning in Hird., 1972, cit. po Kermauner, 1994).

V kolonu in slepem črevesu kunca obstaja poseben mehanizem ločevanja delcev. Veliki delci (lignin in celuloza) se hitro izločajo s trdim blatom, medtem ko se majhni delci in tekočine (hemiceluloze in pektinske snovi) vračajo v slepo črevo. Ti majhni delci neprebavljene krme, so odličen vir HS za mikroorganizme, ki poseljujejo slepo črevo. Mikroorganizmi razkrajajo NSP do hlapnih maščobnih kislin (HMK), kot so očetna, maslena in propionska kislina. Tvorijo lastno bakterijsko biomaso in različne vitamine. HMK telo vsrka skozi sluznico slepega črevesa in porabi v presnovi kot vir energije (Grün, 2002).

2.3 OGLJIKOVI HIDRATI V PREHRANI KUNCEV

Glavni vir energije v prehrani kuncev so ogljikovi hidrati. V weendski analizi se pojavijo v dveh skupinah: SV (večinoma celuloza) in brezdušični izvleček (BDI) (večinoma škrob in sladkorji). Ker pa se delitev na SV in BDI ne odraža tudi v prebavljivosti v prebavilih živali, se je v zadnjem času uveljavila analiza po Van Soestu, pri kateri lahko natančneje določimo skupine ogljikovih hidratov po njihovi dejanski prebavljivosti v organizmu (Grün, 2002).

Za kunce je posebno pomembna vsebnost v kislem detergentu netopna vlaknina (KDV) v krmi, ki zajema lignin in celulozo. KDV zagotavlja normalno delovanje prebavnega trakta oziroma fiziologijo prebave, značilno za kunce (cekotrofija in ločevanje delcev v debelem

črevesu), čeprav nima velike hranilne vrednosti. V nevtralnem detergentu netopna vlaknina (NDV), ki poleg KDV zajema hemiceluloze, pa je za kunce dobro prebavljiva in ima precejšnjo energijsko vrednost (Grün, 2002).

Večino škroba kunci prebavijo že v tankem črevesu. V tankem črevesu neprebavljen škrob in druge ostanke neprebavljenih snovi (hemiceluloze in pektinske snovi) kunci ob pomoči mikroorganizmov prebavijo v slepem črevesu (Grün, 2002). Mikroorganizmi s svojimi encimi vzpostavljajo ravnotežje med razgradnjo uporabnih substratov vsebine slepega črevesa in sintezo lasnih snovi (Marty in sod., 1973, cit. po Kermauner, 1994). Celuloza, ki je potrebna za normalno delovanje prebavil in občutek sitosti, je slabo prebavljiva, saj jo žival izloča v trdem blatu (Grün, 2002).

2.4 PREBAVA ŠKROBA PRI KUNCIH

Slina kuncev sicer vsebuje encim amilazo (encim za razgradnjo škroba), vendar le ta pri razgradnji, zaradi kratkotrajnega zadrževanja krme v ustih, nima pomembnejše vloge (Kermauner, 1994). Solna kislina močno zakisa vsebino želodca (pH = 1,5 do 2,5), kar zaustavi razgradnjo škroba (Grün, 2002). Encimi v tankem črevesu med ogljikovimi hidrati razgradijo le škrob in sladkorje, medtem ko gredo vlaknina in drugi NSP (celuloza, hemiceluloze, pektinske snovi) skozi tanko črevo neprebavljeni. Škrob in sladkorje encimi v tankem črevesu razgradijo do glukoze in drugih monosaharidov. Po absorpciji HS skozi črevesno sluznico ostanejo v črevesni vsebini še neprebavljive snovi, ki potujejo naprej v slepo črevo (Grün, 2002). V slepem črevesu rezistentni škrob in druge ostanke neprebavljenih snovi razgradijo mikroorganizmi.

2.4.1 Obseg in pomen prebave različnih škrob vsebujočih krmil v tankem črevesu kuncev

Pri procesu predelave krme lahko pride do različne stopnje želiranja škroba zaradi vsebnosti vode v krmi, ki variira od 17 do 30 %. Škrob se v krmi lahko nahaja v obliki neželatiniziranih škrobnih zrn, v obliki poškodovanih zrn, v obliki zrn, ki so samo na površini želirana, v obliki zlomljenih zrn, v obliki fragmentov zrn ali pa kot popolno

želiran škrob (Riaz, 2007, cit. po Vukmirović, 2010). Za popolno želiranje škroba pri atmosferskem pritisku je potrebna najmanj 30 do 40 % prisotnost vlage v krmi. Med želiranjem pride do povečanja viskoznosti zaradi nabrekanja in nastajanja gela. Svihus in sod. (2005) so ugotovili, da želiranje olajšuje delovanje amilolitičnih encimov, poleg tega pa pozitivno vpliva na fizikalne lastnosti krme z vezivnim delovanjem na sestavine mešanice.

Škrob lahko deluje kot vezivno sredstvo v procesu peletiranja. Da bi lahko tako deloval mora biti modificiran/spremenjen, saj nativni škrob ne kaže vezivnih lastnosti. Do želatinizacije pride pri kondicioniranju, ki je predhodna faza peletiranja in v manjši meri pri samem peletiranju (Vukmirović, 2010).

Pri peletiranju in ekspaniranju spremembe škroba niso zadostne, da bi dosegli pomembno povečanje prebavljivosti (odvisno od vrste živali), medtem ko je pri ostrejših pogojih, ki so prisotni pri ekstrudiranju (višja temperatura, večja vsebnost vode) in pri dolgotrajnem kondicioniranju, želatinizacija uspešnejša, s tem pa je tudi prebavljivost večja (Vukmirović, 2010).

V prehrani kuncev med škrobnatimi krmili najpogosteje uporabljajo ječmen in oves. Koruzo dodajamo krmnim mešanicam le v manjših količinah, saj je energijsko bogata, vendar z malo vlaknin, zato lahko povzroča drisko (Grün, 2002).

Pšenico redkeje uporabljajo v prehrani kuncev, ker postane podobna testu. Semena žit najpogosteje dajemo kot dodatek k ostalim krmilom (Gjurić, 1985). obroki za kunce smejo vsebovati največ 50 % pšenice, saj mešanice z višjim deležem pšenice lahko povečajo pojav prebavnih težav (Lanzas in sod., 2007).

Krompir je zaradi dobre prebavljivosti in dietetičnega delovanja izvrstna krma za kunce, posebno pozimi, ko ni na razpolago zelene krme, vendar ga uporabljamo le v ekstenzivni reji. Krompir vsebuje okrog 0,5 do 1 % beljakovin in 20 % ogljikovih hidratov. Najbolje je, da ga pred uporabo skuhamo, dobro zgetemo in krmimo v obliki trde goste kaše.

Vodo, v kateri se je krompir kuhal, moramo odliti, saj vsebuje alkaloid solanin (Gjurić, 1985). Znano je, da je solanin strupen in naredi veliko škode v prebavnem traktu ljudi in živali.

Hidroliza škroba v tankem črevesu kuncev lahko poteka različno dolgo, v odvisnosti od vrste in količine škroba, kar vpliva tudi na količino škroba, ki vstopa v slepo črevo, in na aktivnost fermentacije v slepem črevesu kuncev. Gidenne in Perez (1993) sta ugotavljala razlike v koncentraciji škroba v tankem črevesu glede na njegov izvor, hitrost prehoda črevesne vsebine v odvisnosti od izvora škroba in učinek le tega na prebavljivost vlaknine v slepem črevesu kuncev. Pri poskusu sta v obrokih uporabila čisti koruzni škrob, koruzo, ječmen in grah. Ugotovila sta, da je bila razgradljivost škroba v celotnem prebavnem traktu skoraj popolna ne glede na vrsto škroba, razen pri koruzi, katere razgradljivost je bila za 3 % manjša kot pri ječmenu in grahu. Povprečni čas zadrževanja škroba v celotnem prebavnem traktu se je s povečevanjem nivoja škroba v tankem črevesu povečeval, pri koruznem obroku kar za 10 %. Ugotovila sta tudi, da se je skoraj ves škrob iz pšenice prebavil v tankem črevesu.

2.4.1.1 Tok škroba skozi tanko črevo

Gidenne in Perez (1993) sta ugotovila, da sta na tok suhe snovi (SS) skozi terminalni del tankega črevesa pri kuncih vplivala dva dejavnika. Prvi je zauživanje krme, ki je bilo v eksperimentalnih pogojih konstantno, drugi pa prebavljivost v tankem črevesu, ki je bila odvisna predvsem od sestave obroka (količine vlaknine in škroba). Ugotovila sta, da je bil tok škroba skozi terminalni del tankega črevesa odvisen od koncentracije škroba v tankem črevesu. Sklepala sta, da na hitrost pretoka in fermentacijo v slepem črevesu lahko vplivamo z izbiro vrste škroba. Hidroliza različnih vrst škroba je v tankem črevesu različno dolga. Že Demigne in Remesy (1982, cit. po Gidenne in Perez, 1993), Drochner, (1991, cit. po Gidenne in Perez, 1993), Levrat in sod., (1991, cit. po Gidenne in Perez, 1993) so poročali, da spremembe v hidrolizi različnih vrst škroba v tankem črevesu neprežvekovalcev spreminjajo količino razpoložljivih fermentirajočih ogljikovih hidratov, ki vstopajo v slepo črevo in lahko vplivajo na fermentacijo v slepem črevesu ter razgradnjo

celičnih sten v njem. Na fermentacijo v slepem črevesu kuncev lahko torej vplivamo bodisi s spremembo količine škroba ali pa krmljenjem različnih vrst škroba.

