

UTICAJ PROVENJAVANJA I STEPENA SABIJENOSTI NA PARAMETRE HEMIJSKOG SASTAVA, PROTEOLIZE I KVALITETA SILAŽE LUCERKE

*N. Đorđević, G. Grubić, B. Stojanović, M. Radivojević, A. Božičković**

Izvod: U radu je ispitivan uticaj provenjavanja, odnosno dva stepena sadržaja suve materije ($SM = 250$ i 360 gkg^{-1}) i tri stepena sabijenosti (460 , 550 i 620 gdm^{-3}) na promene parametara hemijskog sastava, proteolize i kvaliteta silaže lucerke. Eksperiment je postavljen po statističkom modelu 2×3 u tri ponavljanja po svakom tretmanu.

Na osnovu rezultata laboratorijskih analiza, utvrđeno je nesigifikantno variranje u sadržaju pojedinih hranljivih materija ($p > 0,05$), izuzev masti i ugljenih hidrata. U silažama sa većim stepenom suve materije utvrđena je redukcija fermentacije, sa dominacijom sirćetne u ukupnom sadržaju kiselina u tretmanu A_2B_1 , kao i redukcija proteolitičkih procesa, odnosno manji sadržaj amonijaka i rastvorljivog zota ($p < 0,05$). Sa povećanjem stepena sabijenosti došlo je do porasta apsolutnog udela mlečne kiseline i smanjenja udela amonijačnog i rastvorljivog azota ($p < 0,05$). U materijalu sa prirodnim sadržajem vlage, bez obzira na stepen sabijanja, došlo je do buterne fermentacije i intenziviranja aminogeneze.

Na osnovu izvedenih ispitivanja može se zaključiti da su provenjavanje i adekvatno sabijanje ključni fizički faktori za parametre kvaliteta silaže lucerke.

Ključne reči: Lucerka, provenjavanje, sabijanje, kvalitet, proteoliza.

Uvod

Cilj različitih postupaka konzervisanja hrane za životinje jeste maksimalna očuvanost hranljive vrednosti u što dužem vremenskom periodu (Đorđević et al., 2010). Silaža, odnosno senaža višegodišnjih i jednogodišnjih leguminoza je sve češći oblik konzervisane hrane koji se sprema i koristi u svetu i Srbiji, i predstavlja značajan i jeftin izvor proteina za preživare koji obezbeđuje stabilnu proizvodnju mleka ili mesa, uz minimalne troškove (Wilkinson and Toivonen, 2003). Velika količina vlage u momentu ubiranja i visoka puferna vrednost glavni su problemi za uspešno siliranje leguminoza, zbog čega je izvedeno niz eksperimenata u zadnjih nekoliko decenija (Đorđević i Dinić, 2003). Osim toga, u toku siliranja, a i kasnije, u silaži se odvijaju biohemijski procesi koji dovode do

* Dr Nenad Đorđević, redovni profesor, dr Goran Grubić, redovni profesor; dr Bojan Stojanović, docent; Aleksa Božičković, dipl.inž., asistent, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun; dr Mihailo Radivojević, Poljoprivredna Korporacija Beograd, Beograd-Padinska Skela. E-mail: nesadj@agrif.bg.ac.rs

Rad je realizovan u okviru projekta III-46012, koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

transformacije i degradacije hranljivih materija. Za ishranu preživara najznačajnije su transformacije azotnih materija, odnosno hidroliza proteina. U cilju maksimalne kontrole degradacije proteina u toku siliranja leguminoza koriste se različiti postupci kao što je provenjavanje, ugljenohidratna stimulacija, inokulacija i hemijsko konzervisanje (Nadeau et al., 2000; Guo et al., 2008; Dinić et al., 2012b). Osim primene ovih tehnologija, vrši se selekcija leguminoza na ruminalnu razgradivost (Broderick et al., 2004) kao i genetičke manipulacije (Getachew et al., 2009).

U skladu sa tim je i planiran ovaj eksperiment, sa ciljem da se ispita uticaj različitog stepena sabijanja svežeg i provenulog materijala lucerke na hemijski sastav, promene azotnih materija i parametre kvaliteta silaže lucerke.

