

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

Vida Vertuš

**Odnos koncentracije inokulanta i parametara
fermentacije u silaži lucerne**

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je u laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, pod vodstvom doc. dr. sc. Marije Duvnjak i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./2023.

Sadržaj

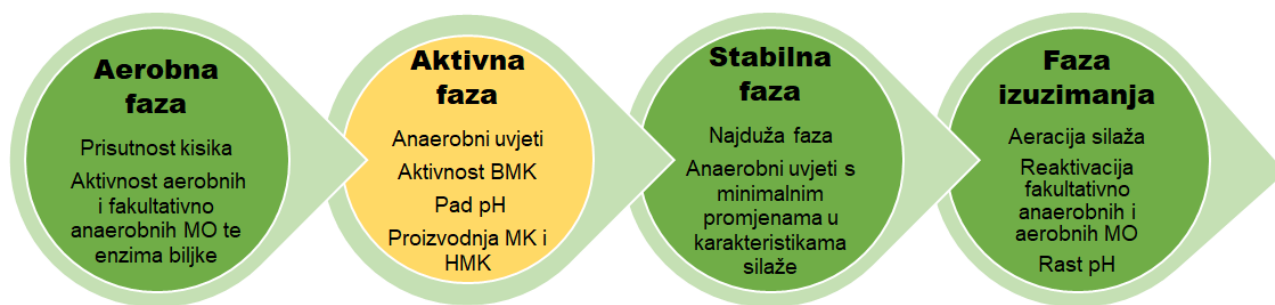
1. UVOD.....	1
2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	7
3. MATERIJALI I METODE RADA	8
3.1 Priprema silaže.....	8
3.2 Kemijske analize	11
3.3 Statistička obrada podataka	14
4. REZULTATI	15
4.1 Promjene sadržaja glukoze, fruktoze i saharoze.....	16
4.2 Promjene sadržaja kiselina	19
4.3 Promjene sadržaja alkohola.....	23
5. RASPRAVA.....	25
6. ZAKLJUČAK	31
7. ZAHVALE.....	32
8. POPIS LITERATURE	33
9. SAŽETAK	38
10. SUMMARY	39
11. ŽIVOTOPIS	40

1. UVOD

U periodu godine kada svježa paša nije dostupna silaže predstavljaju najvažnije krmivo u hranidbi preživača, pri čemu silaža lucerne predstavlja najvažnije proteinsko voluminozno krmivo. Najjednostavnije rečeno, silaže su konzervirana zelena masa. Konzerviranje zelene mase izuzetno je važno zbog mogućnosti korištenja tako spremljene zelene mase biljke tijekom cijele godine (Kung Jr 2010a.). Priprema silaža omogućava adekvatnu hranidbu preživača s naglaskom na mliječne krave u ranom stadiju laktacije kada je ispaša oskudna (Weinberg i Muck 1996.). Siliranje je metoda konzerviranja hranjivih tvari biljaka pomoću anaerobnih uvjeta i bakterija mliječne kiseline (BMK). U ovom procesu BMK fermentiraju lako dostupne ugljikohidrate do organskih kiselina, u najvećem dijelu mliječne kiseline, čime dolazi do pada pH i konzerviranja (McDonald i sur. 1991.). Smatra se, da dobra silaža treba po svojim hranidbenim karakteristikama biti slična zelenoj krmu iz koje se sprema silaža. Kvaliteta silaže ovisi o zelenoj masi iz koje se sprema silaža te još više o samom procesu pripreme silaža ili siliranju (Getachew i sur. 2018.). Tako se u suvremenom spremanju silaža upotrebljavaju različiti dodaci ili aditivi koji usmjeravaju fermentaciju, od kojih inokulanti BMK čine najvažniji tip (Kung i sur. 2018.). Naime, količina inokulanta i sojevi BMK koji se nalaze u inokulantu usmjeravaju fermentaciju i utječu na kvalitetu silaže (Muck i sur. 2018.).

Općenito, najvažniji uvjeti dobrog siliranja su: brzo uklanjanje zraka, brza proizvodnja mliječne kiseline s rezultatom brzog snižavanja pH te očuvanje anaerobnih uvjeta tijekom cijelog perioda siliranja do izuzimanja i korištenja silaža u hranidbi životinja, kada dolazi do otvaranja i aeriranja silaže (Kung 2010a.). Kako bi se spriječio rast nepoželjnih mikroorganizama (MO), vrlo je važno brzo uklanjanje zraka nakon punjenja i zatvaranja silosa (Borreani i sur. 2018.). Nepoželjni MO, aerobne bakterije, kvasci te plijesni, natječu se s poželjnim bakterijama za hranjivim supstratom te njihovim rastom dolazi do velikih gubitaka u hranjivim tvarima silaža (Kung Jr i sur. 2003). S uspostavom anaerobnih uvjeta kreće aktivna faza ili faza fermentacije u kojoj dolazi do proizvodnje kiselina i pada pH te konzerviranja zelene mase. Siliranje se može podijeliti u četiri osnovne faze (McDonald i sur. 1991.):

1. Aerobna faza
2. Faza fermentacije ili aktivna faza
3. Stabilna faza
4. Faza izuzimanja silaže



Slika 1. Stilizirani prikaz faza u procesu pripreme silaža (korištene kratice: bakterije mliječne kiseline (BMK), mikroorganizmi (MO), mliječna kiselina (MK), hlapljive masne kiseline (HMK))

Aerobna faza je prva faza u procesu pripreme silaža. Ova faza nastupa neposredno nakon punjenja i zatvaranja silosa. U ovoj fazi kisik je još uvijek prisutan u zelenoj masi što omogućuje aktivnost aerobnih i fakultativno anaerobnih MO kao što su kvasci, plijesni i enterobakterije (McDonald i sur. 1991.). Ako je aktivnost ovih nepoželjnih MO i enzima biljke preduga, dolazi do neželjene razgradnje hranjivih tvari (primarno proteina) i zagrijavanja silaže (Kung i sur 2018.). Zbog toga, prilikom sabijanja zelene mase treba obratiti pažnju da se maksimalno istisne kisik kako bi sam proces aktivne faze siliranja ili fermentacije mogao što prije započeti. Ukoliko se sabijanje zelene mase adekvatno provelo, aerobne bakterije troše kisik do najviše 6 sati nakon zatvaranja silaža, kada započinje fermentacija koja podrazumijeva postizanje anaerobnih uvjeta (McDonald i sur. 1991., Leto 2015., Galić 2020.).

Faza fermentacije ili aktivna faza siliranja započinje nakon uspostave anaerobnih uvjeta u zelenoj masi te traje do otprilike 3 tjedna ili čak 2 – 3 mjeseca od pripreme silaža. Vremensko trajanje ove faze definirano je brzinom sinteze mliječne kiseline i uspostavom kiselih uvjeta (McDonald i sur. 1991.). Tip i kvaliteta fermentacije ovisi o MO koji dominiraju fermentacijom te karakteristikama zelene mase kao što su količina vlage i količina ugljikohidrata topljivih u vodi (Kung i sur. 2018.). Najvažniji MO u ovoj fazi, ali i u cijelom procesu siliranja su BMK. Ove bakterije koriste lako dostupne topljive ugljikohidrate s naglaskom na glukozu, fruktozu i saharozu te oligosaharidima kako bi proizvele mliječnu kiselinu i time snizile pH (McDonald i sur. 1991.). Osim mliječne, BMK mogu proizvesti i hlapljive masne kiseline (HMK) – octenu i propionsku kiselinu te etanol što ovisi o tipu BMK i tipu fermentacije (McDonald i sur. 1991., Muck i sur. 2018.). Uspostavljeni nizak pH i kiselu uvjeti inhibiraju aktivnost nepoželjnih mikroorganizama kao što su klostridije te u konačnici omogućuju dobivanje stabilne silaže (McDonalds i sur. 1991.). S druge strane, ukoliko pH vrijednost dovoljno brzo ne padne i ne

postignu se kiseli uvjeti ($\text{pH} > 5$) MO kao što su klostridije, pa čak enterobakterije i kvasci mogu preživjeti. Njihovo prisustvo u silažama je nepoželjno obzirom da su oni u kompeticiji s BMK za hranjivim supstratom. Oni smanjuju mogućnost proizvodnje stabilne silaže te također smanjuju nutritivnu vrijednost silaže uslijed nekontrolirane mikrobiološke aktivnosti i potrošnje hranjivih tvari (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018.). Međutim ukoliko BMK proizvedu dovoljnu količinu mliječne kiseline i uspostave se kiseli uvjeti može započeti treća faza siliranja, stabilna faza.

Stabilna faza započinje nakon uspostave kiselih uvjeta u silaži ($\text{pH} < 4,5$) i prestanka anaerobne mikrobiološke aktivnosti zbog niskog pH. Ova faza može dugo trajati, a u praksi najčešće traje do naredne sezone punjenja silosa ili do aeracije silaža (Leto 2015.). Ukoliko su zadovoljeni anaerobni uvjeti, pretpostavljaju se minimalne promjene u sadržaju i kvaliteti silaža (Weinberg i Muck 1996., Kung i sur. 2018.).

Faza izuzimanja je završna faza koja započinje nakon što se silos otvori. Otvaranjem, zrak, a samim time i kisik prodire u silažu do dubine oko 1 metar te time potiče rast i umnažanje nepoželjnih MO kao što su kvasci i plijesni (Leto 2015.). Kvasci su prvi MO koji započinju kvarenje silaže jer metaboliziraju mliječnu kiselinu čime dolazi do porasta pH vrijednosti. Time nastaju pogodni uvjeti za rast drugih nepoželjnih MO – plijesni (Wilkinson i Davies 2013.). Kontrola aktivnosti kvasaca tijekom faze izuzimanja jedan je od najvažnijih parametara kvalitete silaža. Produkti fermentacije BMK, octena i propionska kiselina, inhibiraju aktivnost kvasaca čime daju aerobno stabilnu silažu (Wilkinson i Davies 2013.). Aerobna stabilnost je termin koji se definira kao vremenski period nakon otvaranja silaža u kojem temperatura u silažnoj masi nije viša od $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ u odnosu na okolišnu temperaturu (Kung Jr 2010b.). Porast temperature u silažama rezultat je aktivnosti štetnih aerobnih MO i razgradnje hranjivih tvari (Wilkinson i Davies 2013.).

Dodaci ili aditivi u silaži služe za osiguravanje dominacije BMK tijekom fermentacije te time za optimalno konzerviranje zelene mase. Svaki dodatak mora imati određene karakteristike: biti siguran i lagan za uporabu, mora imati pozitivan efekt na konzerviranje i nutritivnu vrijednost te mora osigurati aerobnu stabilnost silaže i ne smije biti štetan za životinju i njen metabolizam (Duvnjak 2016.). U biološke dodatke ulaze enzimi i bakterijski inokulanti (Weinberg i Muck 1996.). Bakterijski inokulanti su najrasprostranjeniji biološki dodaci (Muck i sur. 2018.). Prema Weinberg i Muck (1996.), bakterijski inokulanti imaju prednosti u odnosu na kemijske dodatke jer su sigurni za okoliš, lako se koriste, ne djeluju korozivno na strojeve,

a smatraju se i prirodnim proizvodima. Mikroorganizmi koji se najčešće koriste kao inokulanti su određeni sojevi BMK zbog njihove jednostavne aplikacije i dobrih proizvodnih karakteristika (Filya i sur. 2007.). S obzirom na tip fermentacije i sintezu proizvoda, BMK se mogu podijeliti u dvije kategorije: homofermentativne BMK i heterofermentativne BMK uz dodatne sub-podjele na fakultativno homofermentativne i obligatorno homofermentativne BMK ovisno o supstratima koji se koriste za fermentaciju (McDonald i sur. 1991.). Homofermentativne BMK kao što je *Lactiplantibacillus plantarum* fermentiraju heksoze i pentoze do mliječne kiseline. S druge strane, heterofermentativne BMK, kao što je *Lentilactobacillus buchneri*, fermentiraju heksoze i pentoze te proizvode mliječnu kiselinu u manjoj količini jer proizvode dodatno octenu i propionsku kiselinu, etanol i ugljikov dioksid (McDonald i sur. 1991.). Octena i propionska kiselina važne su za aerobnu stabilnost silaža (Wilkinson i Davies 2013.). Tako je danas, uz poznavanje karakteristika homofermentativnih kao i heterofermentativnih BMK, važna njihova kombinacija pri postizanju što idealnijih uvjeta u siliranoj masi (Kung Jr 2010a.). Osim tipa sojeva BMK koji se koriste za siliranje, koncentracija inokulanta isto igra važnu ulogu. Novija velika meta analiza upotrebe inokulanata navodi pozitivan utjecaj povećanja koncentracije inokulanta na kvalitetu silaže, no ona ne uzima u obzir uvećanje koncentracije istog inokulanta (Irawan i sur. 2021.).