2.4.1.2 Koeficient prebavljivosti organske snovi (OS)

Gidenne in Perez (1993) sta ugotovila, da je koeficient prebavljivosti organske snovi (OS) odvisen od sestave obroka. Pri obroku, ki je vseboval samo zreli grah, je bila prebavljivost OS 75 %, prebavljivost OS obrokov, ki so vsebovali žita (koruzo in ječmen) pa je bila 71,3 %. Prebavljivost surovih beljakovin (SB) se med obroki ni razlikovala, prebavljivost vlaknine (razgradnja celične stene) pa se je, kljub enakemu izvoru vlaknine (lucerna), med obroki močno razlikovala. Največjo prebavljivost NDV (okrog 40 %) sta izmerila pri obroku s koruzo, najmanjšo pa pri obroku s koruznim škrobom (27 %). Razlike v prebavljivosti vlaknine sta pripisala razlikam v prebavljivosti hemiceluloz (NDV- KDV), ki je bila pri koruzi 54 %, pri koruznem škrobu pa 37 %. Prebavljivost škroba v celotnem prebavnem traktu je bila pri vseh obrokih skoraj popolna, le pri koruznem škrobu je bila nekoliko manjša. Med tankim črevesom in rektumom se je koncentracija škroba zmanjšala za več kot 50 %, razen pri obroku s čistim koruznim škrobom, saj se je škrob prebavil, še preden je prišel v slepo črevo. Količina škroba v terminalnem ileumu se je znatno razlikovala med obroki. Vsebnost škroba v terminalnem ileumu je bila 10 krat večja pri obrokih s koruzo (27 g škroba/kg SS), kot pa pri obrokih s čistim koruznim škrobom (3 g škroba/kg SS). Gidenne in Perez (1993) sta ugotovila tudi statistično značilni razliki med obrokom s čistim koruznim škrobom in ječmenom ter obrokom z grahom in koruzo. Dokazala sta, da je prvi obrok povzročil najnižjo, drugi pa najvišjo koncentracijo škroba v terminalnem ileumu.

Ledin (1984, cit. po Gidenne in Perez, 1993) in Xiccato in Cinetto (1988, cit. po Gidenne in Perez, 1993) so v svojih poskusih uporabili enako sestavljen obrok za rastoče kunce kot Gidenne in Perez (1993) za odrasle kunce in ugotovili večjo prebavljivost škroba v slepem črevesu, kar so pripisali manjšemu zauživanju krme. Učinek vrste škroba na prebavo oziroma na prebavljivost škroba in vlaknin je bil tako pri rastočih kot pri odraslih kuncih podoben (Gidenne in Perez, 1993), saj imajo rastoči kunci že razvit sistem za prebavo

škroba in vlaknine. Tudi pri rastočih kuncih je bil na hidrolizo v tankem črevesu najbolj odporen koruzni škrob.

Svihus in sod. (2005) so ugotovili, da vrsta žita vpliva na razgradnjo škroba v tankem črevesu, kar pomeni, da obstajajo razlike v razgradljivosti različnih izvorov škroba.

2.4.2 Vpliv razmerja med škrobom in vlaknino na prebavljivost HS v slepem črevesu kuncev

Volek in sod. (2004) so primerjali obroke, ki so namesto škroba vsebovali krompirjevo pulpo, pesne rezance ali pšenične otrobe, in spremljali njihov učinek na rast, prebavljivost in zdravstveno stanje rastočih kuncev. Krompirjeva pulpa je vsebovala največ celuloze in najmanj prebavljivih surovih vlaknin (PSV), kamor uvrščamo hemiceluloze in pektinske snovi, pesni rezanci so vsebovali več PSV (pektinov) in manj celuloze, pšenični otrobi pa so vsebovali več hemiceluloz v PSV, več celuloze, SB in SM. Obroki so bili sestavljeni tako, da je bil vnos KDV zadosten. Ugotovili so, da je delna nadomestitev škroba s PSV izboljšala zdravje kuncev, brez večjega poslabšanja rasti kuncev. Povečal se je tok hranil v slepo črevo, saj je prebavljivost NSP v tankem črevesu omejena (Gidenne, 1992). Sprememba sestave obroka je vplivala tudi na spremembo mesta prebave iz tankega črevesa v slepo črevo-kolon (Gidenne in sod., 2000). Zauživanje krme je bilo manjše pri kuncih, ki so imeli v obroku krompirjevo pulpo. To je verjetno povzročilo zastajanje vsebine v slepem črevesu, zaradi česar so kunci zaužili manj krme (Gutierrez in sod., 2002). Prebavljivost SB je bila manjša, BDI pa večja pri kuncih, ki so bili krmljeni s krompirjevo pulpo ali pesnimi rezanci. Ti kunci so bolj učinkovito prebavili tako KDV kot tudi NDV (Gidenne in Jehl, 1996). Črevesna vsebina je bila pri njih viskoznejša in je imela statistično večjo vsebnost HMK. Zauživanje krme je dodatno zniževalo tudi ožje razmerje med KDL in celulozo v obrokih (samo 0,25), o čemer so poročali Gidenne in sod. (2001, cit. po Volek in sod., 2004). Povečana viskoznost vsebine prebavil je upočasnila njen pretok in povečala bakterijsko fermentacijo v slepem črevesu.

Gidenne in Perez (1993) in Gidenne in Bellier (2000) so proučevali vpliv nadomeščanja PSV s škrobom in škroba s PSV na prebavljivost HS. Nekaj avtorjev (Blas in Villamide, 1990, cit. po Gidenne in sod., 2004a) je tudi proučevalo vire PSV, kot so pesni rezanci in pulpa agrumov, da bi z njimi v prehrani kuncev nadomestili žitno zrnje. Ugotovili so, da vloga PSV na prebavljivost pri kuncih lahko variira glede na vsebnost lignoceluloze v obrokih in tudi glede na razmerje med hemicelulozami in pektinskimi snovmi v PSV (Gidenne in Bellier, 2000).

Gidenne in sod. (2004a) so proučevali, kakšna je prebavljivost in hitrost prehoda črevesne vsebine skozi prebavni trakt pri kuncih, ki so jim v obrokih spreminjali vsebnost KDV, NDV in škroba. Poskus so zasnovali tako, da so nadomeščali PSV s škrobom in ugotavljali, kako to vpliva na prebavo, rast in zdravje kuncev. Vsebnost KDV je bila pri prvi skupini obrokov standardna, pri drugi skupini obrokov pa manjša od priporočene (Gidenne, 2003). Pri obrokih z zmanjšano vsebnostjo KDV in pri nadomestitvi PSV s škrobom so opazili statistično značilno izboljšanje prebavljivosti OS, povečala pa se je tudi prebavljivost SB. Najdaljši čas zadrževanja vsebine v celotnem prebavnem traktu je bil 21 ur. Pri obrokih z manjšo vsebnostjo KDV je bil ta čas daljši kot pri obrokih s standardno vsebnostjo KDV. Pri nadomeščanju PSV s škrobom se je čas zadrževanja krme v prebavilih še podaljšal. Na prebavljivost OS sta torej močno vplivala tako vsebnost KDV kot tudi vsebnost škroba v obroku, čeprav med njima avtorji niso izračunali statistično značilnih interakcij. Pri manjšem vnosu KDV so opazili sorazmerno povečanje prebavljivosti OS in energije, povečala pa se je tudi prebavljivost SV in SB. Pri sorazmernem nadomeščanju PSV s škrobom pa se je prebavljivost OS in energije statistično značilno povečala zlasti pri obrokih z večjo vsebnostjo škroba.

Blas in sod. (1990, cit. po Gidenne in Perez, 1993) so pri krmljenju kuncev z ječmenom in koruzo ugotovili, da bi s konstantnim razmerjem med škrobom in vlaknino v obrokih in z zmanjšanjem zauživanja krme v slepo črevo vstopala povečana količina hitro fermentirajočih ogljikovih hidratov (škrob), ki bi stimulirala aktivnost fermentacije in razgradnjo vlaknin v slepem črevesu kuncev.

Gidenne in sod. (1991, cit. po Gidenne in Perez, 1993) so ugotovili, da sta razgradnja vlaknine in vsebnost HMK v slepem črevesu pri rastočih kuncih premosorazmerna. Ugotovili so tudi, da je povečana vsebnost HMK zmanjšala kontrakcije slepega črevesa in kolona, zato so domnevali, da nivo HMK v slepem črevesu kuncev, ki imajo konstanten vnos krme s podobno vsebnostjo vlaknin, vpliva na hitrost prehoda vsebine prebavil skozi slepo črevo.

Jehl in Gidenne (1996) sta primerjala aktivnost mikrobne fermentacije v slepem črevesu kuncev in dnevno produkcijo bakterijske biomase pri obrokih, bogatimi s škrobom in obroki, bogatimi s PSV, pri tem pa je bila vsebnost KDV podobna. Koncentracija HMK v slepem črevesu kuncev je bila znatno višja v skupini kuncev, ki so dobivali obroke, bogate s PSV, v primerjavi z obroki, bogatimi s škrobom. Glede na starost kuncev (44 dni in 72 dni) ni bilo značilnih razlik v koncentraciji HMK. Koncentracija diaminopimelične kisline, ki je specifična sestavina bakterijske stene in jo uporabljajo za kvantitativno določanje vampne flore (Corring in sod., 1972, cit. po Jehl in Gidenne, 1996; Blas in sod., 1988, cit. po Jehl in Gidenne, 1996), je bila ne glede na vrsto obroka dvakrat višja v mehkem kot v trdem blatu kuncev. Povprečna produkcija bakterijske biomase je bila dvakrat večja v skupini kuncev, ki so bili krmljeni s PSV obrokom, kot v skupini, ki je bila krmljena z obrokom, bogatim s škrobom. Kunci, krmljeni z obrokom, bogatim s škrobom, so imeli več prebavnih težav (driska), čeprav je bil vnos KDV podoben pri obeh vrstah obrokov. Zdravstveno stanje se je izboljšalo z delno nadomestitvijo škroba s prebavljivimi vlakninami. Jehl in Gidenne (1996) sta tudi poročala, da je bila koncentracija škroba v slepem črevesu kunca nespremenjena, čeprav je bil vnos škroba v obroku z večjim vnosom prebavljivih vlaknin znatno manjši kot pri obroku z manjšim vnosom prebavljivih vlaknin. Cherbut in sod. (1988, cit. po Jehl in Gidenne, 1996) so poročali o manjši vsebnosti SS v slepem črevesu kuncev pri obrokih, ki so vsebovali PSV. Prebavljive vlaknine imajo namreč veliko sposobnost vezave vode, kar prispeva tudi k povečanju prostornine vsebine slepega črevesa.