Materijal i metode rada

Eksperiment je postavljen kao dvofaktorijalni ogled (2×3), gde je faktor A bio sadržaj suve materije ($A_1 = 250 \text{ gkg}^{-1}$, $A_2 = 360 \text{ gkg}^{-1}$) a faktor B stepen sabijenosti ($B_1 = 460 \text{ gdm}^{-3}$, $B_2 = 550 \text{ gdm}^{-3}$ i $B_3 = 620 \text{ gdm}^{-3}$).

Za eksperiment je korišćena biomasa lucerke u fazi početka cvetanja, iz II otkosa koji je imao značajno manje učešće korova u odnosu na I otkos. Biomase svih tretmana su silirane (sabijene) u plastične eksperimentalne sudove zapremine 30 dm^3 . Posle 56 dana po siliranju eksperimentalni sudovi su otvoreni i uzeti su reprezentativni uzorci za hemijsku analizu koja je urađena u laboratoriji za ishranu domaćih životinja na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Parametri hemijskog sastava su određeni prema AOAC (2002) metodama, količina mlečne, sirćetne i buterne kiseline su određene destilacionom metodom po Wiegner-u (1926), količina amonijačnog azota modifikovanom Kjeldahl-ovom metodom (Dulphy i Demarquilly, 1981) a količina rastvorljivog azota metodom po Vistahin-u (Đorđević i sar., 2003). Statistička obrada rezultata je obavljena softverom Statsoft (2006).

Rezultati i diskusija

Važna mera za postizanje dobrog kvaliteta svake vrste silaže jeste povećanje sadržaja suve materije preko 300 gkg^{-1} , čime se sprečava izdvajanje sokova i postiže maksimalna kontrola fermentacije buternog tipa. U nekim vrstama biljnog materijala to se postiže izborom optimalne faze za siliranje (na primer, cela biljka kukuruza), dok se za leguminoze, trave i njihove smeše to postiže provenjavanjem. Osim toga, povećanje sadržaja suve materije u leguminozama je važna mera u cilju očuvanja proteina (Slotner i Bertilsson, 2006) i povećanja stepena konzumiranja (Đorđević i Dinić, 2003). U ovom eksperimentu količina suve materije u svežem materijalu je bila $253,81 \text{ gkg}^{-1}$, dok je u provenulom materijalu iznosila $356,54 \text{ gkg}^{-1}$ (tabela 1).

Tab.1. Hemijski sastav početnog materijala i silaža, gkg⁻¹ SM
Chemical composition of starting material and silages, gkg⁻¹ DM

Tretman / Treatment	SM / DM, gkg	Proteini / Proteins	Masti / Fats	Celuloza / Cellulose	BEM / NFE	Pepeo / Ash
Početni materijal lucerke / Starting material of lucerne						
Sveža / Fresh	253,81	198,32	36,44	256,04	385,95	123,25
Provenula / Wilted	356,54	197,75	37,23	260,42	381,26	123,34
Silaže / Silages						
A ₁ B ₁	267,31	197,26	86,34	262,31	330,75	123,34
A ₁ B ₂	258,85	197,64	72,35	265,43	341,14	123,44
A ₁ B ₃	262,47	196,90	58,76	264,75	356,29	123,30
Prosečno / Average	262,88	197,27	72,48	264,16	342,73	123,36
A ₂ B ₁	357,31	197,25	75,47	272,11	331,70	123,47
A ₂ B ₂	357,87	197,11	58,68	266,80	354,09	123,32
A ₂ B ₃	356,93	197,32	55,31	265,26	358,85	123,26
Prosečno / Average	357,37	197,23	63,15	268,06	348,21	123,35
Signifikantnost faktora / Significance of factors	A**	A ^{ns}	A**	A ^{ns}	A ^{ns}	A ^{ns}
	B ^{ns}	B ^{ns}	B*	B ^{ns}	B*	B ^{ns}
	A×B ^{ns}	A×B ^{ns}	A×B*	A×B ^{ns}	A×B ^{ns}	A×B ^{ns}

ns - nije signifikantno/no significance; * (p<0,05); ** (p<0,01)