Glukoza, fruktoza i saharoza predstavljaju vodotopljive ugljikohidrate koji su lako dostupni izvor hranjivih tvari za BMK, odnosno one iz njih brzo proizvode kiseline i tako stvaraju kisele uvjete (McDonald i sur. 1991., Moore i Hatfield 1994.). Glavna kiselina u dobro siliranoj zelenoj masi trebala bi biti mliječna kiselina (silaža lucerne 450 – 550 g/kg ST, 20 – 40 g/kg ST; Kung i sur. 2018.). Sinteza ove kiseline najvažnija je za stvaranje kiselih uvjeta, pad pH i konzerviranje (McDonald i sur. 1991.). Nizak pH osigurava nepovoljne uvjete za klostridije i enterobakterije te se time postiže veće očuvanje ST i veća nutritivna vrijednost silaže (Kung Jr 2010a.). Druga kiselina po važnosti u silažama je octena kiselina te se sadržaj ove kiseline u silažama kreće od 10 do 30 g/kg ST, a u silaži lucerne 450 – 550 g/kg ST, 5 – 20 g/kg ST (Kung i sur. 2018.). Ova kiselina ima snažno antifungalno djelovanje, ona inhibira rast kvasaca, pa samim time utječe i na aerobnu stabilnost prilikom otvaranja silaža i ulaska zraka (Wilkinson i Davies 2013.). Primjerice povećanje octene kiseline u silaži kukuruza za 20 g/kg ST povećava aerobnu stabilnost silaže za 9 sati, a povećanje za 40 g/kg ST za čak 56 sati (Danner i sur. 2003.). Visoki sadržaj octene kiseline (> 40 – 60 g/kg ST) može se naći u izrazito vlažnim silažama (ST < 300 g/kg) kojima dominira aktivnost enterobakterija, klostridija i heterofermentativnih BMK (Kung i sur. 2018.). Propionska kiselina uglavnom se u silažama

nalazi u minimalnim količinama (do 1 g/kg ST u silaži lucerne 450 – 550 g/kg ST), ali je često i ispod praga detekcije u suhim silažama (Kung i sur. 2018.). Ukoliko se koriste kemijski dodaci s propionskom kiselinom ili inokulanti koji sintetiziraju propionsku kiselinu, ona može kao i octena kiselina pozitivno utjecati na aerobnu stabilnost (Wilkinson i Davies 2013.). Ako se suprotno tome detektiraju visoke vrijednosti propionske kiseline (> 3 – 5 g/kg ST) one se povezuju s fermentacijama koje uzrokuju klostridije, najčešće *Clostridium propionicum* (Kung i sur. 2018.). Maslačna kiselina ne bi smjela biti prisutna u dobro siliranoj silaži lucerne, ali se tolerira njen sadržaj do 1 – 2 g/kg ST u vlažnijim silažama koje su sklone sekundarnim fermentacijama, ponajviše klostridijama. Visoki sadržaj maslačne kiseline u silažama (> 2 g/kg ST) ukazuje na aktivnost klostridija koje dovode do velikih gubitaka ST, lošije nutritivne vrijednosti i upitne zdravstvene ispravnosti silaža uslijed proizvodnje biogenih amina koji su česti u silažama s klostridijama (McDonald i sur. 1991.). Etanol je najčešći alkohol kojeg pronalazimo u silažama s obzirom da ga veliki broj MO može proizvesti; heterofermentativne BMK, enterobakterije i kvasci (Kung i sur. 2018.). Ukoliko je silaža lucerne kvalitetna, njegov sadržaj je od 5 – 15 g/kg ST. Konzumirani etanol iz silaža u buragu fermentira do octene kiseline gdje služi kao izvor energije preživačima (Kung i sur. 2018.). Visoke vrijednosti etanola (> 30 – 40 g/kg ST) upućuju da je došlo do umnažanja velikog broja kvasaca i takve silaže podložne su brzom kvarenju nakon otvaranja silaže (Wilkinson i Davies 2013.). Dodatno, visoke koncentracije etanola mogu za rezultat imati čudan okus mlijeka životinja hranjenih s takvom silažom, ali i izrazito rijetko dovesti do intoksikacije životinja (Kung i sur. 2018.). Osim etanola, alkoholi koji se u silažama mogu pronaći u malim količinama su metanol, propan-1,2-diol i propanol. Metanol ima sposobnost pretvorbe u metan u buragu te služi kao izvor energije za MO dok propan-1,2-diol konvertira u glukozu u jetri te služi kao izvor energije za kravu, a propanol smanjuje postotak mliječne masti i mliječne kiseline, ali ne i ukupnu proizvodnju mlijeka kod krava (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018.).

Lucerna (*Medicago sativa* L.) je mahunarka koja ima jednu od najvećih hranjivih vrijednosti te je izvrsno proteinsko krmivo koje možemo skladištiti u obliku sijena, sjenaže ili silaže za mliječne krave tijekom laktacije (Leto 2015.). U usporedbi s travama, lucerna ima veću koncentraciju sirovih proteina (SP) i minerala kao i veći puferni kapacitet, ali niži sadržaj vodotopljivih šećera. Puferni kapacitet je prirodna sposobnost neke biljne mase da se odupre promjeni pH (McDonald i sur. 1991.). S obzirom na visoki puferni kapacitet, prilikom pripreme silaže lucerne, potrebna je proizvodnja većih količina mliječne kiseline kako bi pH pao na optimalnu vrijednost (McDonald i sur. 1991.). Do nedavno, lucerna je smatrana kao nepoželjno

krmivo za siliranje budući da je siliranje otežano zbog visokog pufernog kapaciteta i niske koncentracije vodotopljivih šećera (Kung i sur. 2018.) te niskog broja epifitnih BMK (Kung Jr i sur. 2003.). Danas se zbog toga prilikom pripreme silaže lucerne primjenjuje metoda dodavanja inokulanata BMK koji potiču sintezu mliječne kiseline i HMK.

2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Temeljem dosadašnjih istraživanja, hipoteza ovog istraživanja je da dodatak inokulanta BMK usmjerava fermentaciju i sintezu produkata tijekom proizvodnje silaže lucerne te da je proizvodnja produkata u ovisnosti o dodanoj koncentraciji inokulanta. Veća koncentracija inokulanta dati će proporcionalno intenzivniju sintezu produkata.

Cilj rada je ispitati utjecaj tri koncentracije dodanog inokulanta BMK (standardna, standardna uvećana za 50 %, standardna uvećana za 100 %) na razgradnju supstrata i sintezu fermentacijskih produkata u silaži lucerne tijekom aktivne faze siliranja ili fermentacije.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- odrediti sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze u silažama tijekom 124 dana siliranja (točnije 1., 5., 9., 15., 28., 89. i 124. dan)
- odrediti sadržaj produkata fermentacije, točnije: mliječne kiseline, HMK (octene, propionske i maslačne) te alkohola (metanola, etanola, propan-1,2-diola i propanola) u silažama tijekom 124 dana siliranja (točnije 1., 5., 9., 15., 28., 89. i 124. dan)
- usporediti sadržaje supstrata za fermentaciju (glukoze, fruktoze i saharoze) te produkata fermentacije (mliječne kiseline, HMK i alkohola) u silaži lucerne siliranoj bez i s tri različite koncentracije dodanog inokulanta

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1 Priprema silaže

Zelena masa lucerne uzgojena u proljeće 2022. godine u blizini izlaza Rugvica, autoput Zagreb-Lipik, korištena je za pripremu silaža. U fazi ranog pupanja (drugi porast) lucerna je pokošena i sasjeckana na kombajn sjeckalici te odvojena u četiri dijela na koja su aplicirana četiri različita tretmana (slika 2.):

- Tretman 1: kontrola na koju nije apliciran inokulant već je aplicirana destilirana voda u istoj količini koja je korištena za pripremu inokulanta BMK (aplikacija 10 mL radne otopine po kg zelene mase).
- Tretman 2: standardna koncentracija inokulanta odnosno koncentracija preporučena od strane proizvođača (2 g/t svježe mase)
- Tretman 3: koncentracija inokulanta uvećana za 50 % od standardne odnosno inokulant u 1,5x većoj koncentraciji od preporučene od strane proizvođača (3 g/t svježe mase)
- Tretman 4: koncentracija inokulanta uvećana za 100 % od standardne odnosno inokulant u 2x većoj koncentraciji od preporučene od strane proizvođača (4 g/t svježe mase)

Inokulant sadržava kombinaciju homofermentativnih i heterofermentativnih BMK: *Pediococcus pentosaceus* (homofermentativni soj; $\geq 5,00 \times 10^{10}$ CFU/g) te *Lentilactobacillus buchneri* i *Lentilactobacillus hilgardii* (heterofermentativni sojevi; $\geq 7,5 \times 10^{10}$ CFU/g). Korišteni inokulant dio je razvojnog istraživanja te su detalji inokulanta (ime i proizvođač) dio industrijske tajne proizvođača. Radne otopine za aplikaciju pripremljene su prema uputama proizvođača, ali uz korekciju odvaga inokulanta ovisno o pojedinoj koncentraciji (preporučena, 1,5x veća od preporučene i 2x veća od preporučene).



Slika 2. Priprema lucerne za siliranje (vlastiti izvor)

Pripremljena zelena masa lucerne na koju je apliciran svaki tretman silirana je u vakuum vrećicama (280×360 mm, SmartVac, Status d.o.o.), koje su vakumirane na uređaju za vakumiranje i varenje (SmartVac, Status d.o.o.). U svakoj vrećici vakumirano je oko 1 kg zelene mase pojedinog tretmana. Za pripremu silaža korišteno je ukupno 140 vakuum vrećica, po pet ponavljanja za svaki tretman u svakoj vremenskoj točki (silaže su uzorkovane 1., 5., 9., 15., 28., 89. i 124. dan). Zadnje uzorkovanje bilo je 124. dan kada se pretpostavlja da je aktivna faza ili faza fermentacije u proizvodnji silaža sigurno gotova. Aktivna faza ili faza fermentacije traje dok se ne uspostave kiseli uvjeti u silažama i može trajati u zelenoj masi teškoj za siliranje i do 3 mjeseca (McDonald i sur. 1991.).

Po svakom tretmanu pripremljeno je 35 vakuum vrećica (ukupno 140 vrećica) koje su čuvane na sobnoj temperaturi do uzorkovanja (slika 3.). Vakumiranjem se inhibirala prva aerobna faza pripreme silaža (McDonald i sur. 1991.). Nakon otvaranja silaža u svakoj vremenskoj točki (ukupno 20 vrećica za svaku vremensku točku; 5 vrećica za svaki tretman), silaže su spremljene u zamrzivač na -20 °C do kemijskih analiza. Zelena masa lucerne prije aplikacije tretmana, također je uzorkovana u peteroplikatu te spremljena u zamrzivač na -20 °C do kemijskih

analiza. Pripreme silaža i kemijske analize odrađene su u Zavodu za hranidbu životinja, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet.



Slika 3. Siliranje u vakuum vrećicama (vlastiti izvor)

3.2 Kemijske analize

Uzorci zelene mase i silaža (slika 4.) prije kemijskih analiza bili su čuvani na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ te su tri sata prije analiza temperirani na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Svaki uzorak bio je podijeljen na dva dijela te je jedan dio korišten za pripremu vodenog ekstrakta, a drugi za određivanje ST. Suha tvar bila je određena jer su sve vrijednosti analita izražene na ST. Analiza suhe tvari i priprema vodenog ekstrakta bile su napravljene u duplikatu za svaki uzorak.