2.4.3 Obseg prebave različnih vrst škrob vsebujočih krmil v slepem črevesu kuncev

Walker (1993, cit. po Lozej, 2006) je ugotovil, da netopna vlaknina skrajšuje čas prehoda krme skozi prebavila, povečuje maso blata, povzroča mehkejše blato in zmanjšuje absorpcijo glukoze ter hidrolizo škroba. Žitna zrna so še posebno bogata z netopno vlaknino; največja vsebnost le te pa je v pšenici in koruzi (Davidson in McDonald, 1998). Po drugi strani pa topna vlaknina podaljšuje prehod HS skozi prebavila, praznjenje prebavil je počasnejše, počasnejša pa je tudi absorpcija glukoze. Topna vlaknina se v debelem črevesu skoraj v celoti razgradi do HMK (Walker, 1993, cit. po Lozej, 2006).

2.4.4 Mikrobna fermentacija ogljikovih hidratov v prebavnem traktu kuncev

Fermentacija, ki poteka v slepem in debelem črevesu kuncev, je odvisna od gostitelja (starost, imunost, stres) in substrata. V kolikšni meri fermentirajo ogljikovi hidrati, ki so prisotni v slepem črevesu kuncev, je odvisno od kompleksnosti ogljikovih hidratov in od vrste bakterij, ki v mikroflori prevladujejo. Po začetni kolonizaciji novorojene živali (ob rojstvu) ostaja bakterijska populacija prebavnega trakta v času sesanja v glavnem stabilna. Kunci imajo pred odstavitvijo mikrofloro, v kateri prevladujejo bifidobakterije in laktobacili. Ta populacija je značilna za živali, krmljene z mlekom, in se postopno spreminja v bakterijsko populacijo odraslih živali, kjer prevladujejo enterobakterije in anaerobne bakterije. Ta sprememba se začne, ko živali prično zauživati trdo krmo. S spremembo v bakterijski populaciji, ki je odvisna od sestave obroka, se istočasno začne tudi sprememba količine in razmerja končnih produktov. Mikroflora, značilna za odrasle kunce, se med odstavitvijo in po odstavitvi hitro razvije in prilagodi obrokom, ki vsebujejo ogljikove hidrate kot so pektini, hemiceluloze in rezistentne oblike škroba. Ti se ne prebavijo-absorbirajo v tankem črevesu, ampak fermentirajo šele v slepem črevesu kuncev (Kermauner in Lavrenčič, 2005).

Gouet in Fonty (1979, cit. po Jehl in Gidenne, 1996) sta ugotovila, da pri kuncih obstajajo razlike v vrsti mikroorganizmov med mladimi (4 do 6 tednov) in odraslimi živalmi, s tem pa tudi razlike v mikrobni aktivnosti v slepem črevesu. Candau in sod. (1978, cit. po Jehl

in Gidenne, 1996) in Bellier (1994, cit. po Jehl in Gidenne, 1996) pa so ugotovili, da na spremembe v mikrobnih aktivnostih v času rasti kunca lahko vpliva tudi sestava obroka.

Kermauner in Lavrenčič (2005) sta proučevala, kolikšna je *in vitro* produkcija plina šestih različnih substratov (škroba, pektina, ksilana, celuloze, sestavljene krmne mešanice in vlaknine, pripravljene iz te sestavljene krme) pri kuncih ob odstavitvi in pri klavno zrelih kuncih. Ugotovila sta, da se celokupna produkcija plina ni razlikovala med substrati, razen pri škrobu, kjer je bila fermentacija pri klavno zrelih kuncih večja kot pri odstavljenih kuncih (Kermauner in Lavrenčič, 2005).

Tao in Li (2006) sta ugotovila, da so se s povečevanjem zauživanja NDV (nad 300 g/kg telesne teže) koeficienti prebavljivosti energije, SB, SV in SM zmanjšali, koeficient prebavljivosti NDV pa se je povečal.

Kermauner in Lavrenčič (2008) sta določala kazalnike kinetike produkcije plina *in vitro* z uporabo inokulumov, pripravljenih iz vsebine slepega črevesa klavno zrelih kuncev. Inkubirala sta tri različne substrate: ječmen, pesne rezance in pšenične otrobe v vsebini slepega črevesa kuncev, ki so dobivali krmo z dodatkom kostanjevih taninov ali brez njih. Fermentacija je bila največja pri pesnih rezancih (ki vsebujejo največ pektina), najmanjša pa pri ječmenu (ki vsebuje več škroba). Kostanjevi tanini so v slepem črevesu zavirali fermentacijo.

Jehl in Gidenne (1996) sta primerjala mikrobnost, fermentacijo in produkcijo biomase v slepem črevesu pri dveh skupinah kuncev. Prvo skupino kuncev sta krmila z obrokom, bogatim s škrobom, drugo pa z obrokom, bogatim s PSV. Povprečna produkcija bakterijske biomase je bila dvakrat večja v skupini kuncev, ki je bila krmljena s PSV, kot v skupini, ki je bila krmljena z obrokom, bogatim s škrobom.

2.4.5 Tvorba HMK

Tvorba HMK v prebavilih kuncev je tesno povezana s tvorbo plina (CO₂). Pri večji količini HMK nastane tudi več plina (Parker, 1976, cit. po Kermauner, 1994).

HMK sestavljajo kratkoverižne maščobne kisline, kot so očetna, propionska in maslena kislina. Te kisline nastanejo pri bakterijski fermentaciji ogljikovih hidratov v slepem črevesu (Parker, 1976, cit. po Kermauner, 1994). Največja koncentracija HMK pri kuncih je v slepem črevesu, saj v njem najbolj intenzivno poteka bakterijska fermentacija.

Marounek in sod. (1995, cit. po Piattoni in sod., 1997) so raziskovali fibrolitično aktivnost mikroorganizmov v slepem črevesu pri rastočih kuncih in poročali o največji aktivnosti pektinolitičnih, ki jim sledi ksilanolitična in nato celulozitična aktivnost mikroorganizmov. Pri encimski razgradnji so nastale HMK, ki so bile v glavnem absorbirane v debelem črevesu in predstavljajo glavni vir energije za kunce. Izmed HMK je nastalo največ očetne kisline (70 do 80 %), ki ji je sledila maslena (10 do 20 %) in propionska (4 do 8 %). Takšno razmerje HMK v slepem črevesu je značilno za kunce (Piattoni in sod., 1997).

Za fermentacijo, ki poteka v slepem in debelem črevesu kuncev, je poleg metanogeneze značilna tudi reduktivna acetogeneza, medtem ko se pri prežvekovalcih vrši v glavnem metanogeneza (Demeyer, 1991, cit. po Piattoni in sod., 1997). Pomen reduktivne acetogeneze med *in vitro* fermentacijo slepega črevesa kuncev variira v odvisnosti od starosti in pasme kuncev (Piattoni in sod., 1997).

2.4.6 Vpliv škroba na zdravstveno stanje kuncev

Že dolgo je znano, da so kunci dovzetni za pojav prebavnih motenj. Cheeke in Patton (1980, cit. po Gidenne in Perez, 1993) in Blas in sod. (1994, cit. po Jehl in Gidenne, 1996) so najprej mislili, da so obroki z veliko vsebnostjo škroba povečevali pogostost prebavnih težav, kot so sluz v izločku, driske, pa tudi pogin zaradi akutne driske. Prav tako so tudi Morisse in sod. (1985, cit. po Gidenne in Perez, 1993) mislili, da je preobremenitev

prebavnega trakta s hitro fermentirajočimi ogljikovimi hidrati glavni vzrok enteritsov pri rastočih kuncih.

Kasneje so Parigi Bini in sod. (1990, cit. po Jehl in Gidenne, 1996) poročali, da zdravje kuncev ni bilo odvisno od količine škroba v obroku, pač pa je večja pogostost prebavnih motenj pri kuncih, krmljenih s krmo z veliko vsebnostjo škroba, izvirala iz večje vsebnosti le-tega v slepem črevesu (Cheeke in Patton, 1980, cit. po Jehl in Gidenne, 1996). Vnos glukoze v slepo črevo je namreč stimuliral razvoj patogenih vrst bakterij kot so *Clostridium spiriforme* (Borriello in Carman, 1983, cit. po Jehl in Gidenne, 1996). Večji vnos škroba v slepo črevo je bil problematičen zlasti pri mladih kuncih (Peeters in sod., 1993, cit. po Gidenne in Jehl, 1996), saj pri njih še ni popolnoma razvita endogena amilolitična aktivnost encimov tankega črevesa.

Blas in sod. (1994, cit. po Jehl in Gidenne, 1996) so ugotovili, da tvorbo maslene kisline (ena izmed HMK), ki zavira peristaltiko črevesa, lahko omejimo z večjim vnosom SV. Pri krmi z malo SV je kar 45 % vse energije izviralo iz maslene kisline, pri krmi z veliko SV pa le 36 %. Maslena kislina v veliki količini ni priporočljiva. Sklepali so, da je vloga dnevnega vnosa vlaknin na preprečitev prebavnih težav pri rastočih kuncih zelo pomembna.