Hemijski sastav silaža iz eksperimenta se u maloj meri razlikovao u odnosu na hemijski sastav početnog materijala, osim količine vlage, sirovih masti i bezazotnih ekstraktivnih materija (BEM). Veće vrednosti za suhu materiju u A₁ tretmanima u odnosu na početni materijal objašnjavaju se povećanim sadržajem ispaljivih materija u siliranom materijalu koje se gube prilikom klasičnog postupka određivanja suve materije, a u A₂ tretmanima to je najvećim delom posledica provenjavanja (Đorđević i sar., 2003). Veći sadržaj sirovih masti u svim tretmanima silaža u odnosu na početni materijal lucerke je posledica ekstrakcije mlečne kao neisparljive kiseline. Manje razlike u količini proteina između početnog materijala i silaža su, takođe, posledica pripreme uzoraka silaža sušenjem i gubitaka u formi isparljivog amonijaka. Manje količine BEM-a u silažama su rezultat trošenja fermentabilnih ugljenih hidrata u fermentaciji. Ostale razlike se delom mogu objasniti promenom relativnog odnosa pojedinih sastojaka.

Amonijačni azot u silaži je osnovni pokazatelj degradacije proteina. S obzirom da različite forme lucerke (zeleno, osušeno za seno, kao silaža ili senaža) predstavljaju glavni izvor proteina koji se može proizvesti gotovo na svakoj farmi, veoma je važan status azotnih materija (Đorđević et al., 2012). U odnosu na ostale leguminoze, proteini lucerke se u najvećem stepenu izloženi hidrolizi (Tao et al., 2012; Dinić et al., 2012a). U buragu preživara ovi proizvodi se brže razlažu od pravih proteina, a krajnji proizvod razlaganja je amonijak, koji ne mora biti u celosti iskorišćen za mikrobijalnu sintezu proteina. Navedeni proizvodi čine deo rastvorljivih, odnosno razgradivih proteina, čiji je sadržaj vrlo precizno definisan u savremenim normativima za ishranu krava muzara (Grubić et al., 2003). Sadržaj ovih frakcija je presudan za proizvodnju, zdravstveno stanje i plodnost preživara (Broderick, 1995). Osim toga, jedan od savremenih problema je povećana

emisija azota u životnu sredinu (Getachev et al., 2009). Amonijačni azot u silaži nastaje delovanjem proteolitičkih enzima iz biljnih ćelija i mikroorganizama, pre svega buternih klostridijuma. Prisustvo amonijaka u silažama koje ne sadrže buternu kiselinu je rezultat delovanja biljnih enzima (McDonald i sar., 1991). U svim silažama od materijala sa prirodnim sadržajem vlage ($SM=250 \text{ gkg}^{-1}$) utvrđena je veća količina amonijačnog azota (tabela 2). To je, svakako, rezultat intenzivnijeg delovanja proteolitičkih enzima, kojima odgovaraju više pH vrednosti i veći nivo vlage (Carpintero et al., 1979).

Tab. 2. Udeo frakcija azota ($\text{gkg}^{-1} \text{ N}$) i parametri biohemijskih promena u silažama ($\text{gkg}^{-1} \text{ SM}$)

Content of nitrogen fraction ($\text{gkg}^{-1} \text{ N}$) and parameters of biochemical changes in silages ($\text{gkg}^{-1} \text{ DM}$)

Tretman / Treatment	pH	NH_3N	Rastvorljivi N / Soluble N	Mlečna kiselina / Lactic acid	Sirćetna kiselina / Acetic acid	Buterna kiselina / Butyric acid
A_1B_1	4,86	202,35	678,32	40,20	38,31	3,05
A_1B_2	4,78	190,64	662,31	38,52	28,49	1,26
A_1B_3	4,80	186,47	625,68	51,67	32,11	4,14
Prosečno / Average	4,81	193,15	655,44	43,46	32,97	2,82
A_2B_1	5,02	176,32	612,45	28,07	34,58	0,00
A_2B_2	4,97	170,75	597,21	32,18	26,11	0,00
A_2B_3	4,94	166,34	590,53	41,65	28,34	0,34
Prosečno / Average	4,98	171,14	600,06	33,97	29,68	0,11
Signifikantnost faktora / Significance of factors	A**	A**	A**	A**	A**	A**
	B*	B*	B**	B*	B*	B ^{ns}
	A×B*	A×B*	A×B**	A×B**	A×B*	A×B ^{ns}

ns - nije signifikantno/no significance; * ($p<0,05$); ** ($p<0,01$)