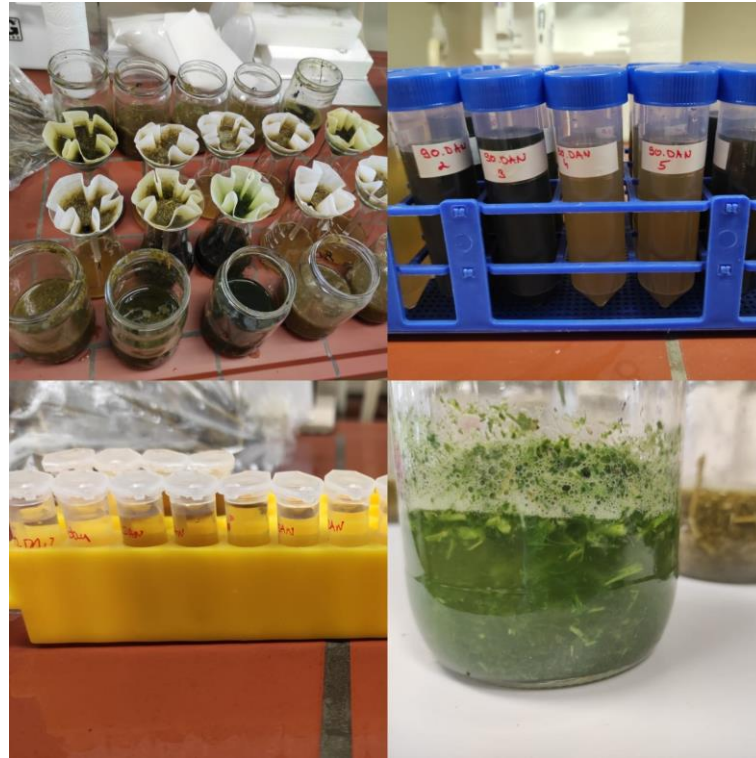
Slika 4. Uzorci zelene mase i silaža nakon temperiranja te spremni za kemijske analize
(vlastiti izvor)

Suha tvar zelene mase i uzoraka silaža određena je sušenjem uzorka u sušioniku UFE 400 (Memmert, Njemačka) na $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 24 sata prema normi HRN ISO 6496:2001 (DZNM, 2001). Iz odnosa mase uzorka prije i poslije sušenja izračunat je udio suhe tvari u uzorku (slika 5).



Slika 5. Određivanje suhe tvari (vlastiti izvor)

Za pripremu vodenog ekstrakta korištena je modifikacija metode za pripremu vodenog ekstrakta u voluminoznim uzorcima (Nishino i Uchida 1999.). Ukratko, 20 g svježeg uzorka zelene mase i silaža homogenizirano je u 200 mL destilirane vode te su tako pripremljeni uzorci ostavljeni u hladnjaku na +4 °C/24 sata. Nakon 24 sata, uzorci su profiltrirani prvo preko naboranog filter papira te je svaki filtrat dodatno profiltriran preko injekcijskog filtera (Chromafil Xtra RC-45/25; Macherey-Nagel, Švicarska) kako bi se odvojile interferirajuće tvari, većinom proteini, koji bi mogli smetati detekciji (slika 6.). Filtrat profiltriran kroz injekcijski filter spremljen je u Eppendorf epruvete od 2 mL (Eppendorf, Njemačka) i stavljen u zamrzivač na -20 °C do analize šećera, mliječne kiseline i HMK te alkohola tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (*engl.* High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

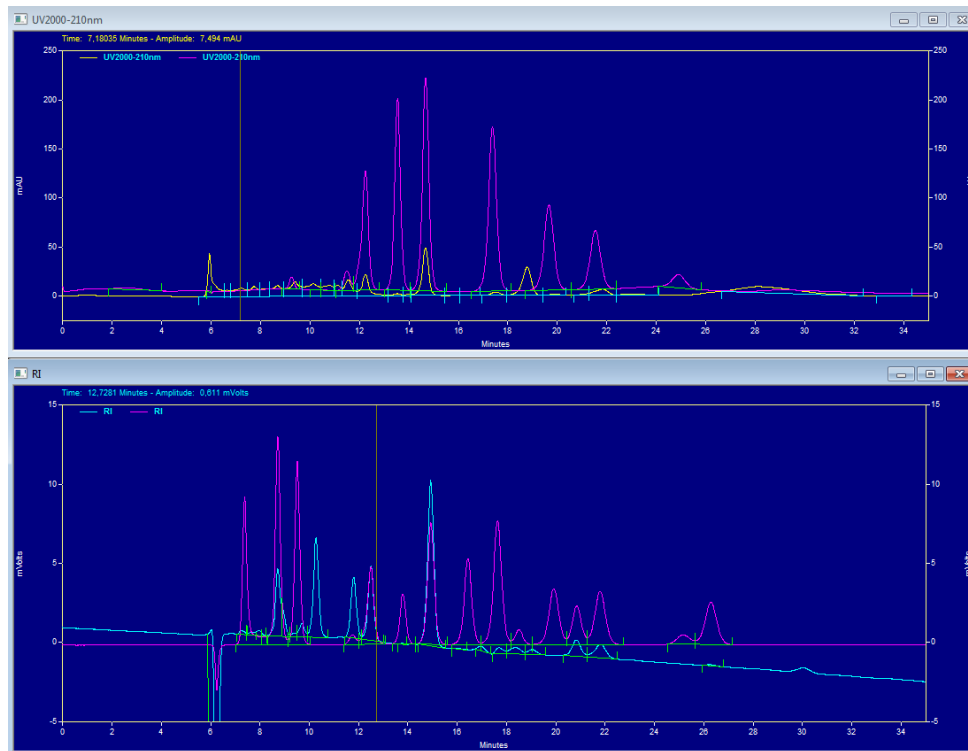


Slika 6. Priprema vodenog ekstrakta uzoraka (vlastiti izvor)

Jednostavni šećeri (glukoza, fruktoza i saharoza), mliječna kiselina, HMK (octena, propionska i maslačna kiselina) i alkoholi (metanol, etanol, propan-1,2-diol i propanol) određeni su modifikacijom metode za određivanje fermentacijskih produkata u silažama na HPLC-u (Canale i sur. 1984.). Sustav za separaciju fermentacijskih produkata bio je sastavljen od Aminex HPX-87H kolone te su kiseline (mliječna, octena, propionska i maslačna kiselina) kvantificirane na UV-VIS (210 nm) i na RI detektoru, dok su šećeri (glukoza, fruktoza, saharoza) i alkoholi (metanol, etanol, propan-1,2-diol i propanol) kvantificirani samo na RI detektoru (slika 7.). Svi analizirani analiti separirani su izokratnim eluiranjem na radnoj temperaturi 41 °C pri čemu je mobilna faza bila razrijeđena sulfatna kiselina 0,0025 M H₂SO₄. Volumen injektiranja otopina uzoraka bio je 10 µL. Svaki je uzorak analiziran u duplikatu, a kao rezultat koncentracije mliječne, octene, propionske i maslačne kiseline te šećera glukoze, fruktoze i saharoze i alkohola etanola i propanola, uzeta je srednja vrijednost dviju paralela. Alkoholi metanol i propan-1,2-diol nisu detektirani u uzorcima. Za identifikaciju i kvantitativno određivanje svih analita (mliječne, octene, propionske i maslačne kiseline; šećera glukoze, fruktoze i saharoze; alkohola etanola i propanola) korištene su ishodne otopine točno pripremljenih koncentracija svakog standarda (Merck, Njemačka) koje su razrijeđene u

definiranim omjerima. Na temelju vrijednosti očitavanja standarda za svaki analit kreiran je baždarni pravac u 7 točaka.

HPLC sustav SpectraSystem (Thermo Separation Products, Inc., SAD) sastojao se od kvaterne gradijent pumpe (P4000), sustava za otplinjavanje (SCM 1000), automatskog sustava za injektiranje uzorka (AS3000), grijača kolone te UV/Vis (UV2000) i RI detektora (RI-150). Podaci su sakupljeni i obrađeni ChromQuest 5.0 softwareom (Thermo Fisher Scientific, SAD).



Slika 7. Kromatogram (UV-VIS i RI) uzorka silaže lucerne (ljubičasto-standard, žuto/plavo-uzorak; vlastiti izvor)

3.3 Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je statističkim paketom SAS 9.4 (Statistical Analysis System, 2015). Razlika u sadržaju kiselina (mliječna, octena, propionska i maslačna), šećera (glukoza, fruktoza, saharoza) i alkohola (etanol i propanol) u silažama ispitana je PROC MIXED procedurom pri čemu su glavni utjecaji bili tretman i vrijeme uzorkovanja silaže te njihova interakcija. Srednje vrijednosti bile su uspoređene i grupirane pomoću PROC PLM (Saxton, 1998.). Statistička signifikantnost bila je postignuta ako je $P \leq 0,05$.

4. REZULTATI

Analizom 140 uzoraka silaža i 5 uzoraka zelene mase na HPLC-u detektirani su i kvantificirani: šećeri glukoza, fruktoza i saharoza te mliječna kiselina i HMK (octena, propionska i maslačna). Od alkohola detektirani su i kvantificirani etanol i propanol, dok su metanol i propan-1,2-diol bili ispod praga detekcije instrumenta.

U tablici 1 prikazan je utjecaj tretmana i vremena siliranja te njihovih interakcija na sadržaje šećera, kiseline i detektiranih alkohola. Dodatak inokulanta (tretman) imao je značajan utjecaj na razgradnju svih vodotopljivih ugljikohidrata - saharozu, glukozu, fruktozu ($P < 0,001$), kao i na proizvodnju svih kiselina u silaži: mliječnu, octenu, propionsku i maslačnu kiselinu ($P < 0,001$). Osim na šećere i kiseline, dodatak inokulanta imao je također značajan utjecaj na proizvodnju alkohola, odnosno na proizvodnju etanola i propanola ($P < 0,001$). Vrijeme siliranja imalo je značajan utjecaj na sve fermentacijske parametre kvalitete silaža ($P < 0,001$). Osim statistički značajnog utjecaja tretmana i vremena siliranja, utvrđen je i statistički značajan utjecaj interakcije tretmana i vremena na sve ispitane parametre, osim na razgradnju saharoze ($P = 0,213$; Tablica 1).

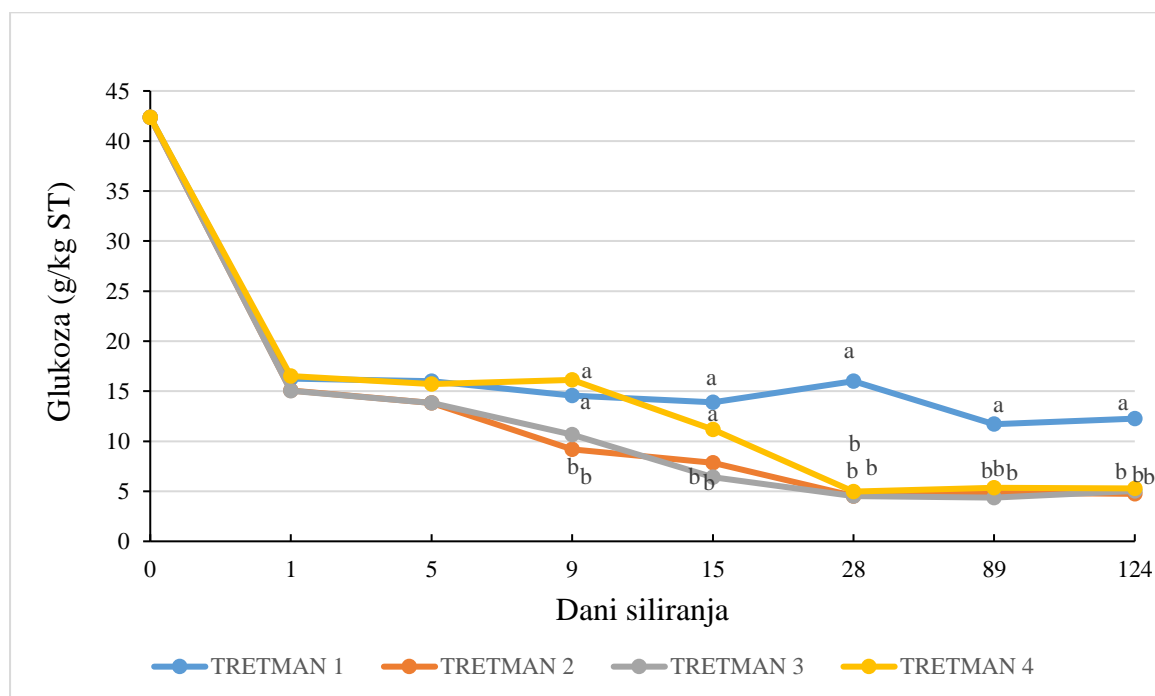
Tablica 1. Utjecaj dodatka inokulanta i vremena siliranja te njihovih interakcija na promjene koncentracija saharoze, glukoze, fruktoze, mliječne kiseline, octene kiseline, propionske kiseline, maslačne kiseline, etanola i propanola u silažama