Nato so Gidenne in sod. (1998b, cit. po Gidenne, 2003) ugotovili, da se je zdravstveno tveganje (pogin in obolevnost) povečalo z 18 % na 28 %, ko se je vnos KDV z dnevnim obrokom zmanjšal z 19 % na 15 %. Učinek KDV je bil v veliko večji meri odvisen od vnosa lignina (KDL) kot od vnosa celuloze. Večji vnos ligninov zmanjšuje pogin in obolevnost, hkrati pa močno zmanjša prebavljivost krme, spremljano z zmanjšanjem časa zadrževanja vsebine v slepem črevesu (Gidenne in Perez, 1994, cit. po Kermauner, 2005; Perez in sod., 1994, cit. po Kermauner, 2005). Celuloza ima podobne učinke, vendar se zdi, da je manj pomembna (Gidenne in Perez, 1996, cit. po Kermauner, 2005).

Jehl in Gidenne (1996) sta ugotovila, da je nadomeščanje škroba s PSV pospešilo fermentativno in mikrobnost aktivnost mikroflore slepega črevesa brez večjega vpliva na

hitrost prehoda vsebine skozi slepo črevo in rektum. PSV, kot so pektini (pesni rezanci-galakturonske kisline) in hemiceluloze (pšenični otrobi- pentoze), ki vstopajo v slepo črevo, fermentirajo do HMK. Njihova razgradnja je povečala fermentativno aktivnost mikroflore slepega črevesa in produkcijo biomase, kar pripomore k boljšemu zdravstvenemu stanju kuncev. Pri obrokih, bogatih s PSV, je bil nivo glukoze v slepem črevesu manjši kot pri obrokih, bogatih s škrobom, manjši nivo glukoze v slepem črevesu pa stimulira simbiotično floro. Kunci, krmljeni z večjim deležem PSV v obroku, so bili bolj zdravi kot tisti, ki so bili krmljeni z obrokom z več škroba (Parigi Bini in sod., 1990, cit. po Jehl in Gidenne, 1996). Sprememba v sestavi obroka lahko spremeni vsebino slepega črevesa in posledično lahko vpliva na razvoj patogene mikroflore in njeno aktivnost. Na splošno velja, da aktivna simbiotična mikroflora lahko prepreči razvoj patogene mikroflore (zaviralni učinek). Pomanjkanje vlaknin vodi v manjšo fermentativno aktivnost simbiotične flore slepega črevesa, kar povzroča prebavne motnje (Jehl in Gidenne, 1996).

Količina HMK, ki nastane pri bakterijski fermentaciji v slepem črevesu kunca, je močno odvisna od sestave krme, predvsem od vsebnosti SV in lahko topnih ogljikovih hidratov. Zaradi tvorbe HMK v slepem črevesu so kunci naravno odporni proti prebavnim motnjam (Prohaszka, 1980, cit. po Kermauner, 1994). HMK inhibirajo rast *E. coli* v slepem črevesu. Takšen zaviralni učinek je možen pri pH od 5,8 do 6,5. Kislost vsebine slepega črevesa je odvisna tudi od tvorbe HMK. Kadar tvorba HMK ni zadostna, se pH vrednost v slepem črevesu dvigne nad normalno in takšno okolje ne učinkuje več zaviralno na nezaželene mikroorganizme. HMK znižujejo pH, s tem pa učinkujejo zaviralno na razvoj patogenih mikroorganizmov in tako preprečujejo pojav drisk. Pojav drisk preprečujejo tudi zato, ker pospešujejo prehajanje kationov (predvsem Na⁺) v celice, s tem pa tudi zagotavljajo močan mehanizem za absorpcijo vode iz vsebine kolona (Vernay, 1986, cit. po Kermauner, 1994). Sinteza beljakovin iz amonijaka poteka v glavnem v slepem črevesu in kolonu (Makkar in Singh, 1987, cit. po Kermauner, 1994). Za sintezo beljakovin iz amonijaka mikrobi potrebujejo energijo, ki izhaja predvsem iz ogljikovih hidratov. Makkar in sod. (1990, cit. po Kermauner, 1994) so pri dodajanju sečnine v krmo ugotovili povečano celulazno in deloma tudi amilazno aktivnost v slepem črevesu. Ker pa mikrobi potrebujejo

ogljikove hidrate tudi za tvorbo HMK, morajo za isti substrat tekmovati. V takšnih pogojih nastaja presežek amonijaka, pH črevesne vsebine se dvigne, kar pa zavira delovanje bakterij, ki tvorijo HMK. Povečevanje bazičnosti omogoča razvoj kolibacilov, ki povzročajo driske (Kermauner, 1994).

Tudi Gidenne in sod. (2004a) so ugotovili, da se je pojav akutne driske pri obrokih, ki so vsebovali veliko vsebnost lignoceluloze (KDV), statistično značilno zmanjšal, tako med odstavljenimi kot tudi klavno zreli kuncu. Nadomeščanje PSV s škrobom pri enaki vsebnosti KDV v obrokih ni imelo pomembnejšega učinka na ta pojav. Licois in Gidenne (1999, cit. po Gidenne in sod., 2004a) sta ugotovila, da ima vlaknina ugoden učinek na zmanjšanje pojava nekaterih specifičnih črevesnih obolenj pri kuncih. Potreba po vlaknini je pri kuncih posebno izražena po odstavitvi. Nizka vsebnost vlaknine je pogosto povzročala prebavne motnje, čeprav niso identificirali specifičnih patogenih povzročiteljev.

Gidenne in sod. (2004b) so poročali, da je zadostna preskrba s KDV in velika vsebnost PSV v dnevnom obroku skrajšala zadrževalni čas in povečala produkcijo bakterijske biomase v slepem črevesu. Povečalo se je dozorevanje mikrobov in s tem mikroba aktivnost pri mladih kuncih, pojav driske pa se je zmanjšal. Gidenne in sod. (2004a) so se ukvarjali z vprašanjem deleža pektinov v PSV in z njihovim izvorom (iz pesnih rezancev ali citrusove pulpe). Ugotovili so, da je pomembno tudi razmerje med PSV in KDV, saj prevelika vsebnost pektinov in hemiceluloz z ozirom na lignine in celulozo (razmerje med PSV in KDV) v dnevnom obroku krme ni priporočljiva, če želimo zagotoviti zdravje prebavnega trakta kuncev v dobi rasti (Gidenne, 2003).

V zadnjem času so De Blas in Mateos (1998, cit. po Kermauner, 2005) in Gidenne (2000, 2003) dognali, da je potrebno upoštevati najnovejša priporočila dnevnega vnosa škroba, KDV in razmerja med PSV in KDV v sestavljenem krmnem obroku pri odstavljenih in rastočih kuncih: manj kot 140 g škroba/kg SS pri odstavljenih kuncih in manj kot 180 g škroba/kg SS pri kuncih, ki so starejši od 45 dni, ter več kot 190 g KDV/kg SS pri odstavljenih kuncih in več kot 170 g KDV/kg SS pri kuncih, ki so starejši od 45 dni.

Razmerje med PSV in KDV pa naj bi bilo manjše od 1,3 ne glede na starost kuncev. Ugotovili pa so tudi to, da je poleg naštetega pomemben tudi vnos KDL. Pri odstavljenih kuncih priporočajo več kot 55 g KDL/kg SS, pri starejših od 45 dni pa več kot 50 g KDL/kg SS. Vrsta škroba v obroku in tehnološko pravilno pripravljena in odmerjena krmna mešanica, pripravljena po najnovejših priporočilih, lahko bistveno pripomore k preprečevanju prebavnih težav v slepem črevesu kuncev (Gidenne in Perez, 1993).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SUBSTRATI

V poskusu smo uporabili mleto koruzo, mleto pšenico, kuhan krompir in surov krompir, njihova kemijska sestava je podana v preglednici 3. Vse vzorce smo pred začetkom *in vitro* inkubacije zmleli na velikost delcev 1 mm.

Preglednica 3: Kemijska sestava uporabljenih substratov

	g/kg SS	g SB/kg SS	g SM/kg SS	g SV/kg SS	g SP/kg SS	g BDI/kg SS
Koruza	871	78,11	33,74	27,89	12,48	847,79
Pšenica	883	117,71	12,04	35,76	17,86	816,64
Krompir surov	206	95,23	0,49	43,63	51,30	809,36
Krompir kuhan	208	98,49	2,22	34,84	49,64	814,81

Poleg substratov navedenih v preglednici 3, smo uporabili še škrob, izoliran iz pšenice (Sigma S5127, 884 g/kg SS), krompirja (Sigma S4251, 865 g/kg SS) in koruze (Sigma S4126, 881 g/kg SS).

3.2 IN VITRO FERMENTACIJA

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

3.2.1 Priprava inokuluma iz vsebine slepega črevesa kuncev

Za pripravo inokuluma iz vsebine slepega črevesa kuncev smo uporabili metodo, ki so jo opisali Calabro in sod. (1999). Žrtvovali smo dva 78 dni stara novozelandska bela kunca (slovenska mesna linija SIKA), ki sta bila od odstavitve krmljena po volji 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 kuncema odvzeli krmo, vodo pa smo jima pustili še vedno na razpolago. Po zakolu smo kuncema odstranili prebavila, slepi črevesi pa na obeh koncih prevezali z najlonsko vrvico, da smo preprečili iztok in pomešanje vsebine slepega črevesa z vsebino preostalega dela prebavil. Slepi črevesi smo v plastični posodi v nekaj minutah prenesli v *in vitro* laboratorij. Vsebini slepih čreves smo stisnili v predhodno ogreto (39 °C) in s CO₂ prepihovano čašo ter vsebini z mešanjem homogenizirali.

3.2.2 Izvedba *in vitro* fermentacije

Čiste in osušene brizgalke smo oštevilčili in vanje zatehtali približno 175 mg substrata. Vsak substrat smo zatehtali v štiri brizgalke. 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 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.