Na intenzitet aminogeneze u ovom eksperimentu je uticao i stepen sabijenosti, zbog dužeg trajanja aerobne faze u manje sabijenom materijalu, veće produkcije sirćetne kiseline i manjeg zakišeljavanja siliranog materijala. Maksimalna kontrola proteolitičkih procesa se postiže upotrebom hemijskih konzervanasa na bazi organskih kiselina i njihovih soli, ali je ovaj postupak danas širom sveta napušten (Komprda et al., 1996). S obzirom da visok puferni kapacitet lucerke i mala količina fermentabilnih šećera otežavaju zakišeljavanje siliranog materijala, važno je provenjavanje u cilju redukcije aktivnosti proteolitičkih enzima (Đorđević i Dinić, 2003).

U silažama bolje sabijenog materijala utvrđeno je signifikantno manje rastvorljivog azota. To je posledica većeg apsolutnog i relativnog učešća mlečne kiseline, a time i nižih pH vrednosti, odnosno, manje aktivnosti proteolitičkih enzima. Silaže od materijala sa 360 gkg^{-1} suve materije i sa stepenom sabijenosti 550 i 620 gdm^{-3} su sadržale manje od 600 gkg^{-1} rastvorljivog azota, što se smatra gornjom granicom za kvalitetnu silažu (Ensilage, 1978). Stepem suve materije utiče na proteolizu i fermentaciju direktno, preko nivoa aktivnosti ćelijskih enzima, poreklom iz bakterija ili biljnih ćelija, i indirektno, preko stepena sabijenosti i količine zaostalog kiseonika (Muck i Diskerson, 1987).

Sve silaže lucerke su imale visoke pH vrednosti, što je rezultat visoke puferne vrednosti ove biljne vrste, odnosno visoke količine sirovih proteina i kalcijuma, a za tretmane A₂ to je dodatno bila posledica visokog sadržaja suve materije (tabela 2). Utvrđeno je signifikantno smanjenje količine svih kiselina pri provenjavanju lucerke, što se objašnjava redukcijom fermentacije. Za većinu silaža A₂ tretmana je utvrđeno odsustvo buterne kiseline. To se može objasniti relativno visokim sadržajem suve materije koja nepovoljno deluje na aktivnost buternih bakterija. Takođe, objašnjenje je i u adekvatnim uslovima pri siliranju, odnosno izostankom kontaminacije pokošenog materijala zemljom, koja je glavni izvor buternih klostridijuma (Đorđević i sar., 2011). Nasuprot tome, silaže iz A₁ tretmana su imale signifikantno veću količinu buterne kiseline zbog velikog udela vlage.

Za ocenu kvaliteta silaža korišćena je Flieg-ova metoda, kako bi se izbegao negativan uticaj visokih pH vrednosti (karakterističnih za lucerku) na konačnu ocenu. U tretmanu A₂B₁ je utvrđena dominacija sirćetne kiseline, što se objašnjava dužim trajanjem aerobne fermentacije u uslovima manje sabijenosti. U svim ostalim tretmanima je dominirala mlečna kiselina (tabela 3).

Tab. 3. Relativni odnos kiselina i klasa kvaliteta po Flieg-u
Relative ratio of acids and quality class by Flieg

Tretman / Treatment	Mlečna kiselina / <i>Lactic acid</i>	Sirćetna kiselina / <i>Acetic acid</i>	Buterna kiselina / <i>Butyric acid</i>	Klasa / Class
A ₁ B ₁	49,29	46,97	3,74	III
A ₁ B ₂	56,42	41,73	1,85	II
A ₁ B ₃	58,77	36,52	4,71	II
A ₂ B ₁	44,80	55,20	0,00	II
A ₂ B ₂	55,21	44,79	0,00	II
A ₂ B ₃	59,22	40,30	0,48	II