P	SAH	GLC	FRU	LA	AA	PA	BA	EtOH	PrOH
Tretman (trt)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Vrijeme (v)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
trt*v	0,213	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

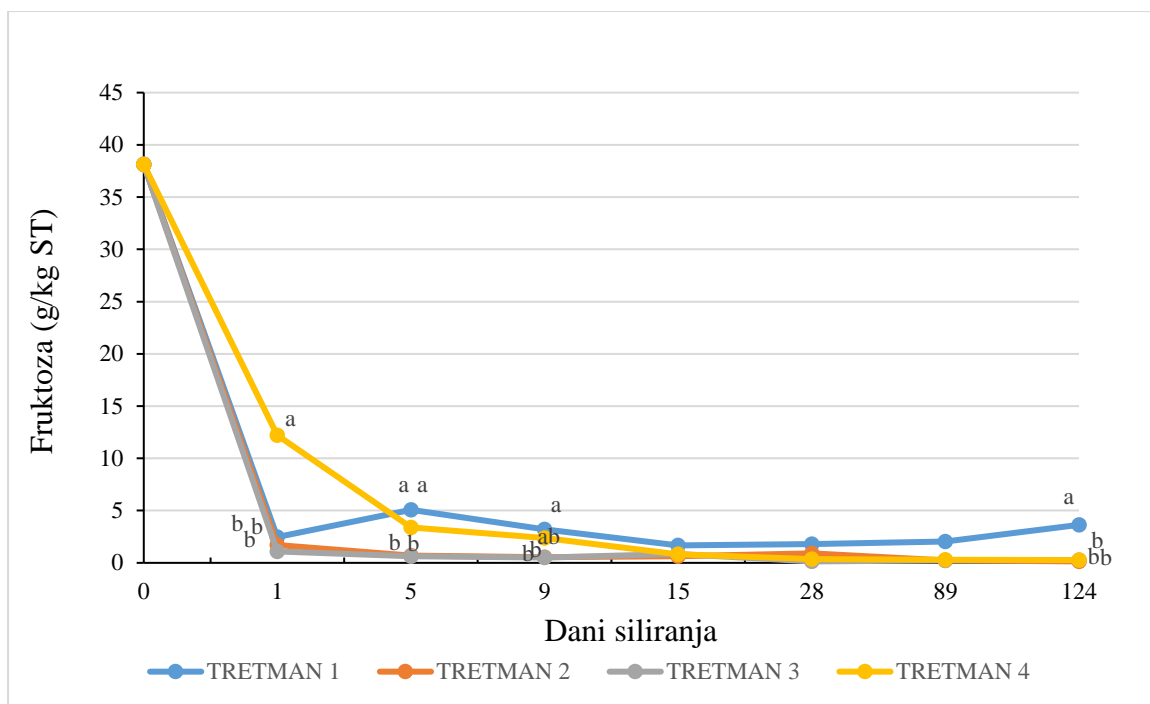
(*engl.* SAH, saccharose – saharoza; *engl.* GLC, glucose – glukoza; *engl.* FRU, fructose – fruktoza; *engl.* LA, lactic acid – mliječna kiselina; *engl.* AA, acetic acid – octena kiselina; *engl.* PA, propionic acid – propionska kiselina; *engl.* BA, butyric acid – maslačna kiselina; *engl.* EtOH, ethanol – etanol; *engl.* PrOH, propan-1-ol – propanol)

4.1 Promjene sadržaja glukoze, fruktoze i saharoze

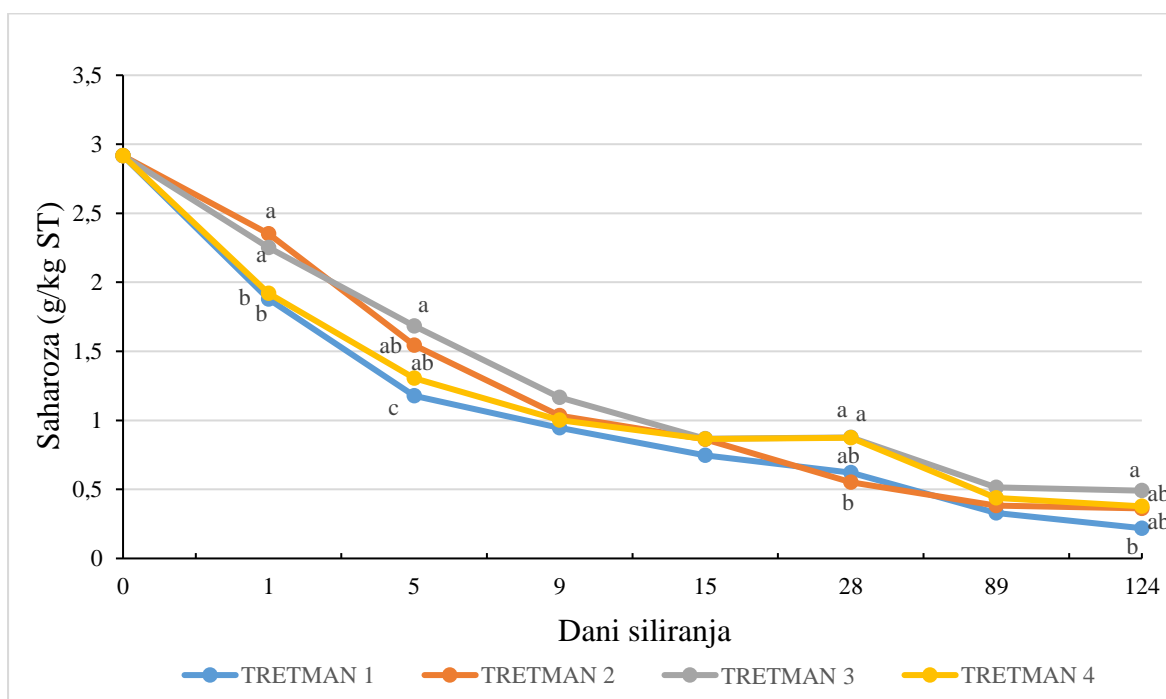
U grafikonu 1 prikazane su promjene sadržaja glukoze u ovisnosti o upotrijebljenim tretmanima tijekom 124. dana siliranja lucerne dok su promjene sadržaja fruktoze prikazane u grafikonu 2. U zelenoj masi (0. dan), na početku siliranja, izmjerene su najveće koncentracije glukoze i fruktoze (grafikon 1, glukoza 42 g/kg ST; grafikon 2, fruktoza 38 g/kg ST). Već 1. dan proizvodnje silaža, izmjeren je značajan pad glukoze i fruktoze. Sadržaj glukoze bio je 3x niži (grafikon 1; sadržaj glukoze od 15 do 17 g/kg ST bez statistički značajne razlike između tretmana), dok je sadržaj fruktoze bio od 1 do 12 g/kg ST uz statistički značajno viši sadržaj fruktoze u tretmanu 4 u odnosu na ostala tri tretmana (grafikon 2). U 9. danu aktivne faze siliranja sadržaj glukoze razlikovao se između tretmana te je viši u tretmanu 1 i 4 u odnosu na ostala dva. Od 28. dana glukoza je značajno viša u tretmanu 1 u odnosu na ostala tri tretmana koja su silirana s dodatkom inokulanta (grafikon 1). Od 5. dana pa sve do 124. dana sadržaj fruktoze bio je najviši u tretmanu 1, ali pri tome od 15. do 89. dana bez statistički značajne razlike između tretmana (grafikon 2).



Grafikon 1. Promjene sadržaja glukoze s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom 124. dana siliranja lucerne



Grafikon 2. Promjene sadržaja fruktoze s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom 124. dana siliranja lucerne

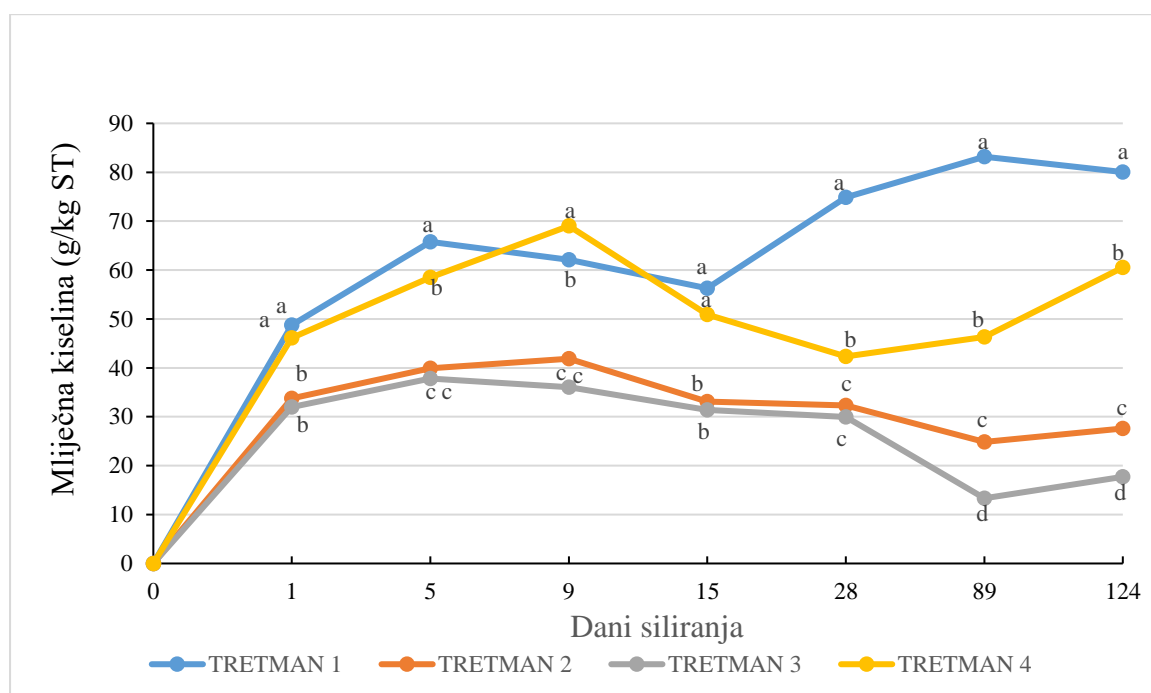


Grafikon 3. Promjene sadržaja saharoze s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom 124. dana siliranja lucerne

U grafikonu 3 prikazane su promjene sadržaja saharoze u ovisnosti o upotrijebljenim tretmanima tijekom 124. dana siliranja lucerne. Isto kao i kod glukoze (grafikon 1) i fruktoze (grafikon 2) u zelenoj masi (0. dan), na početku siliranja, izmjeren je najveći sadržaj saharoze te je iznosio 3 g/kg ST. U 1. danu proizvodnje silaža došlo je do pada sadržaja saharoze gdje se 2 i 3 tretman značajno razlikuju od tretmana 1 i 4. Sadržaji saharoze nastavljaju padati do 15. dana siliranja bez značajne razlike između tretmana. U 28. danu sadržaj saharoze u tretmanima 3 i 4 značajno je viši u odnosu na tretman 2, ali ne i tretman 1. U 124. danu siliranja izmjeren je najniži sadržaj saharoze i to kod tretmana 1 (0,2 g/kg ST), ali je statistički različit samo od tretmana 3.