Preglednica 4: Sestava puferskih raztopin A, B in C (Golob, 2010)

Raztopina A	Raztopina B	Raztopina C
13,2 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	35,0 g NaHCO_3	5,7 g Na_2HPO_4
10,0 g $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	4,0 g $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$	6,2 g KH_2PO_4
1,0 g $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	deionizirana voda do 100 ml	0,6 g $\text{MgSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$
0,8 g $\text{FeCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$		deionizirana voda do 100 ml
deionizirana voda do 100 ml		

Pri pripravi inokuluma iz vsebine slepega črevesa kuncev smo najprej pripravili 250 ml čašo s pufrom brez redukcijske raztopine. Ob prepihanju s CO_2 smo v čašo zatehtali potrebno količino vsebine slepega črevesa in vse skupaj premešali na magnetnem mešalu s termostatom. Homogenizirano vsebino slepega črevesa in pufra smo filtrirali skozi 4 plasti gaze v drugo 250 ml čašo in ostanek vsebine slepega črevesa na gazi prelili z manjšo količino pufra. Filtrat smo nato prenesli v 2 l steklenico s preostankom pufra, ki smo mu predhodno dodali redukcijsko raztopino (preglednica 5). Tako pripravljen inokulum smo prepihovali s CO_2 še 15 minut pod pritiskom enega bara.

Preglednica 5: Sestava resazurina, redukcijske raztopine in končnega pufra

Raztopina resazurina	Redukcijska raztopina	Pufer*
100 g 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 pufra zadošča za 50 brizgalk

S tako pripravljenim inokulumom iz vsebine slepega črevesa 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 senom (standard), za spremljanje aktivnosti inokulumov, pripravljenih iz vsebine slepega črevesa kunca. Prostornine nastalega plina smo odčitali po 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 in 72 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 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke o prostornini nastalega plina ob različnem trajanju inkubacije smo za statistično obdelavo pripravili v programu Microsoft Excel. Vse podatke smo korigirali s prostornino plina, nastalega iz slepega vzorca ob danem času inkubacije. Dobljene vrednosti smo korigirali še na vsebnost SS substratov.

3.3.1 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 (2001). Iz ocenjenih kazalnikov Gompertzovega modela smo izračunali največjo hitrost fermentacije (MFR; ml/h), čas, ko je hitrost fermentacije največja (TMFR; h). Prostornino plina, nastalega v 10 urah (GAS_{10}) fermentacije, smo izračunali tako, da smo v Gompertzov model vstavili čas inkubacije 10 ur.

Čas, ko je bila hitrost fermentacije največja (TMFR), smo izračunali z drugim odvodom Gompertzovega modela po času (t), 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 ozračunali tako, da smo vstavili ustrezno vrednost TMFR v enačbo prvega odvoda Gompertzovega modela po času (t):

$$\frac{dy}{dt} = BCA \times e^{-At} e^{-C e^{-At}}$$

3.3.2 Statistični model

Statistično značilne razlike med substrati za spremenljivke B, A, C, MFR, TMFR in GAS₁₀ smo izračunali s statističnim modelom:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + e_{ij},$$

kjer so:

Y_{ij} = kazalnik fermentacije (B, C, A, MFR, TMFR, GAS₁₀)

μ = povprečna vrednost

S_i = vrsta substrata (koruzni škrob, pšenični škrob, krompirjev škrob, mleta koruza, mleta pšenica, kuhan krompir in surov krompir)

e_{ij} = ostanek

4 REZULTATI

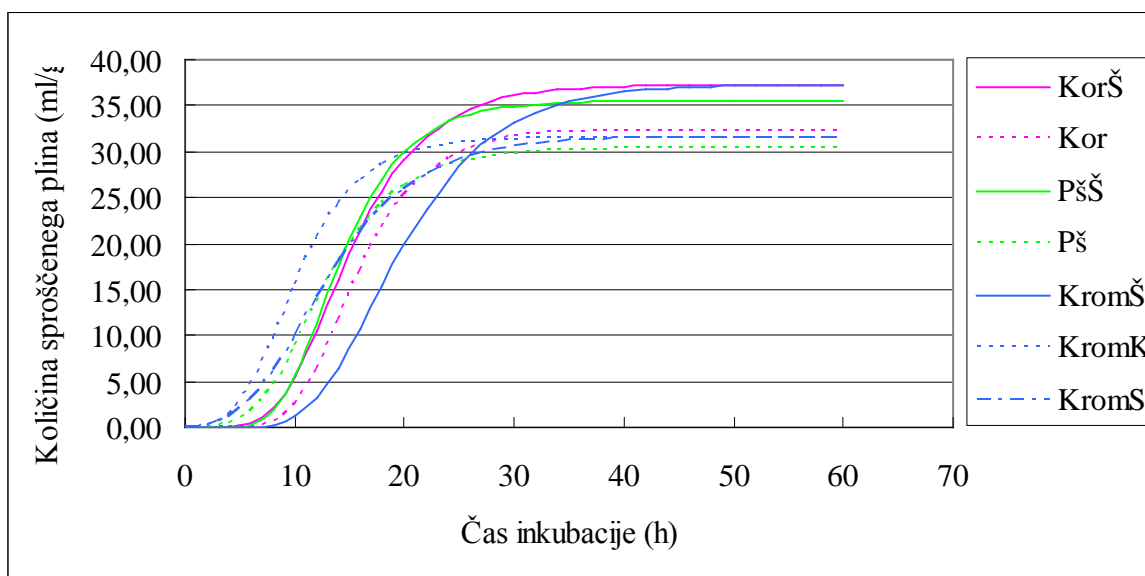
V preglednicah 6 in 7 so prikazani kazalniki fermentacije škrobov v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev.

Preglednica 6: Ocenjeni kazalniki fermentacije različnih škrob vsebujočih substratov v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev (povprečje)

Vzorec	B (ml/g SS)	C	A
Koruzni škrob	37 ^a	15,11 ^{bc}	0,206 ^{bcd}
Pšenični škrob	35 ^a	19,89 ^{ab}	0,238 ^{ab}
Krompirjev škrob	37 ^a	18,59 ^{ab}	0,169 ^d
Koruza	32 ^b	26,37 ^a	0,233 ^{ab}
Pšenica	30 ^b	10,47 ^{cd}	0,215 ^{abc}
Krompir surov	32 ^b	6,80 ^d	0,178 ^{cd}
Krompir kuhan	31 ^b	8,74 ^{cd}	0,253 ^a

^{a, b, c, d, e} vrednosti v stolpcih, ki so označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$)
B= skupna potencialna produkcija plina, C= specifična hitrost fermentacije, A= faktor mikrobne (ne)učinkovitosti

Iz dobljenih podatkov iz preglednic 6 in 7 smo narisali kumulativne krivulje poteka *in vitro* fermentacije vseh substratov v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev (slika 4), in krivulje hitrosti fermentacije (slika 5).

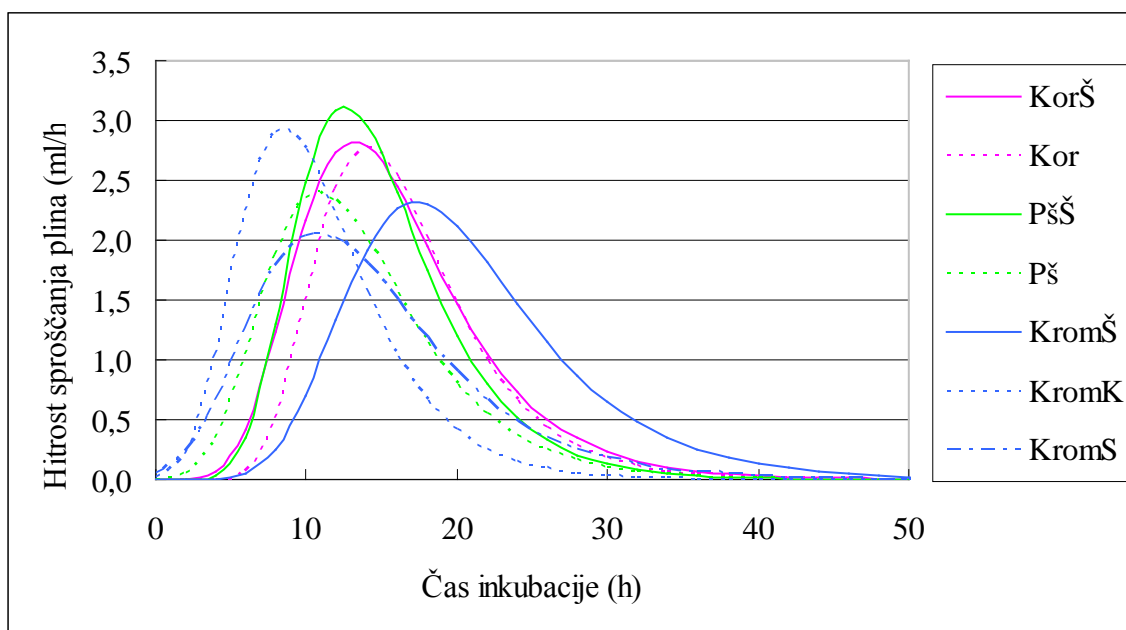


Slika 4: Sproščanje plina pri fermentaciji v inokulumu iz vsebine slepega črevesa kunccev (KorŠ= koruzni škrob, PšŠ= pšenični škrob, KromŠ= krompirjev škrob, Kor= mleta koruza, Pš= mleta pšenica, KromK= kuhan krompir in KromS= surov krompir)

Preglednica 7: Izračunani kazalniki fermentacije različnih škrob vsebujočih substratov v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kunccev (povprečje)

Vzorec	MFR (ml/h)	TMFR (h)	GAS ₁₀ (ml/g SS)
Koruzni škrob	2,8 ^{ab}	13,2 ^{bc}	5 ^c
Pšenični škrob	3,1 ^a	12,4 ^c	6 ^c
Krompirjev škrob	2,3 ^{cd}	17,2 ^a	1 ^d
Koruza	2,8 ^{abc}	14 ^b	3 ^d
Pšenica	2,4 ^{bcd}	10,9 ^d	9 ^b
Krompir surov	2,1 ^d	10,7 ^d	10 ^b
Krompir kuhan	2,9 ^a	8,5 ^e	16 ^a

^{a, b, c, d, e} vrednosti v stolpcih, ki so označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo ($p \leq 0,05$)
MFR= največja hitrost fermentacije, TMFR= čas, v katerem je bila dosežena fermentacija, GAS₁₀= količina sproščenega plina v 10 urah inkubacije



Slika 5: Hitrost fermentacije v inokulumu iz vsebine slepega črevesa kunccev (KorŠ= koruzni škrob, PšŠ= pšenični škrob, KromŠ= krompirjev škrob, Kor= mleta koruza, Pš= mleta pšenica, KromK= kuhan krompir in KromS= surov krompir)

Skupna produkcija plina (kazalnik B) je bila najmanjša pri fermentaciji pšenice (30 ml/g SS), največja pa je bila pri fermentaciji krompirjevega škroba (37 ml/g SS) in koruznega škroba (37 ml/g SS). Ugotovili smo, da se je več plina tvorilo pri čistih škrobih (koruzni škrob, pšenični škrob, krompirjev škrob) kot pri škrobnatih krmilih. Razlike v tvorbi plina (kazalnik B) so bile statistično značilne med čistimi škrobi in krmili, ki vsebujejo tak škrob: pri koruznem škrobu v primerjavi s koruzo ($P < 0,05$), pri pšeničnem škrobu v primerjavi s pšenico ($P < 0,05$) in ob fermentaciji krompirjevega škroba v primerjavi s kuhanim ali surovim krompirjem ($P < 0,05$). Vidno je, da je iz izoliranih škrobov nastajalo več plina kot iz ostalih krmil.

Specifična hitrost fermentacije (kazalnik C) je bila najmanjša ob fermentaciji surovega krompirja (6,80), nekoliko večja ob fermentaciji kuhanega krompirja (8,74), največja pa ob fermentaciji mlete koruze (26,37).

Faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (kazalnik A) je bil največji ob fermentaciji kuhanega krompirja (0,253), nekoliko manjši ob fermentaciji pšeničnega škroba (0,238) in mlete

koruze (0,233), najmanjši pa ob fermentaciji surovega krompirja (0,178) in krompirjevega škroba (0,169).

Potek fermentacije substratov nam poleg ocenjenih kazalnikov (kazalniki B, C in A) omogočajo opisati tudi naknadno izračunani kazalniki, kot so največja hitrost fermentacije (MFR), čas, ko je dosežena največja hitrost fermentacije (TMFR), in količina plina, nastalega v 10 urah fermentacije (GAS_{10}).

Največjo hitrost fermentacije (MFR) smo izračunali pri pšeničnem škrobu (3,1 ml/uro), nekoliko manjšo pri kuhanem krompirju (2,9 ml/uro), najmanjšo pa pri surovem krompirju (2,1 ml/uro). MFR je bila večja pri pšeničnem škrobu (3,1 ml/h) v primerjavi s pšenico (2,4 ml/h), pri krompirjevem škrobu pa je bila MFR manjša (2,3 ml/h) v primerjavi s kuhanim krompirjem (2,9 ml/h), pri koruzi pa ni bilo razlike.

Čas, pri katerem je bila dosežena največja hitrost fermentacije (TMFR), je bil pri fermentaciji kuhanega krompirja najkrajši (8,5 ur), pri fermentaciji surovega krompirja nekoliko daljši (10,7 ur), najdaljši pa pri fermentaciji krompirjevega škroba (17,2 ur). Pri primerjavi izolatov in krmil smo ugotovili, da je bil TMFR pri fermentaciji pšenice (10,9 ur) krajši kot pri fermentaciji pšeničnega škroba (12,4 ur), prav tako je bil TMFR kuhanega (8,5 ur) in surovega krompirja (10,7 ur) krajši kot TMFR pri fermentaciji krompirjevega škroba (17,2 ur). Razlika med TMFR pri fermentaciji koruznega škroba (13,2 ur) in TMFR pri fermentaciji koruze (14 ur) ni bila statistično značilna.

V prvih 10 urah fermentacije (Gas_{10}) se je pri fermentaciji kuhanega krompirja tvorilo največ plina (16 ml/g SS), nekoliko manj pri surovem krompirju (10 ml/g SS), še manj pri pšenici (9 ml/g SS), najmanj pa pri krompirjevem škrobu (1 ml/g SS). Pri primerjavi izolatov in krmil smo ugotovili, da je bila količina plina, nastalega v 10 urah fermentacije (GAS_{10}), manjša pri koruzi (3 ml/g SS) kot pri koruznem škrobu (5 ml/g SS), večja pri kuhanem (16 ml/g SS) in surovem krompirju (10 ml/g SS) kot pri krompirjevem škrobu (1 ml/g SS) ter večja pri pšenici (9 ml/g SS) kot pri pšeničnem škrobu (6 ml/g SS).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kakšne so razlike v fermentaciji različnih vrst škrobnatih krmil in škroba, izoliranega iz teh krmil, inkubiranih v inokulumu slepega črevesa kunca. Merili smo količino plina, ki se je tvorila ob fermentaciji škrobnatih krmil (mleta koruza, mleta pšenica, kuhan in surov krompir) in škroba, izoliranega iz teh krmil (čisti koruzni škrob, čisti pšenični škrob, krompirjev škrob) v 72 urah inkubacije.

Ugotovili smo, da so na hitrost razgradnje škroba vplivali tako vrsta substrata (pšenica, koruza, krompir) kot tudi izolacija škroba iz teh substratov (pšenični škrob, mleta pšenica).

Škrob je pomembna sestavina obrokov za kunce. Takšni obroki vsebujejo okrog 200 g škroba/kg SS. Mnenja glede učinka škroba na mikrobnno fermentacijo v slepem črevesu kunca so različna. Blas in sod. (1994, cit. po Lavrenčič, 2006) so domnevali, da se znatni delež koruznega škroba izogne prebavi v tankem črevesu in povzroča nezaželeno fermentacijo in rast mikroflore v slepem črevesu kuncev, le ta pa vodi k dvigu obolenja in pogina kuncev. Gutierrez in sod. (2002) so ugotovili, da je vir škroba pomemben dejavnik. Nadomeščanje pšeničnega škroba z graham namreč vodi v povečanje koncentracije škroba v terminalnem ileumu, zato je večina tega škroba fermentirala v slepem črevesu. Padilha in sod. (1995, cit. po Lavrenčič, 2006) so našli veliko število amilolitičnih mikroorganizmov v slepem črevesu kunca in dokazali, da so mikrobi slepega črevesa sposobni prebaviti škrob.

Tudi Lavrenčič (2006) je sklepal, da nekaj škroba le pride v slepo črevo, saj je bila *in vitro* fermentacija škroba večja pri kuncih v klavni zrelosti kot pri odstavljenih kuncih.

Po drugi strani pa so raziskave pokazale, da je bila količina škroba, ki je prešla skozi tanko črevo, nizka in konstantna (okrog 1,5 g/dan) ne glede na vsebnost KDV v krmu (Gidenne in sod., 2000) in tudi ne glede na vsebnost in kakovost zaužitega škroba (Gidenne in sod.,

2004a, 2004b). Škrob po mnenju številnih avtorjev nima pomembnejše vloge v slepem črevesu pri oblikovanju mikrobne aktivnosti, PSV imajo pri tem mnogo večji pomen.

Lavrenčič (2006) je ugotovil, da je škrob sicer fermentiral *in vitro* v inokulumu, pripravljenem iz slepega črevesa kunca, vendar je bila v 10 urah v slepem črevesu fermentirana le zelo majhna količina škroba. Škrob je največjo hitrost fermentacije (TMFR) dosegel šele v 22,6 ure. Podobno dolžino TMFR (med 11,6 in 14,6 ur) so določili tudi Awati in sod. (2005, cit. po Lavrenčič, 2006), ki so pšenični škrob inkubirali v inokulumu, pripravljenem iz blata prašičev. Tudi če predpostavimo, da je TMFR v »*in vivo*« pogojih krajši, so ti časi vseeno predolgi, da bi bila omogočena obširna škrobna fermentacija v slepem črevesu kunca.

Glede na to, da je čas zadrževanja prebavne vsebine v slepem črevesu omejen na približno 10 ur (Gidenne in sod., 2000), je bil edini substrat, ki je v našem poskusu intenzivno fermentiral kuhan krompir, ki je dosegel MFR že po 8,5 urah. Ta substrat je imel tudi relativno visoko MFR (2,9 ml/uro). Večjo MFR (3,1 ml/h) je imel le še pšenični škrob, vendar pa je bil TMFR daljši od 10 ur (12,4 ur). Surov krompir je imel TMFR 10,7 ure, vendar pa je bila njegova MFR najmanjša od vseh uporabljenih substratov (2,1 ml/uro).

Največja hitrost fermentacije (MFR) je bila pri pšeničnem škrobu in je bila za 0,18 ml/h večja kot pri kuhanem krompirju, vendar pa je bila pri pšeničnem škrobu dosežena šele po 12,4 urah (TMFR), pri kuhanem krompirju pa že po 8,5 urah (TMFR). Pri kuhanem krompirju je bila največja hitrost fermentacije (MFR) za 0,7 ml/h večja kot pri surovem krompirju, ki je imel najmanjšo MFR od vseh škrobnih substratov.

Mogoče so bile razlike v TMFR in MFR med koruznim škrobom in koruzo manjše, ker je bilo v koruzi zelo veliko škroba. V koruzi so bile še beljakovine, vendar jih je bilo v pšenici precej več.

V našem poskusu smo ugotovili, da je bil TMFR pri mleti pšenici krajši kot pri mleti koruzi. Tudi Lanzas in sod. (2007) so v vampu goveda prišli do podobnih ugotovitev, saj se je začela fermentacija pšenice in ječmena prej kot fermentacija koruze in sirka.

Razlike v poteku fermentacije škrobnatih krmil in škroba, izoliranega iz teh krmil, so bile statistično značilne pri večini obravnavanih substratov. Le ob fermentaciji kuhanega krompirja je bila MFR dosežena v manj kot 10 urah (8,5 ure), bila pa je tudi največja in najbolj intenzivna (2,9 ml/h) med vsemi uporabljenimi substrati. V prvih 10 urah inkubacije, ki predstavljajo normalno zadrževanje krme v slepem črevesu (Gidenne in sod., 2000), se je tvorila največja količina plina pri inkubaciji kuhanega krompirja (16 ml/g SS), potem pri inkubaciji surovega krompirja (10 ml/g SS), mlete pšenice (9 ml/g SS), najmanjša količina plina pa se je tvorila pri inkubaciji krompirjevega škroba (1 ml/g SS).

Obseg fermentacije po 10 urah inkubacije (GAS_{10}), ki odgovarja povprečnemu času zadrževanja prebavne vsebine v slepem črevesu kunca (Gidenne in sod., 2000) je bil največji pri kuhanem krompirju in je bil za 6 ml/g SS večji kot pri surovem krompirju (pri njem se je tvorilo največ plina takoj za kuhanim krompirjem) in za 15 ml/g SS večji kot pri krompirjevem škrobu (pri njem se je tvorilo najmanj plina).

Obseg fermentacije po 10 urah inkubacije (GAS_{10}), čas, ko je bila dosežena največja hitrost fermentacije (TMFR), in faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (kazalnik A) so bili pri kuhanem krompirju statistično različni ($p < 0,05$) od vseh ostalih uporabljenih substratov.

V poskusu smo ugotovili, da je imel kuhan krompir najboljše rezultate v večini kazalnikov kinetike fermentacije. Ugotovili smo namreč, da je čas, ki je bil potreben, da je bila dosežena največja hitrost fermentacije, najkrajši pri kuhanem krompirju, po 8,5 urah (TMFR). V 10 urah inkubacije, kar ustreza povprečnemu oziroma normalnemu zadrževanju prebavne vsebine v slepem črevesu kunca, je bil prav tako pri kuhanem krompirju dosežen največji obseg fermentacije (GAS_{10}). Največja hitrost fermentacije (MFR) je bila sicer dosežena pri pšeničnem škrobu (3,1 ml/uro), vendar šele po 12,4 urah (TMFR). Kuhan krompir je imel nekoliko manjšo MFR (2,9 ml/uro), vendar pa je bila ta

dosežena že po 8,5 urah, tako da je v primerjavi z ostalimi škrobnimi substrati tudi pri tem parametru pokazal dobre rezultate.

Razlog za razlike v fermentaciji različnih substratov so lahko tudi v razmerju med amilozo in amilopektinom (koruza, pšenica 25 proti 75; krompir 20 proti 80). Razlog za razlike bi lahko bile tudi v prisotnosti drugih snovi (neškrobni polisaharidi, lipidi, beljakovine), ki lahko vplivajo na razlike v fermentaciji naših substratov, saj je znano, da te snovi zmanjšujejo prebavljivost (Vukmirović, 2010).

Ugotovili smo, da se je več plina tvorilo pri čistih škrobih (koruzni škrob, pšenični škrob, krompirjev škrob) kot pri škrob vsebujočih krmilih. Manjša tvorba plina (B) škrob vsebujočih krmil glede na čiste škrabe je bila verjetno posledica nekaterih sestavin (SB, SM, SV, SP in BDI), ki jih vsebujejo krmila. Te sestavine bi zaradi vpliva na fizikalno kemične lastnosti lahko spreminjale fermentacijo škroba v njih (več plina, krajši TMFR).

Ugotovili nismo nobenih razlik v tvorbi plina med koruzo, pšenico in krompirjem, Lanzas in sod. (2007) pa so ugotovili, da se je največja količina plina (kazalnik B) v vampu tvorila pri sirku, potem pri koruzi, pšenici in najmanjša pri ječmenu. Lanzas in sod. (2007) so pri koruznih zrnih ugotovili, da so večje razlike v hitrosti fermentacije v vampu lahko tudi posledica geografske lege krmila, saj je koruza gojena na Sri Lanki fermentirala počasneje (0,09 ml/uro) kot tista gojena v Kanadi (0,19 ml/uro). V našem poskusu geografskega porekla substratov nismo ugotavljali, zato o tem vplivu ne moremo razpravljati.

Ena od možnih razlag, zakaj je kuhan krompir dosegel najkrajši TMFR bi lahko bila, da s segrevanjem krompirja v vodi (kuhanjem na temperaturi 56 do 67 °C) pride do porušanja notranjega reda v škrobnih zrnih, kar povzroči sproščanje amiloze in amilopektina iz škrobnih zrn in tako pride hitreje do njihove razgradnje s pomočjo amilolitičnih encimov, prisotnih v tankem črevesu (Tašner in Komerički, 2008). V tkivih krompirja (gomoljih) je škrob namreč v obliki v vodi netopnih zrn obdanih z dvojno membrano, ki omejujejo dostop encimov do zrna (Škrabanja, 2005).

5.2 SKLEPI

V nalogi smo ugotovili naslednje:

1. Iz škrobnatih krmil se je tvorilo manj plina (B) kot pri čistih škrobih (B: Korš 37 ml/g SS, Pšš 35 ml/g SS, Kromš 37 ml/g SS; MFR: Korš 2,8 ml/h, Pšš 3,1 ml/h, Kromš 2,3 ml/h; TMFR: Korš 13,2 h, Pšš 12,4 h, Kromš 17,2 h; GAS₁₀: Korš 5 ml/g SS, Pšš 6 ml/g SS, Kromš 1 ml/g SS), vendar je bil pri škrobnatih krmilih TMFR krajši, zato je pri njih po 10 urah nastalo več plina. Izjema je bila le koruza, pri kateri se je tvorilo manj plina (B) kot pri koruznem škrobu, tudi po 10 urah (GAS₁₀), saj ni bilo razlik v TMFR in MFR med koruznim škrobom in koruzo.
2. Pri pšenici se je tvorilo najmanj plina (B = 30 ml/g SS), a zaradi relativno velike fermentacije (MFR = 2,4 ml/h) v relativno kratkem času (TMFR = 10,9 h) se je tvorilo kar veliko plina v 10 urah (GAS₁₀ = 9 ml/g SS).
3. Pri koruzi se je po 10 urah tvorilo malo plina (GAS₁₀ = 3 ml/g SS). Pri ostalih kazalnikih (MFR in TMFR) ni bilo bistvenih razlik med koruznim škrobom in koruzo.
4. Pri surovem krompirju se je po 10 urah tvorilo veliko plina (GAS₁₀ = 10 ml/g SS) zaradi relativno kratkega časa fermentacije (TMFR = 10,7 h), relativno velike količine plina (B = 32 ml/g SS), kljub najmanjši MFR (2,1 ml/h).
5. Pri kuhanem krompirju se je po 10 urah tvorilo največ plina (GAS₁₀ = 16 ml/g SS), predvsem zaradi najkrajšega TMFR (8,5 h). Pri ostalih kazalnikih (MFR in B) ni bilo bistvenih razlik med krompirjevim škrobom in kuhanim krompirjem.
6. Najbolj zanimive rezultate smo dobili pri kuhanem krompirju. Čas, v katerem je bila dosežena največja hitrost fermentacije (TMFR = 8,5 h), je bil pri njem najkrajši, hitrost fermentacije (MFR 2,9 ml/h) pa je bila od vseh substratov, razen

pšeničnega škroba, največja. Ta nepričakovano kratek TMFR je še posebej pomemben zato, ker je maksimalni čas zadrževanja krme v slepem črevesu krajši od 10 ur (Gidenne in sod., 2002) in je bil izmed vseh substratov edini dovolj kratek, da bi se škrob iz kuhanega krompirja lahko v celoti izkoristil.

6 POVZETEK

Potek mikrobne fermentacije v slepem črevesu je za prebavo pri kuncih izrednega pomena. Stabilnost črevesne mikroflore je ključnega pomena za njihovo zdravje. Na fermentacijsko aktivnost v slepem črevesu kuncev vplivajo ogljikovi hidrati v krmi za kunce, predvsem pektinske snovi (Gidenne in sod., 2004a). Različni avtorji (Gidenne, 2003; Gidenne in sod., 2000; Jehl in Gidenne, 1996) so ugotovili, da so bili bolj zdravi tisti kunci, ki so zaužili več PSV (pektini, hemiceluloze) od tistih, ki so zaužili več škrobnate krme. Na splošno velja, da SV ščiti kunce pred prebavnimi motnjami in uravnava razmerje med beljakovinami in energijo v krmi. Večja količina škroba ima lahko negativen učinek, ker lahko pride v slepo črevo in tam povzroča neželjeno fermentacijo, kar povzroči obolenje in pogin kuncev.

Pri poteku fermentacije v slepem črevesu kunca smo za ocenjevanje fermentacije substratov *in vitro* uporabili tehniko plinskega testa. S pomočjo te tehnike smo merili tvorbo oz. sproščanje plinov pri inkubaciji različnih škrob vsebujočih substratov (vsakega posebej) v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kuncev. V poskusu smo določili kazalnike kinetike tvorbe plina pri škrob vsebujočih substratih in ugotavljali razlike v poteku fermentacije. Substrati so bili koruzni škrob, koruza, krompirjev škrob, kuhan krompir, surov krompir, pšenični škrob in mleta pšenica. Posamezne substrate smo v *in vitro* poskusu inkubirali v inokulumu, pripravljenem iz vsebine slepega črevesa kunca. Količino plina smo merili po 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 in 72 urah inkubacije. Dobljeno količino plina smo korigirali na slepi vzorec, posamezne škrobne substrate pa smo ocenili z Gompertzovim modelom (Bidlack in Buxton, 1992).

Iz škrobnatih krmil se je tvorilo manj plina (B) kot pri čistih škrobih, vendar je bil pri škrobnatih krmilih TMFR krajši, zato je pri njih po 10 urah nastalo več plina. Izjema je bila le koruza, pri kateri se je tvorilo manj plina (B) kot pri koruznem škrobu, tudi po 10 urah (GAS_{10}), saj ni bilo razlik v TMFR in MFR med koruznim škrobom in koruzo.

Pri pšenici se je tvorilo najmanj plina, a zaradi relativno velike fermentacije v relativno kratkem času (TMFR) se je tvorilo kar veliko plina v 10 urah.

Pri koruzi se je po 10 urah tvorilo malo plina. Pri ostalih kazalnikih (MFR in TMFR) ni bilo bistvenih razlik med koruznim škrobom in koruzo.

Pri surovem krompirju se je po 10 urah tvorilo veliko plina zaradi relativno kratkega časa fermentacije (TMFR), relativno velike količine plina (B), kljub najmanjši MFR.

Pri kuhanem krompirju se je po 10 urah tvorilo največ plina od vseh substratov, predvsem zaradi najkrajšega TMFR. Pri ostalih kazalnikih (MFR in GAS₁₀) ni bilo bistvenih razlik med krompirjevim škrobom in kuhanim krompirjem.

Najbolj zanimive rezultate smo dobili pri kuhanem krompirju. Čas v katerem je bila dosežena največja hitrost fermentacije (TMFR = 8,5 h) je bil pri njem najkrajši, hitrost fermentacije (MFR = 2,9 ml/h) pa je bila od vseh substratov, razen pšeničnega škroba največja. To pomeni, da je bil TMFR le pri kuhanem krompirju dovolj kratek, da bi se škrob lahko v celoti izkoristil pri fermentaciji v slepem črevesu.

7 VIRI

- 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*, 71: 809-818
- Calabro S., Nizza 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
- Davidson M.H., McDonald A. 1998. Fiber: forms and functions. *Nutrition Research*, 18, 4: 617-624
- DLG- Futterwerttabellen Wiederkäuer. 1997. 7., erweiterte und überarbeitete Auflage. Frankfurt, DLG-Verlag: 211 str.
- Gidenne T. 1992. Effect of fibre level, particle size and adaptation period on digestibility and rate of passage as measured at the ileum and in the faeces in the adult rabbits. *British Journal of Nutrition*, 67: 133-146
- Gidenne 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., Bellier R. 2000. Use of digestible fibre in replacement of 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. 1996. Replacement of starch by digestible fibre in the feed for growing rabbit. 1. Consequences for digestibility and rate of passage. *Animal Feed Science and Technology*, 61: 183-192
- Gidenne T., Perez J.M. 1993. Effect of dietary starch origin on digestion in the rabbit. 2. Starch hydrolysis in the small intestine, cell wall degradation and rate of passage measurements. *Animal Feed Science and Technology*, 42: 249-257
- Gidenne T., Pinheiro V., Falcao E., Cunha L. 2000. A comprehensive approach of the rabbit digestion consequences of a reduction in dietary fibre supply. *Livestock Production Science*, 64: 225-237

- Gidenne T., Jehl N., Segura M., Michalet- Doreau B. 2002. Microbial activity in the caecum of the rabbit around weaning: impact of a dietary fibre deficiency and of intake level. *Animal Feed Science and Technology*, 99: 107-118
- Gidenne T., Mirabito L., Jehl N., Perez J.M., Arveux P., Bourdillon A., Briens C., Duperray J., Corrent E. 2004a. 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
- Gidenne T., Jehl N., Lapanouse A., Segura M. 2004b. Inter-relationship of microbial activity, digestion and gut health in the rabbit: effect of substituting fibre by starch in diets having a high proportion of rapidly fermentable polysaccharides. *British Journal of Nutrition*, 92: 95-104
- Gjurić A. 1985. *Kuničarstvo*. Zagreb, Znanje: 211-272
- Golob A. 2010. Primerjava in vitro fermentacije voluminozne krme in močnih krmil v vsebini slepega črevesa kuncev in vampa ovc. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 32-38
- Grün P. 2002. Reja kuncev. Ljubljana, Kmečki glas: 134 str.
- Gutierrez I., Espinosa A., Garcia J., Carabano R., De Blas J.C. 2002. Effect of levels of starch, fibre, and lactose on digestion and growth performance of early-weaned rabbits. *Journal of Animal Science*, 80: 1029-1037
- Heymer A. 1977. *Ethologisches Wörterbuch*. Berlin, Hamburg: P. Parey, 48-49
- 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 and Technology*, 61: 193-204
- Kermauner A. 1994. Fiziologija prebave kuncev. *Sodobno kmetijstvo*, 27, 9: 358-366
- Kermauner A. 2005. Fibre in rabbit nutrition: recent recommendations. *Krmiva*, 47, 6: 311-319
- Kermauner A., Lavrenčič A. 2005. The effect of rabbits age on *in vitro* fermentation of starch, compound feed and its fibre. *Krmiva*, 47, 6: 303-309

- Kermauner A., Lavrenčič A. 2008. Supplementation of rabbit diet with chestnut wood extract: Effect on *in vitro* gas production from three sources of carbohydrates. V: Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona. 10-13 jun. 2008, Brescia, Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche: 683-688.
<http://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2008-Verona/Papers/N-Kermauner1.pdf> (2. apr. 2009)
- Klein H., Marquard R. 2005. Feed Microscopy. Bergen, Agrimedia: 22-50
- Kornhauser A. 2000. Organska kemija 2. Ljubljana, DZS: 193-194
- Lanzas C., Fox D.G., Pell A.N. 2007. Digestion kinetics of dried cereal grains. *Animal Feed Science and Technology*, 136: 265-280
- Lavrenčič A. 2006. The effect of rabbit age on *in vitro* caecal fermentation of starch, pectin, xylan, cellulose, compound feed and its fibre. *Animal*, 1: 241-248
- Lozej J. 2006. Vpliv različnih vrst vlaknine na prebavljivost hranljivih snovi krme pri laboratorijskih podganah. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 5 str.
- 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
- Piattoni F., Demeyer D., Maertens L. 1997. Fasting effects on *in vitro* fermentation pattern of rabbit caecal contents. *World Rabbit Science*, 5, 1: 23-26
- SAS/STAT Users guide. 2001. Release 6.03 edition. Cary, NC, USA, SAS Institute
- Svihus, B., Ulhen, A.K., Harstad, O.M. 2005. Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 122: 303-320
- Škrabanja V. 2005. Genetske in biotehnoške osnove kakovosti škroba v rastlinskih pridelkih in živilih. *Acta agriculturae Slovenica*, 85, 2: 419-427
- Škrabanja, V., Liljeberg, H.G.M., Hedley, C. L., Kreft, I., Björck, I. M.E. 1999. Influence of genotype and processing on the *in vitro* rate of starch hydrolysis and resistant starch formation in peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2033-2039

Tao Z.Y., Li F.C. 2006. Effects of dietary neutral detergent fibre on production performance, nutrient utilization, caecum fermentation and fibrolytic activity in 2- to 3-month-old New Zealand rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90: 467-473

Tašner L., Komerički J. 2008. Tehnologija rastlinskih živil. Maribor, Živilska šola, Višja strokovna šola: 25-29

Volek Z., Skrivanova V., Marounek M. 2004. Comparison of diets for growing rabbits containing potato pulp, sugar beet pulp and wheat bran: effect on performance and digestion parameters. *Archiv für Geflügelkunde*, 68, 6: 259-264

Vukmirović D. 2010. Nutritivni i tehnološki značaj škroba u hrani za životinje. Institut za prehrambene tehnologije. Tehnologija hrane.
<http://www.tehnologijahrane.com/ostale-tehnologije/tehnologija-hrane-za-zivotinje/nutritivni-i-tehnoloski-znacaj-skroba-u-hrani-za-zivotinje-12> (15. feb. 2010)

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Andreju Lavrenčiču in viš. pred. mag. Ajdi Kermauner za vso strokovno pomoč, koristne nasvete in spodbudne besede ob nastajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Janezu Salobirju za pregled diplomske naloge, dr. Nataši Siard za pregled bibliografskega dela diplomske naloge ter Karmeli Malinger za lektoriranje angleškega izvlečka.

Zahvala gre tudi predsedniku komisije prof. dr. Ivanu Štuhcu za pregled naloge.

Referentki ga. Sabini Knehtl se iskreno zahvaljujem za vse koristne nasvete in pomoč v vseh letih študija.

Iskrena hvala mami in očetu za vso moralno in finančno podporo v celotnem času študija. Hvala tudi sestri Ani za pomoč in potrpežljivost. Brez vas ne bi postala in dosegla to, kar sem.

Posebna zahvala gre fantu Mariu Jurišiču, ki me je spodbujal in mi stal ob strani. Hvala ti za vso pomoč in ljubezen, ki mi jo izkazuješ iz dneva v dan.

Iskrena hvala sošolki in prijateljici Tatjani Zvržina za pomoč, spodbudo, nasvete in podporo v času študija.

Posebno hvala najboljši prijateljici Jani Hribernik, ki me je ves čas bodrila in mi dajala občutek, da bom zmogla..

Zahvala prav vsem, ki so mi v času študija in pri izdelavi diplomske naloge kakorkoli pomagali in me spodbujali.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Irena ŽUPEC

***IN VITRO* FERMENTACIJA ŠKROBA V
INOKULUMU, PRIPRAVLJENEM IZ VSEBINE
SLEPEGA ČREVEESA KUNCEV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010