Zaključak

U obavljenim istraživanjima utvrđeno je da provenjavanje i stepen sabijanja imaju signifikantan uticaj na sve parametre koji su specifični za intenzitet fermentacije i status azotnih materija (amonijačni i rastvorljivi azot). Svakako da su anaerobnost sredine i sadržaj suve materije najvažniji faktori u tehnologiji siliranja svih vrsta biljnog materijala. U praksi treba posvetiti maksimalnu pažnju faktorima od kojih direktno ili indirektno zavisi stepen sabijenosti siliranog materijala: stepenu provenulosti, dužini seckanja, izboru tipa objekta za siliranje i/ili izboru mehanizacije za sabijanje (gaženje ili baliranje). Osim toga, treba sprečiti kontaminaciju siliranog materijala zemljom, kako na polju, tako i u samom silo-objektu, jer je to izvor buternih klostridija.

Literatura

1. *AOAC (2002): Official Methods of Analysis of AOAC international. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.*
2. *Broderick, G.A. (1995): Desirable characteristics of forage legumes for improving protein utilization in ruminants. Journal of Animal Science, 73: 2760-2773.*
3. *Broderick, G.A., Albrecht, K.A., Owens, V.N., Smith, R.R. (2004): Genetic variation in red clover for rumen protein degradability. Animal Feed Science and Technology, 113, 157-167.*
4. *Carpintero, C.M., Henderson A.R., McDonald, P. (1979): The effect of some pre-treatments on proteolysis during the ensiling of herbage. Grass and Forage Science, 34, 311-315.*
5. *Dinić, B., Dorđević, N., Lugić, Z. (2012a): Significance of proteolytic processes in silage for modern nutrition of ruminants. XI International Feed Technology Symposium „FEED – TO FOOD“/COST „FEED FOR HEALTH“ joint Workshop, Novi sad, 03-05. October, 2012. Proceedings, 94-102, 2012.*
6. *Dinić, B., Dorđević, N., Blagojević, M., Terzić, D., Dokić, D. (2012b): Quality of alfalfa haylage depending on the application of inoculant and ground corn. The First International Symposium on Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Serbia, 08-10. November, 2012. Proceedings, 488-495.*
7. *Dulphy, J.P., Demarquilly, C. (1981): Problemes particuliers aux ensilages. Prevision de la valeur nutritive des aliments des Ruminants, I.N.R.A.*
8. *Dorđević, N., Dinić, B. (2003): Siliranje leguminoza (Monografija). Institut za istraživanja u poljoprivredi Srbija, Beograd.*
9. *Dorđević, N., Grubić, G., Jokić, Ž. (2003): Osnovi ishrane domaćih životinja (Praktikum). Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.*
10. *Dorđević, N., Grubić, G., Dinić, B., Lević, J., Stojanović, B., Božičković, A. (2010): Animal feed quality – past and present. 12. International Symposium on Forage Crops of Republika of Serbia – Forage Crops Basis of the Sustainable Animal Husbandry Development, 26-28.05.2010., Kruševac – Serbia. Biotechnology in Animal Husbandry, Book 1, 26 (spec. issue), 249-260.*
11. *Dorđević, N., Grubić, G., Dinić, B., Stojanović, B., Božičković, A. (2011): The Influence of compression level and inoculation on biochemical changes in lucerne silages. Journal of Agricultural Sciences, 56, 1: 15-23.*
12. *Dorđević, N., Grubić, G., Stojanović, B., Dinić, B., Božičković, A. (2012): Contemporary aspects of lucerne use in animal nutrition. 6th Central European Congress on Food, CEFood2012, Novi Sad, 23-26 May 2012. Proceedings, 1514-1519.*
13. *Ensilage (1978): MAI N^o 15. Bases theoriques de l'ensilage. Paris.*
14. *Getachew, G., Dandekar, A.M., Pittroff, W., DePeters, E.J., Putnam, D.H., Goyal, S., Teuber, L., Uratsu, S. (2009): Impacts of polyphenol oxidase enzyme expression in transgenic alfalfa on in vitro gas production and ruminal degradation of protein, and nitrogen release during ensiling. Animal Feed Science and Technology, 151, 44-54.*
15. *Grubić, G., Adamović, M., Stojanović, B., Dorđević, N. (2003): Savremeni aspekti u normiranju potreba u proteinima za krave muzare. Veterinarski glasnik, 57, 3-4: 101-112.*