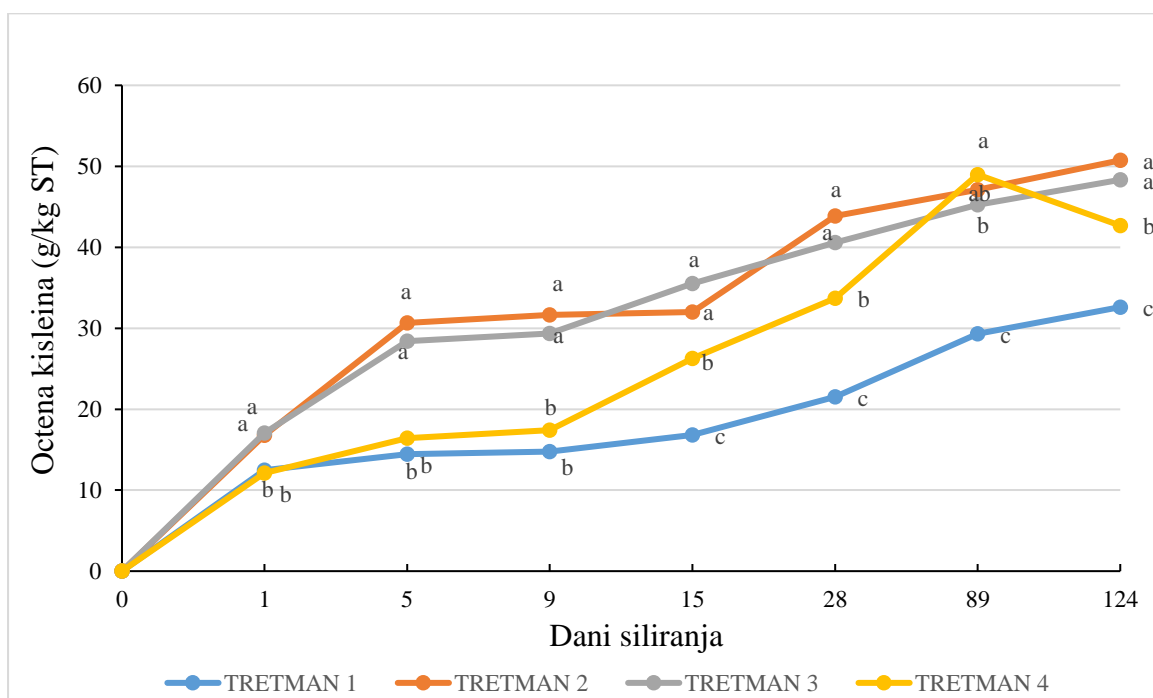
4.2 Promjene sadržaja kiselina

Na grafikonu 4 prikazane su promjene sadržaja mliječne kiseline, na grafikonu 5 promjene sadržaja octene kiseline, dok grafikoni 6 i 7 prikazuju promjene sadržaja propionske i maslačne kiseline. U zelenoj masi (0. dan) na početku siliranja niti jedna od navedenih kiselina nije detektirana. No, već u 1. danu fermentacije došlo je do značajnog rasta mliječne kiseline (sadržaj mliječne kiseline 47 g/kg ST u tretmanima 1 i 4 te 33 g/kg ST u tretmanima 2 i 3 sa statističkom razlikom između grupa tretmana, $P < 0,05$). Tijekom cijelog ispitivanja sadržaj mliječne kiseline bio je najviši u tretmanu 1 uz iznimku u 9. danu kada je tretman 4 imao statistički značajno najviši sadržaj mliječne kiseline (69 g/kg ST). Na kraju, u 124. danu siliranja, sva četiri tretmana imala su različiti sadržaj mliječne kiseline. Tretman 1 (kontrolna silaža bez dodanog inokulanta) imao je najviši sadržaj mliječne kiseline (80 g/kg ST). U tretmanima 2 i 3 detektiran je pad sadržaja mliječne kiseline u odnosu na 9. dan, ali je taj pad bio manje izražen u tretmanu 2 (s 42 g/kg ST na 27 g/kg ST) u odnosu na tretman 3 (s 36 na 18 g/kg ST).



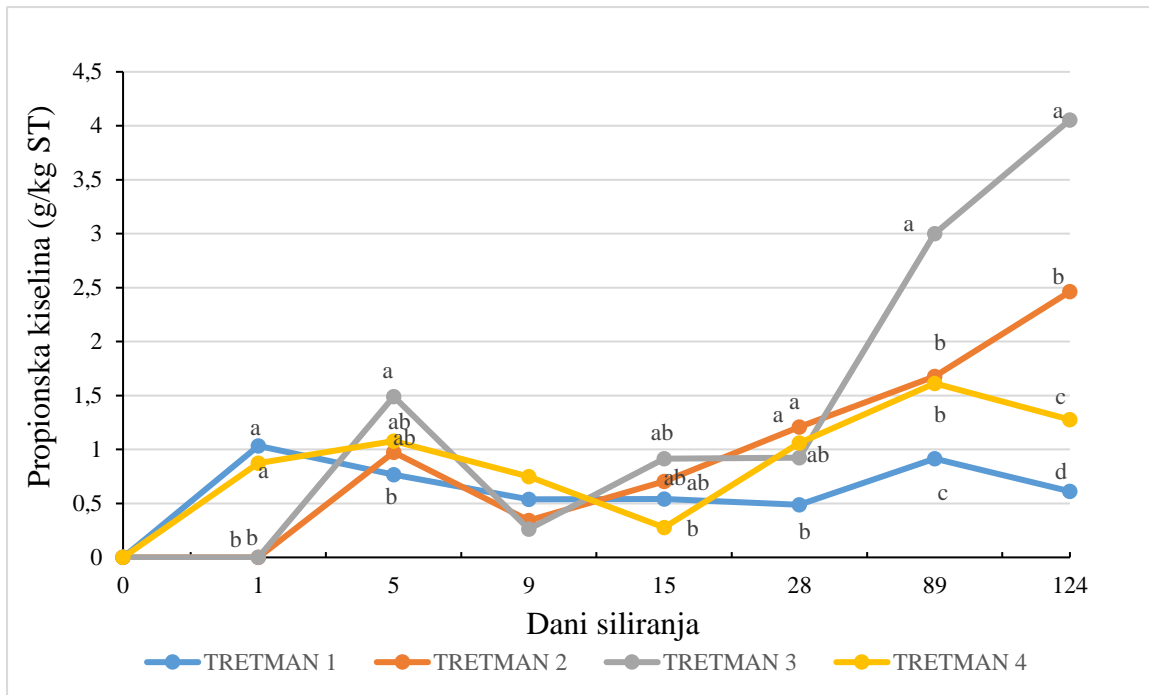
Grafikon 4. Promjene sadržaja mliječne kiseline s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom 124. dana siliranja lucerne

Slično kao i kod mliječne kiseline, već u 1. danu siliranja detektirana je octena kiselina u svim tretmanima te se njen sadržaj kretao oko 17 g/kg ST za tretmane 2 i 3, odnosno 12 g/kg ST za tretmane 1 i 4, uz utvrđenu statistički značajnu razliku između navedenih grupa tretmana ($P < 0,05$). Tretmani 2 i 3 (standardna koncentracija inokulanta i 1,5x standardna koncentracija inokulanta) imali su najviše sadržaje octene kiseline tijekom cijelog razdoblja ispitivanja, uz iznimku u 89. danu siliranja kada je tretman 4 (2x standardna koncentracija inokulanta) imao najviši sadržaj octene kiseline, 49 g/kg ST. Kroz cijeli period aktivne faze tretman 1 imao je najniži sadržaj octene kiseline te je od 9. dana ta razlika bila značajna u odnosu na ostala tri tretmana (grafikon 5).



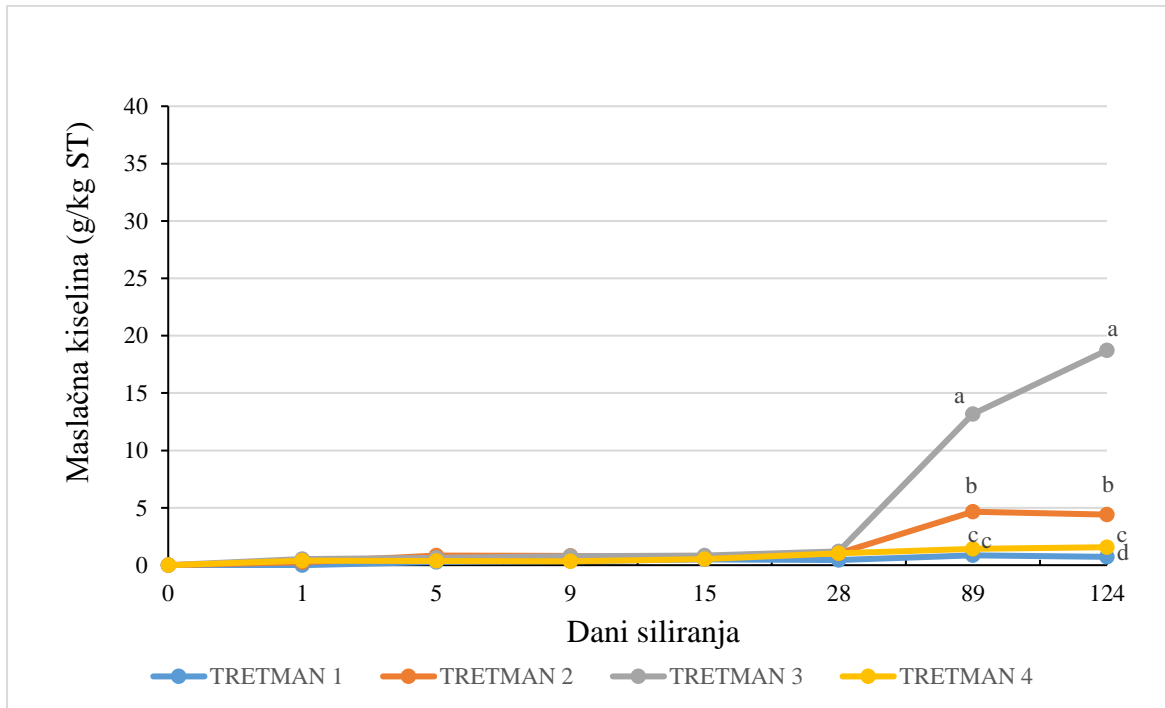
Grafikon 5. Promjene sadržaja octene kiseline s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom 124. dana siliranja lucerne

Za razliku od mliječne i octene kiseline, propionska kiselina detektirana je u 1. danu u tretmanima 1 i 4 dok u tretmanima 2 i 3 nije detektirana. Od 5. dana propionska kiselina je detektirana u svim tretmanima te do kraja testiranog perioda raste, pri tome od 89. dana najveći sadržaj propionske kiseline je bio u tretmanu 3 (3 g/kg ST). Isti tretman imao je najveći sadržaj propionske kiseline i zadnji dan (124. dan, 4 g/kg ST; dok je najniži sadržaj zabilježen u tretmanu 1, 0,6 g/kg ST).



Grafikon 6. Promjene sadržaja propionske kiseline s obzirom na različite koncentracije inokulanata tijekom 124. dana siliranja lucerne

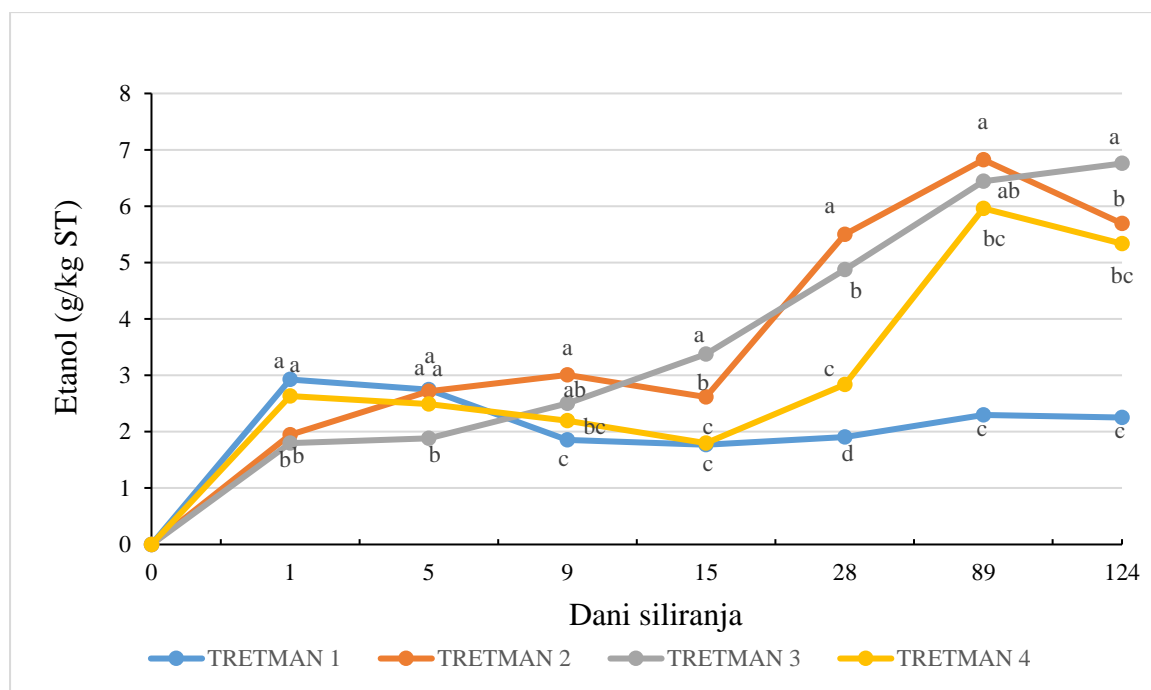
Sadržaji maslačne kiseline sve do 28. dana fermentacije bili su izrazito niski (prosječno 0,6 g/kg ST) i bez statistički značajne razlike između tretmana ($P > 0,05$). U 89. danu detektiran je značajan rast maslačne kiseline u tretmanu 3 (13 g/kg ST) i blagi rast u tretmanu 2 (5 g/kg ST). U 124. danu siliranja, tretman 3 imao je najveći sadržaj maslačne kiseline (19 g/kg ST) a najniži kontrolna skupina (0,7 g/kg ST).



Grafikon 7. Promjene sadržaja maslačne kiseline s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom 124. dana siliranja lucerne

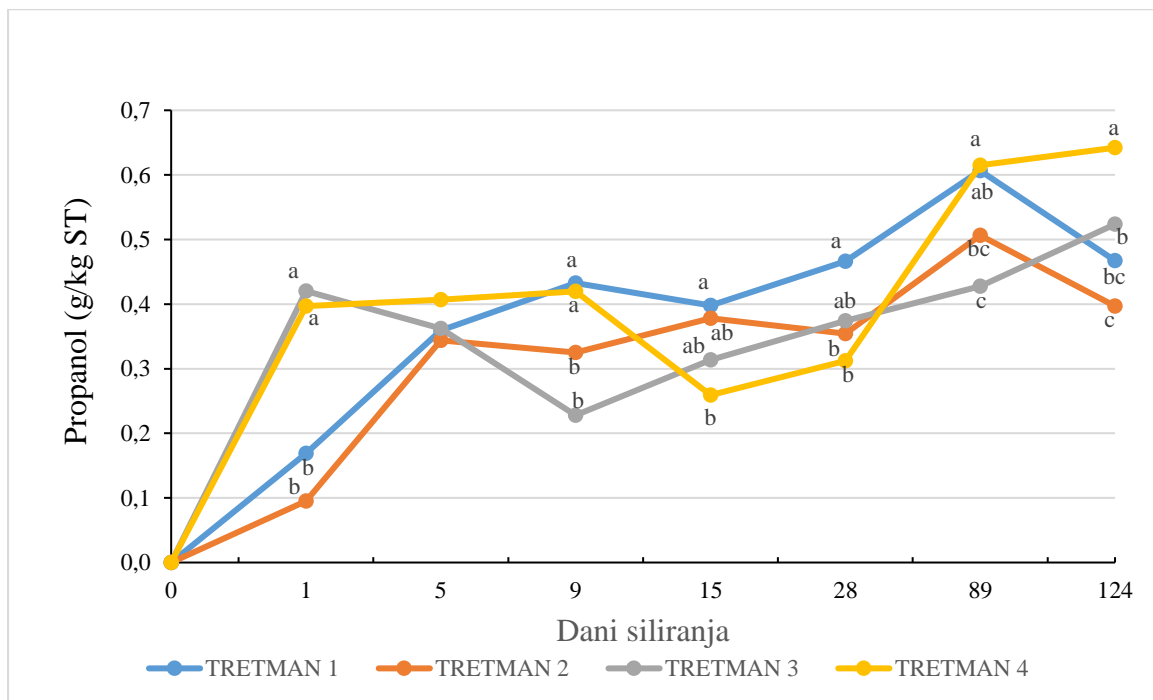
4.3 Promjene sadržaja alkohola

Na grafikonu 8 prikazane su promjene etanola u silažama dok su na grafikonu 9 prikazane promjene propanola. Alkoholi metanol i propan-1,2-diol nisu detektirani tijekom ispitivanja niti u jednom uzorku. U zelenoj masi (0. dan), na početku siliranja, alkoholi nisu detektirani. Međutim, slično kao i kod mliječne i octene kiseline, već u 1. danu zabilježen je rast sadržaja etanola u svim tretmanima te je najveća vrijednost bila u tretmanu 1 (2,9 g/kg ST). Nakon toga, u periodu od 5. do 15. dana, koncentracija etanola bila je stabilna uz male oscilacije u tretmanima 1, 2 i 4, dok je u tretmanu 3 počela kontinuirano rasti sve do kraja ispitivanja. Od 15. dana sadržaj etanola raste u tretmanima 2 i 4 dok je sadržaj etanola u tretmanu 1 imao blagi pad do kraja ispitivanja (124. dan; 2,3 g/kg ST). Na kraju, 124. dan, u tretmanu 3 izmjereno je najviši sadržaj etanola (6,8 g/kg ST), koji je bio značajno viši od sadržaja etanola u ostala dva tretmana s dodanim inokulantom (tretmani 2 i 4) i kontroli (tretman 1).



Grafikon 8. Promjene sadržaja etanola s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom 124. dana siliranja lucerne

U prvom danu siliranja (dan 1.), detektiran je značajan rast propanola u tretmanima 3 (0,42 g/kg ST) i 4 (0,40 g/kg ST) dok u tretmanima 1 i 2 rapidno raste tek u 5. danu, gdje nema statistički značajne razlike između tretmana. Najveći sadržaj propanola izmjeren je u 124. danu siliranja u tretmanu 4 (0,64 g/kg ST), a najniži u tretmanu 2 (0,40 g/kg ST) te se nije razlikovao od sadržaja etanola u tretmanu 1 ($P > 0,05$; 0,43 g/kg ST). U ista dva tretmana (1 i 2) detektiran je pad sadržaja propanola od 89. do 124. dana, dok je u druga dva detektiran porast sadržaja propanola (tretmani 3 i 4).



Grafikon 9. Promjene sadržaja propanola s obzirom na različite koncentracije inokulanta tijekom 124 dana siliranja lucerne

5. RASPRAVA

Aktivna faza ili fermentacija, najvažnija je faza proizvodnje silaža jer u ovoj fazi dolazi do brze i intenzivne proizvodnje mliječne kiseline i HMK, čime dolazi do pada pH i konzerviranja. Sadržaj mliječne kiseline i njen odnos s pojedinim HMK kao i sadržaji ostalih produkata fermentacije, najvažniji su parametri kvalitete silaža (Kung i sur. 2018.). Uspoređujući promjene sadržaja fermentacijskih parametara kvalitete silaža u ovom istraživanju, vidljivo je kako sadržaji supstrata (glukoza, fruktoza i saharoza) padaju, dok proizvodi fermentacije rastu (mliječna kiselina, HMK i alkoholi), što je jasan pokazatelj aktivnosti MO u silažama. Mikroorganizmi, primarno BMK, fermentiraju lako dostupne vodotopljive ugljikohidrate, od kojih su najvažnije frakcije heksoze – glukoza i fruktoza te proizvode mliječnu kiselinu i HMK, alkohole i CO₂ (McDonald i sur. 1991.). Prema grafikonima 1 – 3 u ovom istraživanju vidljivo je kako su sadržaji saharoze, glukoze i fruktoze bili najveći u zelenoj masi (0. dan istraživanja) kod svih tretmana te kako već prvi dan siliranja njihov sadržaj naglo pada. Najviši sadržaj supstrata u zelenoj masi je očekivan i u skladu s istraživanjima na silaži lucerne (Sheperd i sur. 1995., Filya i sur. 2007., Li i sur. 2020., Li i sur. 2022., Na i sur. 2022.) kao i na drugim tipovima silaža (Filya 2003., Contreras-Govea i sur. 2011., Duvnjak i sur. 2019.).

Kontrolna silaža u ovom istraživanju na kraju aktivne faze (124. dan siliranja), imala je 58 % i 94 % viši sadržaj glukoze i fruktoze u odnosu na ostala tri tretmana silaža siliranih s inokulantom ($P < 0,05$). Istraživanje Na i sur. (2022.) o utjecaju komercijalnih inokulanata na kvalitetu fermentacije silaže lucerne silirane 90 dana, pokazuje da intenzitet razgradnje supstrata za fermentaciju ovisi o upotrijebljenim inokulantima, njihovoj koncentraciji i tipu fermentacije ($P < 0,001$). Slično ovom istraživanju, u navedenom radu najviši sadržaj supstrata bio je u kontrolnoj silaži (Na i sur. 2022.). Najniži sadržaj supstrata bio je u silažama siliranim s homofermentativnim BMK inokulantom *Lactiplantibacillus plantarum* u koncentraciji 1 g/t svježe mase (vodotopljivi ugljikohidrati niži za 82 % u odnosu na kontrolnu silažu, $P < 0,05$; Na i sur. 2022.). U istom radu, od svih silaža koje su silirane s inokulantom, najviši sadržaj supstrata imale su silaže u kojima je upotrijebljen inokulant koji je kombinacija homofermentativnih i heterofermentativnih BMK (*Lactiplantibacillus plantarum* i *Lentilactobacillus buchneri*) u koncentraciji od 5 g/t svježe mase, dok slična kombinacija homofermentativnih i heterofermentativnih BMK (*Lactiplantibacillus plantarum*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Pediococcus acidilactici*) u koncentraciji 1 g/t rezultira s 19 % nižim vodotopljivim ugljikohidratima u odnosu na navedenu silažu (Na i sur. 2022.). Važno je

napomenuti da je na kraju ovog istraživanja, za razliku od glukoze i fruktoze, sadržaj saharoze bio najniži u kontrolnim silažama, signifikantno samo u odnosu na tretman 3 (grafikon 3). Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Li i sur. (2022.), gdje je koncentracija vodotopljivih ugljikohidrata viša u silažama lucerne siliranim s dodanim inokulantom (PEI = 6,37 %) nego u kontrolnoj silaži (4,44 %) u 60. danu siliranja. Sposobnost fermentiranja pojedinih supstrata ovisi i o soju BMK, tako homofermentativna *L. plantarum* dobro fermentira sve šećere, dok heterofermentativna *L. buchneri* slabije fermentira saharozu (McDonalds i sur. 1991.). Navedeno može objasniti niži sadržaj saharoze u kontrolnoj silaži u ovom istraživanju, gdje rezultati ukazuju na izrazitu aktivnost homofermentativnih BMK. Sadržaj zaostalih supstrata u silažama ponajviše ovisi o uspješnosti konzerviranja, odnosno o brzini proizvodnje kiselina s naglaskom na mliječnoj kiselini (Kung i sur. 2018.). S obzirom na navedeno, sadržaj supstrata na kraju siliranja treba gledati u odnosu i na tip fermentacije koji prevladava u silaži, odnosno, obzirom na inokulante u silaži ako ih se koristi.

Inokulanti s homofermentativnim BMK proizvode primarno mliječnu kiselinu te brzo stvaraju kisele uvjete čime dolazi do boljeg konzerviranja hranjivih tvari. Ukoliko se radi o inokulantima s heterofermentativnim BMK uz mliječnu kiselinu dolazi i do proizvodnje octene kiseline i ostalih HMK te veće aerobne stabilnosti silaža (McDonald i sur. 1991.). Aerobna stabilnost silaža vezana je uz antifungalne spojeve, octenu i propionsku kiselinu, ali i uz zaostale supstrate. Viši sadržaj zaostalog supstrata često je povezan s nižom aerobnom stabilnosti silaža (Wilkinson i Davies 2013.).

Prema istraživanju Kung i sur. (2018.), optimalne vrijednosti mliječne kiseline iznose 20 – 40 g/kg ST za silažu lucerne 450 – 550 g/kg ST. U ovom istraživanju sadržaj mliječne kiseline bio je viši u kontrolnoj silaži ($P < 0,05$) u odnosu na silaže s inokulantom u svim vremenskim točkama, osim u danima 1., 9., i 15. te je najviši sadržaj mliječne kiseline izmjereno u kontrolnoj silaži bio 83 g/kg ST. Od svih silaža s inokulantom, tretman 4 (silaže s 2x većom koncentracijom od standardne) imao je najbližnje vrijednosti s kontrolnom silažom, a tretman 2 (silaže sa standardnom koncentracijom inokulanta) i tretman 3 (silaže s 1,5x većom koncentracijom od standardne) značajno niže vrijednosti (grafikon 4). U istraživanju Schmidt i sur. (2009.), na silažama lucerne, sadržaj mliječne kiseline eksponencijalno raste u svim tretmanima. Međutim, primjenom inokulanata koji sadrže *Lentilactobacillus buchneri* (heterofermentativna BMK) sintetizira se manje mliječne kiseline u odnosu na *Lactiplantibacillus plantarum* (homofermentativna BMK) (Schmidt i sur. 2009.). Ovo pokazuje kako kod tretmana (tretmani 2 i 3) s najmanjim vrijednostima mliječne kiseline

prevladavaju heterofermentativne BMK koje proizvode mliječnu kiselinu i HMK. Suprotno tome, spontanu fermentaciju kod tretmana 1 (kontrolne skupine) potaknule su homofermentativne BMK što je rezultiralo s najvećim sadržajima mliječne kiseline (124. dan 80 g/kg ST). Pretpostavka je da su u tretmanu 4, obzirom na drugi najveći sadržaj mliječne kiseline pri kraju siliranja (61 g/kg ST), također bile dominantne homofermentativne BMK. Ovi rezultati sukladni su istraživanju Irawan i sur. (2021.), gdje autor navodi kako homofermentativne BMK imaju značajan utjecaj na proizvodnju višeg sadržaja mliječne kiseline u silazama lucerne ($P < 0,05$).

Prema Kung i sur. (2018.), optimalni sadržaj octene kiseline u silaži lucerne s 450 – 550 g/kg ST je 10 – 30 g/kg ST. Kontrolna silaža u ovom istraživanju ulazi u te kriterije, dok su sadržaji octene kiseline u silazama s inokulantom viši ($P < 0,001$, tablica 1; $P < 0,05$, grafikon 5). Više vrijednosti octene kiseline (30 – 40 g/kg ST) česte su u silazama koje su inokulirane s *Lentilactobacillus buchneri*, odnosno u silazama u kojima prevladavaju heterofermentativne BMK (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018.). U ovom istraživanju tretman 2 i tretman 3 imali su značajno viši sadržaj octene kiseline u odnosu na tretman 4 (grafikon 5). Ovaj rezultat, dodatno uz vrijednosti mliječne kiseline, ukazuje na veću aktivnost heterofermentativnih BMK u tretmanu 2 i 3 dok je ta aktivnost niža u tretmanu 4, premda zanimljivo, najveća koncentracija dodanog inokulanta BMK je bila u tretmanu 4 (2x veća koncentracija od standardne ili 4 g/t svježe mase). Iako velika meta analiza upotrebe inokulanata navodi pozitivan utjecaj povećanja koncentracije inokulanta na proizvodnju kiselina i kvalitetu silaže, ona ne uzima u obzir uvećanje koncentracija istih inokulanata (Irawan i sur. 2021.). Dodane BMK međusobno se natječu za prisutne supstrate (McDonald i sur. 1991.) te viša koncentracija inokulanta može djelovati ograničavajući na samu aktivnost BMK koje su u inokulantu. Primjerice, u istraživanju na silaži kukuruza siliranoj 90 dana s dvije različite koncentracije istog inokulanta BMK, nije utvrđen utjecaj koncentracije inokulanta BMK na sadržaj supstrata na kraju siliranja, niti na proizvode fermentacije (Assis i sur. 2014.). Takvog tipa istraživanja na silaži koja se teško silira, kao što je lucerna, nema.

Propionska kiselina u dobro siliranim silazama uglavnom se nalazi u minimalnim koncentracijama (do 1 g/kg ST u silaži lucerne 450 – 550 g/kg ST; Kung i sur. 2018.). Ova kiselina, kao i octena kiselina, ima antifungalna svojstva te su silaže s višim sadržajem propionske kiseline aerobno stabilne tijekom izuzimanja (Wilkinson i Davies 2013.). Zato se danas tijekom pripreme silaža koriste inokulanti heterofermentativnih BMK koji će povećati njenu proizvodnju (Muck i sur. 2018.). Međutim ako su u pitanju visoki sadržaji propionske

kiseline (3 – 5 g/kg ST u silaži lucerne), pretpostavlja se da je došlo do negativne sekundarne fermentacije koja je uzrokovana aktivnošću *Clostridium propionicum* (Kung i sur. 2018.). Prema rezultatima ovog istraživanja, tretman 3 (1,5x veća koncentracija od standardne ili 3 g/t svježe mase), imao je najviši sadržaj propionske kiseline 124. dan i to preko 4 g/kg ST (grafikon 6). Isti tretman imao je najmanji sadržaj mliječne kiseline (18 g/kg ST) i najviši sadržaj maslačne kiseline (18 g/kg ST) u 124. danu siliranja (grafikoni 4 i 7). Maslačna kiselina ne bi smjela biti detektirana u dobro siliranim silažama, no tolerira se do 1 – 2 g/kg ST u vlažnijim silažama (Kung i sur. 2018.). Ukoliko se detektira prisutnost ove kiseline > 2 g/kg ST, znači da je došlo do sekundarne aktivnosti nepoželjnih MO kao što su klostridije (Kung i sur. 2018.). One izravno utječu na veliki gubitak ST kao i na smanjenu nutritivnu vrijednost silaža (McDonald i sur. 1991, Muck i sur. 2018.). Rezultati tretmana 3 ukazuju na prisutnu aktivnost klostridija; visoki sadržaji maslačne i propionske kiseline te niski sadržaj mliječne kiseline (grafikoni 4, 6 i 7). Slične visoke sadržaje maslačne i propionske kiseline odredili su Nishino i Uchida (1999.; maslačna od 2,14 do čak 101 g/kg ST te propionska 0,86 g/kg ST do 3,04 g/kg ST) na silaži lucerne ST od 247 g/kg do 289 g/kg što je zamjetno niža ST od ST u ovom istraživanju (od 415 do 466 g/kg ST). Vlažne silaže (ST < 250 g/kg) s niskom sintezom mliječne kiseline izrazito su podložne negativnim sekundarnim fermentacijama klostridija (Kung i sur. 2018.).

Primjerice, tretman 2 (standardna koncentracija inokulanta BMK ili 2 g/t svježe mase) koji je na kraju istraživanja imao nešto viši sadržaj mliječne kiseline (28 g/kg ST vs. 18 g/kg ST u tretmanu 3, (grafikon 4)) imao je niže sadržaje propionske kiseline (2,5 g/kg ST vs. 4,1 g/kg ST u tretmanu 3, (grafikon 6)) i maslačne kiseline (4,4 g/kg ST vs. 18,4 g/kg ST u tretmanu 3, (grafikon 7)). S druge strane, silaže iz tretmana 1 (kontrolna silaža) i tretmana 4 gdje je vidljiva veća aktivnost homofermentativnih BMK (silaže iz tih tretmana imale su veći sadržaj mliječne kiseline i niži sadržaj octene kiseline) imale su najniže sadržaje propionske i maslačne kiseline (grafikoni 6 i 7). Kako navodi Oliveira i sur. (2017.), primjenom inokulanta homofermentativnih BMK reducira se pojava klostridija, kvasaca i maslačne kiseline. *C. perfringens* i *C. sporogenes* imaju mogućnost fermentiranja proteina, razgradnju aminokiselina i pri tome stvaraju velike količine propionske i maslačne kiseline (Rossi i Dellaglio 2007.). Korištenjem homofermentativne BMK *L. plantarum* proizvedena je silaža lucerne koja je imala 7 puta niži sadržaj maslačne kiseline (0,85 vs. 6,67 g/kg ST) i 2,5 puta niži sadržaj propionske kiseline (0,73 vs 1,86 g/kg ST) te dvostruko viši sadržaj mliječne kiseline (31,1 vs. 13,4 g/kg ST) i dvostruko niži sadržaj octene kiseline (14,5 vs. 30,6 g/kg ST) u odnosu na silažu u kojoj

nije korištena *L. plantarum* (Li i sur. 2020.). Međutim, silaže s većim sadržajem mliječne kiseline i nižim HMK su aerobno nestabilne jer je u takvim silažama niski sadržaj HMK koje imaju antifungalna svojstva (Muck i sur. 2018.). Rezultati sinteze kiselina u ovom istraživanju ukazuju na veću aktivnost homofermentativnih BMK u tretmanima 1 i 4, a heterofermentativnih BMK u tretmanima 2 i 3.

U ovom istraživanju, osim promjena sadržaja šećera i kiselina pratila se i promjena alkohola tijekom 124 dana siliranja. U silažama bili su detektirani etanol i propanol. Zanimljivo, u silažama nije detektiran propan-1,2-diol koji nastaje kao produkt aktivnosti *Lentilactobacillus buchneri* odnosno razgradnje mliječne kiseline u octenu kiselinu (Kung i sur. 2018., Selwet 2020.), što ukazuje na izravnu sintezu octene kiseline iz vodotopljivih šećera. Od svih alkohola, najviše je bilo etanola. Etanol je alkohol kojeg najčešće nalazimo u silažama s obzirom da ga veliki broj MO može proizvesti (McDonald i sur. 1991., Oliviera i sur. 2017., Kung i sur. 2018.). Vrijednosti etanola u kvalitetnim silažama lucerne kreću se od 5 – 15 g/kg ST, 450 – 550 g/kg ST (Kung i sur. 2018.). Ukoliko se radi o vrijednostima većim od 30 – 40 g/kg ST, može se zaključiti da je došlo do aktivnosti velikog broja kvasaca, a samim time i gubitka ST. Uslijed velikog broja kvasaca dolazi do specifičnog mirisa silaže koji je ugodnog, slatkastog i voćnog mirisa zbog proizvodnje estera (nastaju interakcijom kiselina i alkohola) te je ovaj miris povezan s negativnim promjenama u siliranoj masi (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 2018.). U ovom istraživanju sadržaj etanola kod svih silaža bio je unutar granica za dobro siliranu silažu lucerne (niže od 7 g/kg ST) pri čemu je najveći porast sinteze etanola bio u silažama s dodanim inokulantom od 15. dana siliranja kada počinje aktivnost heterofermentativnih BMK (grafikon 8). U istraživanju Kung Jr i sur. (2003.), kontrolna silaža imala je nižu koncentraciju etanola (4,5 g/kg ST) u odnosu na silažu inokuliranu s heterofermentativnom BMK *L. buchneri*, gdje je sadržaj etanola bio 6,2 g/kg ST. Kontrolna silaža u ovom istraživanju imala je značajno niži sadržaj etanola u odnosu na silaže s dodanim inokulantom. Sadržaj etanola u kontrolnoj silaži nije se značajno mijenjao, najveći porast bio je u 1. danu (3 g/kg ST) te je ostao stabilan do 124. dana (2,25 g/kg ST; grafikon 8). Kontrolnu silažu u ovom istraživanju odlikuje aktivnost homofermentativnih BMK – veća je proizvodnja mliječne kiseline te smanjena proizvodnja ostalih parametara kvalitete fermentacije silaže (HMK i alkohola). Najveći sadržaj etanola bio je u tretmanu 3 koji je imao najnižu mliječnu kiselinu te se taj tretman statistički razlikovao od tretmana 2 i 4 u sadržaju etanola. Od svih tretmana, u tretmanu 3 bila je vidljiva izrazita sinteza propionske i maslačne kiseline te etanola, što ukazuje na nekontroliranu fermentaciju (McDonald i sur. 1991., Kung i sur. 1991.).

Drugi alkohol koji je bio detektiran u ovom radu je propanol. U većini silaža, koncentracije propanola su minimalne dok kod silaža inokuliranih s *Lentilactobacillus buchneri*, vrijednosti mogu biti i preko 21,7 g/kg ST (Kristensen i sur. 2010., Li i Nishino 2011.). Iako je u ovom radu propanol detektiran, njegove vrijednosti bile su izrazito niske (grafikon 9).

6. ZAKLJUČAK

Usprkos glavnoj ideji rada, koja je bazirana na novijoj meta analizi o proporcionalnom odnosu koncentracije inokulanta i proizvodnje kiselina, odnosno, da veća koncentracija inokulanta BMK daje proporcionalno bržu i intenzivnu proizvodnju kiselina, rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazali su drugačije:

- uvećanje koncentracije inokulanta za 50 % za rezultat ima nekontroliranu sekundarnu fermentaciju uslijed preintenzivne aktivnosti heterofermentativnih BMK – 325 % više maslačne kiseline, 65 % više propionske kiseline i 19 % više etanola te 36 % manje mliječne kiseline
- uvećanje koncentracije inokulanta za 100 % za rezultat ima preveliku aktivnost homofermentativnih BMK i inhibiciju heterofermentativnih BMK – 65 % manje maslačne kiseline, 48 % manje propionske kiseline i 16 % manje octene kiseline te 120 % više mliječne kiseline

Uvećanje koncentracije inokulanta koji je kombinacija homofermentativnih i heterofermentativnih BMK ne rezultira s proporcionalnim uvećanjem produkata fermentacije.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Mariji Duvnjak na pruženoj prilici, strpljenju, vremenu, potpori, stručnim kao i životnim savjetima te na ukazanom povjerenju da pod njezinim vodstvom prijavim ovaj rad na natječaj za Rektorovu nagradu.

Zahvaljujem se svim članicama laboratorija Zavoda za hranidbu životinja, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, koje su mi pomogle u provođenju svih kemijskih analiza potrebnih za ovaj rad.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, voljenoj osobi, kolegama s fakulteta i prijateljima za veliku podršku prilikom pisanja ovog rada.

8. POPIS LITERATURE

Assis F. G. D. V. D., Ávila C. L. D. S., Pinto J. C., Schwan R. F. (2014). New inoculants on maize silage fermentation. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 43: 395-403

Borreani G., Tabacco E., Schmidt R. J., Holmes B. J., Muck R. E. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*. 101(5): 3952-3979

Canale A., Valente M.E., Ciotti A. (1984). Determination of volatile carboxylic acids (C1–C5i) and lactic acid in aqueous acid extracts of silage by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 35(11): 1178-1182

Contreras-Govea F. E., Muck R. E., Mertens D. R., Weimer P. J. (2011). Microbial inoculant effects on silage and in vitro ruminal fermentation, and microbial biomass estimation for alfalfa, bmr corn, and corn silages. *Animal Feed Science and Technology*. 163(1): 2-10

Danner H., Holzer M., Mayrhuber E., Braun R. (2003). Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(1): 562-567

Duvnjak M. (2016). Utjecaj hibrida i dodataka silaži na udio ukupnih i γ -zeina tijekom siliranja visoko vlažnog zrna kukuruza. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet

Duvnjak M., Kljak K., Grbeša D. (2019). Response of common silage corn hybrids to inoculant application: fermentation profile, carbohydrate fractions, and digestibility during ensiling. *Animal Production Science*. 59(9): 1696-1704

DZNM. (2001). HRN ISO 6496:2001. Stočna hrana - Određivanje vode i udjela drugih hlapljivih tvari.

Filya I. (2003). The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *Journal of Applied Microbiology*. 95(5): 1080-1086

Filya I., Muck R. E., Contreras-Govea F. E. (2007). Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value. *Journal of Dairy Science*. 90(11): 5108-5114

Galić I. (2020). Spremanje silaže u bale omotane plastičnom folijom. Doktorski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet

Getachew G., Laca E. A., Putnam D. H., Witte D., McCaslin M., Ortega K. P., DePeters E. J. (2018). The impact of lignin downregulation on alfalfa yield, chemical composition, and in vitro gas production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98(11): 4205-4215

Irawan A., Sofyan A., Ridwan R., Hassim H. A., Respati A. N., Wardani W. W., Jayanegara A. (2021). Effects of different lactic acid bacteria groups and fibrolytic enzymes as additives on silage quality. A meta-analysis. *Bioresource Technology Reports*. 14: 100654

Kristensen N. B., Sloth K. H., Højberg O., Spliid N. H., Jensen C., Thøgersen R. (2010). Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *Journal of Dairy Science*. 93(8): 3764-3774

Kung Jr L. (2010a). Aerobic stability of silage. In *Proceedings, 2010 California Alfalfa and Forage Symposium and Crop/Cereal Silage Conference*. vol. 2. Visalia. CA. University of California. Davis. CA.

Kung Jr L. (2010b). Understanding the biology of silage preservation to maximize quality and protect the environment. In Proceedings, 2010 California Alfalfa and Forage Symposium and Corn/Cereal Silage Conference (pp:1-2). Visalia. CA. University of California. Davis. CA.

Kung Jr L., Shaver R. D., Grant R. J., Schmidt R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*. 101(5): 4020-4033

Kung Jr L., Stokes M. R., Lin C. J. (2003). Silage additives. U: Silage science and technology Ur (Buxton D.R., Muck R.E., Harrison J.H.). 42: 305-360

Leto J. (2015). Spremanje silaže. *Gospodarski list*, [online] <https://gospodarski.hr/rubrike/krmno-bilje/prilog-broja-spremanje-silaze/> (pristupljeno 20. ožujka 2023.)

Li R., Jiang D., Zheng M., Tian P., Zheng M., Xu C. (2020). Microbial community dynamics during alfalfa silage with or without clostridial fermentation. *Scientific Reports*. 10(1): 1-14

Li Y., da Silva E. B., Li J., Kung Jr L. (2022). Effect of Homo-Fermentative Lactic Acid Bacteria Inoculants on Fermentation Characteristics and Bacterial and Fungal Communities in Alfalfa Silage. *Fermentation*, 8(11): 621

Li Y., Nishino N. (2011). Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. *Grassland Science*. 57(4): 184-191

McDonald P., Henderson A. R., Heron S. J. E. (1991). *The Biochemistry of Silage*. Chalcombe publications.

Moore K. J., Hatfield R. D. (1994). Carbohydrates and forage quality. *U Forage quality, evaluation, and utilization*. Ur (George C. Fahey Jr.): 229-280

Muck R. E., Nadeau E. M. G., McAllister T. A., Contreras-Govea F. E., Santos M. C., Kung Jr L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*. 101(5): 3980-4000

Na N., Qili M., Wu N., Sun L., Xu H., Zhao Y., Tao Y. (2022). Bacterial community and fermentation quality of ensiling alfalfa with commercial lactic acid bacterial additives. *Frontiers in Microbiology*. 789

Nishino N., Uchida S. (1999). Laboratory evaluation of previously fermented juice as a fermentation stimulant for lucerne silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79(10): 1285-1288.

Oliveira A. S., Weinberg Z. G., Ogunade I. M., Cervantes A. A., Arriola K. G., Jiang Y., Adesogan A. T. (2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 100(6): 4587-4603

Rossi F., Dellaglio F. (2007). Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. *Journal of Applied Microbiology*. 103(5): 1707-1715

Saxton A. M. (1998). A macro for converting mean separation output to letter groupings in Proc Mixed. U: Proceedings of the 23rd SAS Users Group International (SAS Institute Incorporated: Cary, NC): 1243-1246

Schmidt R. J., Hu W., Mills J. A., Kung Jr L. (2009). The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*. 92(10): 5005-5010

Selwet M. (2020). Influence of inoculation with *Lactobacillus* on fermentation, production of 1, 2-propanediol and 1-propanol as well as Maize silage aerobic stability. *Open Life Sciences*. 15(1): 373-378

Sheperd A. C., Maslanka M., Quinn D., Kung Jr L. (1995). Additives containing bacteria and enzymes for alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*. 78(3): 565-572

Weinberg Z. G., Muck R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews* 19: 53-68

Wilkinson J. M., Davies D. R. (2013). The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. *Grass and Forage Science*. 68(1): 1-19

9. SAŽETAK

Vida Vertuš

Odnos koncentracije inokulanta i parametara fermentacije u silaži lucerne

Proizvodnja silaža predstavlja konzerviranje hranjivih tvari biljke, pri čemu je proizvodnja mliječne kiseline i hlapljivih masnih kiselina (HMK), koja se događa tijekom aktivne faze siliranja ili fermentacije, najvažniji faktor koji utječe na konzerviranje. Kako bi se usmjerila fermentacija i povećala proizvodnja kiseline, pogotovo u zelenoj masi koja se teško silira kao što je lucerna, dodaju se inokulanti bakterija mliječne kiseline (BMK), pri čemu bi veća koncentracija inokulanta trebala dati intenzivniju proizvodnju kiselina. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj tri koncentracije dodanog inokulanta BMK (standardna, standardna uvećana za 50 %, standardna uvećana za 100 %) na razgradnju supstrata i sintezu produkata (mliječna kiselina, HMK i alkoholi) tijekom aktivne faze siliranja lucerne (do 124. dana). U uzorcima zelene mase te silaža uzorkovanih 1., 5., 9., 15., 89. i 124. dan za kvantifikaciju mliječne kiseline i HMK (octena, propionska i maslačna kiselina), alkohola (metanol, etanol, propan-1,2-diol i propanol) te šećera (glukoza, fruktoza i saharoza) korištena je HPLC metoda. Tijekom aktivne faze siliranja u svim silažama došlo je do razgradnje supstrata fermentacije ($P < 0,001$) i sinteze mliječne kiseline, HMK te alkohola etanola i propanola ($P < 0,001$), dok su alkoholi metanol i propan-1,2-diol bili ispod praga detekcije. Međutim, intenzitet sinteze produkata fermentacije razlikovao se između silaža ovisno o upotrijebljenim koncentracijama inokulanta ($P < 0,001$). Uvećanje koncentracije inokulanta za 50 % dovelo je do 325 % više maslačne kiseline ($P < 0,05$), 65 % više propionske kiseline ($P < 0,05$) i 19 % više etanola ($P < 0,05$) te 36 % manje mliječne kiseline ($P < 0,05$) u odnosu na standardnu koncentraciju inokulanta BMK. No, uvećanje koncentracije inokulanta za 100 % dovelo je do suprotnog efekta s 65 % manje maslačne kiseline ($P < 0,05$), 48 % manje propionske kiseline ($P < 0,05$) i 16 % manje octene kiseline ($P < 0,05$) te 120 % više mliječne kiseline ($P < 0,05$) u odnosu na standardnu koncentraciju inokulanta BMK te je ova silaža bila slična kontrolnoj silaži ($P > 0,05$). Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti kako uvećanje koncentracije inokulanta ne rezultira proporcionalnim uvećanjem produkata fermentacije.

Ključne riječi: silaža lucerne, BMK, mliječna kiselina, HMK

10. SUMMARY

Vida Vertuš

The relationship between inoculant concentration and fermentation parameters in alfalfa silage

The goal of silage production is to preserve plant nutrients, where the production of lactic acid and volatile fatty acids (VFA) during the active phase of silage or fermentation is the most important factor for conservation. To control and increase acid production, especially in the green mass of alfalfa, which is difficult to ensile, inoculants of lactic acid bacteria (LAB) are added. In this study, the effect of three different concentrations of the added LAB inoculant (standard, standard with 50% increase, standard with 100% increase) on the degradation of the substrate and the synthesis of the product (lactic acid, VFA and alcohols) during the active phase of ensiling of alfalfa (up to 124 days) was tested. In samples of green mass and silages taken on the 1st, 5th, 9th, 15th, 89th and 124th day, the HPLC method was used to quantify lactic acid and VFA (acetic acid, propionic acid and butyric acid), alcohols (methanol, ethanol, propane-1,2-diol and propan-1-ol) and sugars (glucose, fructose, saccharose). During the active phase of ensiling, there was evidence of substrate degradation ($P < 0.001$) and synthesis of lactic acid, VFA, and the alcohols ethanol and propanol ($P < 0.001$), whereas the alcohols methanol and propane-1,2-diol were not detectable. However, the intensity of fermentation product synthesis differed between silages depending on the concentration of inoculant used ($P < 0.001$). Increasing the LAB inoculant concentration by 50% resulted in 325% more butyric acid ($P < 0.05$), 65% more propionic acid ($P < 0.05$), and 19% more ethanol ($P < 0.05$), and 36% less lactic acid ($P < 0.05$) compared with the standard concentration of LAB inoculant. Increasing the LAB inoculant concentration by 100% had a different effect on the silages. The silage had similar fermentation parameters as the control silage ($P > 0.05$) with 65% less butyric acid ($P < 0.05$) and 48% less propionic acid ($P < 0.05$) compared to the standard concentration of LAB inoculant. In summary, the results show that the production of fermentation products is not proportional to the increase in the concentration of inoculant.

Keywords: alfalfa silage, LAB, lactic acid, VFA

11. ŽIVOTOPIS

Vida Vertuš rođena je 27.05.1999. u Varaždinu. U Varaždinu završava IV.OŠ.Varaždin te dvojezičan smjer na Prvoj Gimnaziji Varaždin. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2018. godine. U osmom mjesecu 2021. godine završava preddiplomski studij animalne znanosti i stječe naziv univ. bacc. ing. agr. Kao koautor sudjeluje u radu „Selekcija i dobrobit svinja“ koji je objavljen u časopisu Stočarstvo. Tijekom preddiplomskog studija dobitnica je STEM stipendije te Varaždinske stipendije za uspješnost. Prilikom pisanja ovog rada završava diplomski studij Hranidba životinja i hrana gdje je ostvaruje prosjek 4,94 i ulazi u kategoriju 10 % najuspješnijih studenata na studiju te je dobitnica STEM stipendije (diplomski studij). Trenutno se usavršava na stručnoj praksi u Barceloni (UAB) u sklopu Erasmus+ programa razmjene te sudjeluje u brojnim znanstvenim i eksperimentalnim istraživanjima.