16. Guo, X.S., Ding, W.R., Han, J.G., Zhou, H. (2008): Characterization of protein fractions and amino acids in ensiled alfalfa treated with different chemical additives. *Animal Feed Science and Technology*, 142, 89–98.
17. Komprda, T., Homolka, P., Harazim, J. (1996): Influence of chemical, enzymatic and phytogenic ensiling preparations on digestibility, degradability and PDI and NEL content of lucerne and red clover. *Animal Feed Science and Technology*, 61, 325-334.
18. McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E. (1991): *The biochemistry of silage* (second edition). Chalcombe Publications.
19. Muck, R.E., Dickerson, J.T. (1987): Storage temperature effects on proteolysis in alfalfa silage. St. Joseph, Mich. 17, [4]c. Paper-Amer. soc. of agr. engineers. 87-107.
20. Nadeau, E.M., Russell, J.R., Buxton, D.R. (2000): Intake, digestibility, and composition of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulase, inoculant, and formic acid fed to lambs. *Journal of Animal Science*, 78, 2980-2989.
21. Slottner, D., Bertilsson, J. (2006): Effect of ensiling technology on protein degradation during ensilage. *Animal Feed Science and Technology*, 127, 101–111.
22. Statsoft, Inc (2006): STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com.
23. Tao, L., Guo, X.S., Zhou, H., Undersander, D.J., Nandety, A. (2012): Characteristics of proteolytic activities of endo- and exopeptidases in alfalfa herbage and their implications for proteolysis in silage. *Journal of Dairy Science*, 95, 8: 4591-4595.
24. Wiegner, G. (1926): *Anleitung zum qaantitativenagrikulturchemischen Praktikum*. Berlin, Gebriieder Borntraeger.
25. Wilkinson, J.M., Toivonen, M.I. (2003): *World silage-a survey of forage conservation around the world*. School of Biology, Universiti of Leeds, Leeds, LS2 9JT, United Kongdom.

UDC:636.085.52+633.31

Original scientific paper

THE INFLUENCE OF WILTING AND COMPACTION DEGREE ON PARAMETERS OF CHEMICAL COMPOSITION, PROTEOLYSIS AND QUALITY OF LUCERNE SILAGE

*N. Đorđević, G. Grubić, B. Dinić, B. Stojanović, M. Radivojević, A. Božičković**

Summary

The influence of wilting, actually two levels of dry matter content (DM = 250 and 360 gkg⁻¹) and three levels of compaction (460, 550 and 620 gdm⁻³) on variations in parameters of chemical composition, proteolysis and quality of lucerne silage was investigated. The experiment was set as 2×3 factorial with three replications per each treatment.

Based on the results of chemical analysis, there was no significant variation within the contents of basic nutrients ($p > 0.05$), while some variation was observed in lipid and carbohydrate contents. In silages with higher dry matter content the reduction of fermentation was observed, with acetate as dominant product in acid contents in A₂B₁ treatment, and also reduction in proteolytic processes which shows as lower ammonia and soluble nitrogen content ($p < 0.05$). With the increase of level of compaction the increase in lactic acid was observed, with decrease in ammonia and soluble nitrogen ($p < 0.05$). In material with natural moisture content, regardless of the level of compaction, the butyric fermentation was observed and intensified aminogenesis.

On the basis of this investigation it can be concluded that wilting and adequate compaction are the key physical factors which influence silage quality parameters.

Key words: lucerne, wilting, compaction, quality, proteolysis.

*Nenad Đorđević, Ph.D professor, Goran Grubić, Ph.D. professor; Bojan Stojanović, Ph.D. assistant professor, Aleksa Božičković, B.Sc. assistant, Faculty of Agriculture, Belgrade - Zemun, Republic of Serbia; Mihailo Radivojević, Ph.D., PKB Corporation, Belgrade-Padinska Skela, Republic of Serbia.

E-mail: nesadj@agrif.bg.ac.rs

Paper is accomplished as a part of project III-46012 of the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia.