

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Metabolismus pektinu u bakterií izolovaných z trávicího
traktu králíka**

Vypracoval:

Mgr. Lenka Slováková

Školitel:

prof. Ing. Milan Marounek DrSc.

Studijní obor:

Fyziologie živočichů

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem v předložené disertační práci použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu literatury.

Prohlašuji, že jsem disertační práci ani žádnou její část nepředložila k získání jiného akademického titulu.

V Praze 28.5.2007

Lena Glenská /

ÚVOD	3
PODĚKOVÁNÍ	5
SOUHRN	6
SUMMARY	8

I. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1. BIOLOGIE KRÁLÍKA OBECNÉHO

1.1. Původ a rozšíření králíka obecného	10
1.2. Produkce králičího masa	11
1.3. Chov králíků v České republice po roce 1990	12

2. TRÁVICÍ TRAKT KRÁLÍKŮ

2.1. Anatomie a fyziologie trávicího traktu králíků	15
2.2. Ontogenese trávení králíků	19
2.3. Role střevní mikroflóry v trávicím procesu u králíků	20
2.4. Cékotrofie	21
2.5. Vláknina a její vliv na trávicí procesy u králíků	22
2.5.1. Chemické složení vlákniny	22
2.5.2. Vliv vlákniny na trávení králíků	26

3. PEKTIN

3.1. Struktura pektinu	28
3.2. Chemické a biologické vlastnosti pektinu	31
3.3. Metabolismus pektinu	32
3.3.1. Intracelulární metabolismus uronových kyselin	34
3.3.2. Fermentace pektinu směsnou kulturou mikroorganismů slepého střeva králíků	37
3.4. Pektinolytické bakterie v trávicím traktu králíků	38
3.5. Vliv pektinu na trávicí procesy králíků	39

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. MATERIÁL A METODIKY

4.1. Seznam použitých chemikalií a přístrojů	41
4.2. Izolace a charakterizace pektinolytických bakterií ze slepého střeva králíků	42

4.2.1. Použitá zvířata	42
4.2.2. Izolace a identifikace pektinolytických bakterií	42
4.3. Pektin	43
4.4. Kultivační média	43
4.5. Kultivace směsných kultur obsahu slepého střeva	45
4.6. Stanovení ethanolu a těkavých mastných kyselin	46
4.7. Stanovení CO₂, H₂ a CH₄	46
4.8. Stanovení pektinu, glukosy, škrobu a xylanu	47
4.9. Stanovení sušiny a buněčné bílkoviny	47
4.10. Příprava buněčného extraktu	47
4.11. Stanovení aktivity polygalakturonát lyasy	48
4.12. Stanovení aktivity polygalakturonát hydrolasy	48
4.13. Stanovení aktivity KDPG aldolasy	48
4.14. Syntéza KDPG	49
4.15. Viskozimetrické stanovení	49
4.16. Výpočty	50
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	
5.1. Metabolismus pektinu a glukosy a aktivity pektinolytických enzymů u <i>Bacteroides caccae</i> KWN izolovaného ze slepého střeva králíků	51
5.2. Metabolismus pektinu a glukosy a aktivity pektinolytických enzymů u kmene <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> P6 izolovaného ze slepého střeva králíků	56
5.3. Pektinolytické enzymy čtyř kmenů bifidobakterií izolovaných z trávicího traktu králíků	59
5.4. Fermentace pektinu ve směsné kultuře mikroorganismů slepého střeva králíků	63
6. ZÁVĚR	65
7. LITERATURA	67
ZVLÁŠTNÍ PŘÍLOHA	
Publikované práce	

ÚVOD

Králík je v současné době zvířetem s hospodářským významem i jedním z živočichů běžně používaným v biomedicínském výzkumu.

Králíci mají vhodné vlastnosti pro efektivní produkci-rychlý růst, dobrou konverzi krmiva a vysoký reprodukční potenciál. Za předpokladu využití všech vědeckých poznatků a jejich aplikace do praxe může být intenzivní chov rentabilní a splňovat požadavky na produkci dietního králičího masa s vysokým obsahem kvalitních bílkovin a nízkým podílem tuku a cholesterolu, maso králíků má příznivé složení aminokyselin a obsahuje některé významné stopové prvky.

Z hlediska fyziologie výživy králík patří mezi býložravé savce s jednoduchým žaludkem. Trávení rostlinné potravy je složitější než trávení potravy původu živočišného či potravy smíšené. Žádný savec totiž není schopen vlastními enzymy trávit rostlinné polysacharidy, jedinou vyjímkou je škrob. Proto se trávicí ústrojí býložravých savců v průběhu evoluce uzpůsobilo k využívání energie ze strukturálních polysacharidů a býložravci vytvořili symbiosu s mikrobiální populací, která jim potřebné enzymy poskytuje. Králík hostí symbiotické mikroorganismy v tlustém a především v slepém střevě, které se postupně přeměnilo v mohutný orgán se silnou fermentační aktivitou. Produktem mikrobiální fermentace rostlinných polysacharidů jsou především těkavé mastné kyseliny s krátkým řetězcem: octová, propionová, máselná, valerová a kapronová, které po resorpci do krve hradí u králíků až 40% základní metabolické potřeby energie. Značnou nutriční hodnotu mají též živiny obsažené v bakteriálních buňkách, proteiny, sacharidy, lipidy a vitamíny B a K. Pro jejich získání a využití praktikují králíci cékotrofii, neboli požírají tzv. „měkké“ výkaly, což je vlastně obsah slepého střeva. Cékotrofii nelze zaměňovat s koprofágií neboli požíráním výkalů, kterou praktikuje řada živočišných druhů.

Pektin je jedním z rostlinných polysacharidů, které tvoří hlavní potravu králíka. Je to strukturální heteropolysacharid, tvořený lineárním řetězcem kyseliny polygalakturonové spojené vazbou $\alpha(1 \rightarrow 4)$. Pektin se řadí mezi tzv. „snadno stravitelnou vlákninu“, jeho utilizace trávicím traktem králíků je vysoká a proto jeho množství v potravě významně ovlivňuje trávicí procesy a tím i zdravotní stav králíků. Známým problémem u králíků, především v období po odstavu, je malá tolerance větších množství škrobu. Při přetížení zadní části trávicího traktu škrobem dochází snadno k pomnožení enterotoxických bakterií, tyto bakterie produkuju toksiny a u králíků pak dochází k fatálním průjmům. Proto se část škrobu v potravě králíků nahrazuje především snadno stravitelnou vlákninou. V sou-

časné době je prováděn intenzivní výzkum, který se týká složení krmných směsí pro králiky, kde optimální poměr pektinu hraje významnou úlohu.

Jediným pracovištěm v České republice, které se fyziologí trávení hospodářsky významných savců dlouhodobě a systematicky zabývá je Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR. Zmiňme konkrétně Laboratoř fyziologie výživy se sídlem v Praze-Krči. Tradice této laboratoře sahají na počátek sedmdesátých let minulého století. Pracovníci laboratoře navazují na práci jejího zakladatele dr. Bartoše a rozšířili bachelorové studie o výzkum fermentačních procesů v zadních oddílech trávicího traktu králíků, drůbeže a prasat. Tato situace trvá dodnes. Experimenty popisované v této disertační práci jsou součástí výše uvedeného výzkumného úsilí. Jejich cílem bylo přispět k poznání metabolických procesů, které se podílejí na trávení pektinu, významné složky potravy králíků.

Od roku 2001 se naše laboratoř podílela na činnosti Akce 848 „Rabbits“ programu COST. Naším příspěvkem bylo řešení projektu „Isolace a charakterizace amylolytických, pektinolytických a hemicelulolytických bakterií ze slepého střeva králíků“.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, prof. Ing. Milánu Marounkovi, DrSc. z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky. Jsem mu zavázána za cenné rady a podporu v průběhu mé práce na tématu dizertace.

Rovněž jsem zavázána pracovníkům téhož ústavu ing. Kamilovi Sirotkovi, PhD a Ing. Natalii Břeňové za pomoc s některými experimenty.

Dále bych chtěla poděkovat prof. Ing. Vojtěchu Radovi, Csc. z Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity za poskytnutí některých kmenů bakterií.

SOUHRN

Králík je současně zvířetem s hospodářským významem i jedním z živočichů běžně používaném v biomedicínském výzkumu. Cílem této práce bylo přispět k objasnění metabolismu pektinu, jedné z významných složek potravy králíků, u bakterií z trávicího traktu.

Kmen *Bifidobacterium pseudolongum* P6 utilisoval všechnu glukosu a téměř všechn pektin, kultury rostoucí na glukose produkovaly významně více formiátu, laktátu a ethanolu a méně acetátu a sukcinátu než odpovídající kultury na pektinu. Pektin byl degradován působením polygalakturonát hydrolasy, aktivita polygalakturonát lyasy nebyla detekována. *B. pseudolongum* P6 měl aktivitu 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonát aldolasy (KDPG aldolasy), monomerní jednotka pektinu je v buňce metabolisována modifikovanou Entner-Doudoroffovou dráhou, zatímco 6-fosfoglukonát, produkt utilizace glukosy, metabolisován není. Konvenční Entner-Doudoroffova dráha degradace glukosy tedy u tohoto kmene neprobíhá. K metabolismu glukosy je tudíž využívána glykolysa.

U kmene *S. bovis* X4 nebyla nalezena aktivita KDPG aldolasy což může být důvod, proč tento kmen není schopen využít degradační produkty pektinu. U kmene *S. bovis* X4 byla nalezena aktivita polygalakturonát hydrolasy i polygalakturonát lyasy, aktivita polygalakturonát hydrolasy byla velmi nízká.

Bacteroides caccae KWN utilisoval všechnu glukosu a téměř všechn pektin. Kultura rostoucí na pektinu produkovala výrazně více acetátu a méně formiátu, laktátu, fumarátu a sukcinátu než kultura rostoucí na glukose. Pektin je u této bakterie degradován extracelulární hydrolasou, která štěpí polymer od konce a extracelulární lyasou s náhodným účinkem uvnitř řetězce. Intracelulární metabolismus D-galakturonátu probíhá modifikovanou Entner-Doudoroffovou metabolickou dráhou. Konvenční Entner-Doudoroffova dráha metabolismu glukosy u *Bacteroides caccae* KWN neprobíhá.

Kmeny *Bifidobacterium pseudolongum* P13, *Bifidobacterium pseudolongum* G1, *Bifidobacterium globosum* G4 a *Bifidobacterium globosum* P11 degradují pektin působením polygalakturonát hydrolasy, polygalakturonát lyasa nebyla detekována, podobně jako u *Bifidobacterium pseudolongum* P6 v předchozím pokusu. U kmenů *B. pseudolongum* P13, *B. globosum* G4 a *B. pseudolongum* G1 je polygalakturonát hydrolasa typu „exo“, zatímco u kmene *Bifidobacterium globosum* P11 je typu „endo“.

Ve směsných kulturách mikroorganismů obsahu slepého střeva králíků se fermentace pektinu vyznačovala vysokým podílem acetátu a nízkým zastoupením ostatních

metabolitů. Mezi metabolity pektinu a škrobu ve směsných kulturách byly obdobné rozdíly jako mezi pektinem a glukosou v čistých kulturách bakterií slepého střeva králíků.

SUMMARY

The digestive system of the rabbit is characterized by the relative importance of the caecum and colon when compared with other species. As a consequence, the microbial activity of the caecum is of great importance for the processes of digestion and nutrient utilization. The aim of this study was to extend the knowledge on pectin metabolism in bacteria from the rabbit caecum.

Bifidobacterium pseudolongum P6 utilized almost all glucose and *ca* 76% of pectin. Cultures grown on glucose produced significantly more formate, lactate and ethanol per gram of substrate used and less acetate and succinate than corresponding cultures grown on pectin. In cultures *B. pseudolongum* P6 pectin macromolekule was degraded by the action of extracellular pectinase. Pectate lyase activity was not present in cells or culture supernatant fluids of this bacterium.

Streptococcus bovis X4 possessed both pectate lyase and pectinase activity. Activity of pectinase, however, was very low. Activity of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate-aldolase (KDPG aldolase) was found both in pectin- and glucose-grown cells of *B. pseudolongum*. The cell extract did not metabolize 6-phosphogluconate. We can assume that acidic products of pectin degradation are catabolised via a modified Entner-Doudoroff pathway. The KDPG aldolase activity was not found in cells of *Strep. bovis*. None of the enzymatic activities was found in strain N13 of *Bifidobacterium* sp.

Molecular-genetic analysis identified the KWN isolate as a strain of *B. caccae* with 98% identity of 16S rDNA sequence. *B. caccae* KWN utilized almost all glucose and 81% of pectin. Cultures grown on pectin produced significantly more acetate and less formate, lactate, fumarate and succinate than cultures grown on glucose. Pectin macromolekule was degraded by the action of pectate lyase and pectinase. Specific activities of both enzymes were higher in culture supernatants than in cell extracts. Action pattern of pectic enzymes was determined by viscosimetric and reaction product analyses. Comparison of the time course of the concentration of reducing sugars and relative viscosity indicated that the pectinase has an exo-type mode of action in *B. caccae* KWN, but an endo-type mode of action in *Strep. bovis* X4. Action pattern of lyases were similar in both bacteria. In former work was the lyase of *Strep. bovis* X4 identified as endopolygalacturonate lyase, so we propose that an enzyme the same type is produced in pectin-grown cultures of the strain KWN.

Both pectin- and glucose-grown cells of *B. caccae* KWN possessed activity of KDPG aldolase. Phosphogluconate was not metabolised by the cell extract of this strain, this indicates that the conventional Entner-Doudoroff pathway of glucose metabolism cannot operate in *B. caccae* KWN.

Strains of *Bifidobacterium pseudolongum* P13, *Bifidobacterium pseudolongum* G1, *Bifidobacterium globosum* G4 and *Bifidobacterium globosum* P11 possessed activity of pectinase but activity of pectate lyase was absent similar. The pectinase of strains *Bifidobacterium pseudolongum* P13, *Bifidobacterium pseudolongum* G1, *Bifidobacterium globosum* G4 has an exo-type mode of action, *Bifidobacterium globosum* P11 has an endo-type mode of action.

I. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1. BIOLOGIE KRÁLÍKA OBECNÉHO

1.1. Původ a rozšíření králíka obecného

Králík domácí (*Oryctolagus cuniculus*, var *domestica*) je domestikovanou formou divokého králíka a všechna existující plemena králíků pocházejí pouze z tohoto druhu. Zoologicky zařazujeme králíka divokého mezi obratlovce do třídy savců. Podle paleontologických nálezů bylo prokázáno, že králíci a zajíci se vyvíjeli samostatně, rozdílně od pravých hlodavců jako jsou morčata a myši, a proto byli zařazeni do samostatného řádu zajícovci (*Lagomorpha*), čeledi zajícovití (*Leporidae*) a rodu králík (*Oryctolagus*). Společnou charakteristikou řádu zajícovců je typický zubní vzorec s velkým a stále dorůstajícím párem řezáků v horní i dolní čelisti. Za každým horním řezákem vyrůstá další malý podpěrný zub, který pravým hlodavcům chybí. Další biologickou charakteristikou řádu je provokovaná ovulace. Králík patří mezi býložravce s dobrou schopností rozmnožování.

V paleontologických vykopávkách zejména z období ranných třetihor byly objeveny pozůstatky předchůdců dnešních králíků z čeledi zajícovitých, kteří se nevyskytovali na území Evropy, ale byli rozšířeni v Americe a Asii. V období pozdních třetihor se přesunovali z Asie do Evropy a od konce čtvrtohor do doby ledové pravděpodobně již obývali Evropu. V době ledové byli vytlačeni na jihozápad Evropy a sever Afriky a po ústupu ledovců králičí populace opět migrovaly do střední Evropy.

První zprávy o výskytu králíků na jihu Pyrenejského poloostrova pocházejí od Feničanů, přibližně z roku 1100 př. n. l. K domestikaci docházelo kolem 2.-5. století n. l. zejména v jihozápadní Evropě, Francii a Belgii. Pravá domestikace začala pravděpodobně v 16. století v klášterních chovech v tzv. leporáriích. V této době se začaly vybírat k záměrnému páření nové mutace, které se projevily v široké paletě barev a struktury srsti, vytvořily se rozdíly v živé hmotnosti. Za nejnápadnější domestikační znaky lze u králíků považovat podstatné zvýšení živé hmotnosti a změny původního ochranného zbarvení související s rozvojem albinotických forem, barevnosti a strakatosti.

Na území Čech se králíci vyskytovali již ve 13. století, kdy se přiváželi jako lovná zvěř z Německa. Později byli králíci chováni ve stájích, kde žili pod velkými hospodářskými zvířaty. Chov králíků se v Čechách začal rozvíjet v 60. letech 19. století. Koncem 19. století byla vyšlechtěna první česká plemena Český strakáč a Moravský modrý. K vel-

kému rozvoji chovu králíků u nás došlo mezi světovými válkami, kdy byla vyšlechtěna další česká plemena králíků. Na začátku 90. let 20. století došlo k novému budování faremních chovů králíků a poklesly stavy králíků chovaných v drobných chovech a i jednotlivých chovaných plemen.

Králíci se chovají na produkci kožek, produkci angorské vlny, jako laboratorní zvířata a především na produkci masa. Kožky jsou využívány v textilním průmyslu jako kožešiny a jako suroviny pro výrobu kloboučnické plsti. Angorská vlna je produkována plemenem králík angorský a je ceněna zejména pro svou lehkost, jemnost, délku vlákna, izolační a antirevmatické vlastnosti.

1.2. Produkce králičího masa

Z jednotlivých produktů chovu králíků má v současné době největší význam produkce masa. Zvyšující se zájem o produkci králičího masa souvisí především s racionální výživou, přesto však zůstává králičí maso přes své nesporně významné nutriční a senzorické vlastnosti pouze doplňkovým masem. Ve světě se jej v současné době ročně produkuje asi 1-1,3 milionu tun, značně problematické jsou odhady produkce z tradičních chovů. Mezi největší světové producenty králičího masa patří Itálie (300), Rusko (200), Francie (150) a Čína (120), v závorkách uveden roční objem produkce tis. tun. Ten je v ČR odhadován na 36 tis. tun. Česká republika se roční spotřebou cca 3 kg na obyvatele řadí mezi země s poměrně vysokou konzumací králičího masa, v převážné míře se však jedná o produkci drobných, tradičních chovů.

Králičí maso patří mezi dietní masa s vysokým obsahem bílkovin a nízkým podílem tuku a cholesterolu, má příznivé složení aminokyselin, obsahuje některé významné stropové prvky. Produkce masa králíků souvisí podobně jako u jiných druhů hospodářských zvířat s reprodukcí, růstem a složením jatečného těla. Reprodukční schopnosti králíků jsou dobré a králíci mají vysokou intenzitu růstu.

Maso králíků se řadí mezi tzv. bílá masa s jemnými svalovými vlákny. Ve srovnání s masem jiných druhů hospodářských zvířat je králičí maso bohatší na bílkoviny, některé vitamíny a minerální látky. Stravitelnost bílkovin králičího masa je 95%. Z vitamínů je králičí maso v porovnání s jinými druhy mas bohaté na kyselinu nikotinovou a na kyselinu pantothénovou.

Tuk obsahuje esenciální mastné kyseliny, má nižší obsah kyseliny stearové a olejové než tuk jiných zvířat. Poměrně vysoký je podíl polynenasycených mastných kyselin a nízký poměr n6/n3 mastných kyselin. V králičím mase je 57-59% nenasycených mastných kyselin. Králičí maso má nízký obsah cholesterolu, kolem 45-90 mg/100 g. Maso králíc bývá o 4-6% tučnější.

Tab. 1 Porovnání obsahu živin v 1 kg masa jednotlivých druhů hospodářských zvířat

Druh masa	Živina			
	N-látky (g)	Tuk (g)	Popeloviny (g)	Voda (g)
Hovězí libové	20,0	12,0	1,0	66,5
Hovězí tučné	15,5	35,0	0,7	49,0
Skopové libové	18,0	14,5	1,4	66,0
Skopové tučné	15,0	31,0	1,0	53,0
Vepřové libové	17,0	21,0	0,8	61,0
Vepřové tučné	15,0	29,5	0,6	54,4
Kuřecí	19,5	12,0	1,0	67,0
Králičí	21,0	8,0	1,0	70,0

Tab. 2: Obsah minerálních látek v mase jednotlivých druhů hospodářských zvířat

Druh masa	Minerální látka (mg/kg)				
	Vápník	Fosfor	Draslík	Sodík	Železo
Hovězí libové	12	195	350	65	3,0
Hovězí tučné	8	140	350	65	2,5
Skopové libové	10	165	350	75	1,5
Skopové tučné	10	130	350	75	1,0
Vepřové libové	10	195	350	70	2,5
Vepřové tučné	9	170	350	70	2,2
Kuřecí	10	240	300	70	1,5
Králičí	20	350	300	40	1,5

1.3. Chov králíků v České republice po roce 1990

K intenzivnímu rozvoji faremních chovů došlo v souvislosti se změněnými politickými a ekonomickými poměry po roce 1990. Od roku 1991 stoupaly celkové stavy králíků v průměru z 12 mil. kusů na 14,5 mil. kusů v roce 1997. Králíci jsou chováni ve velkochovech a středních chovech, které slouží pro dodávky na vnitřní chov a především pro export. Dále jsou chováni v malochovech, které slouží pro samozásobení a přímý prodej. Během let 1991 až 1997 se změnil poměr chovaných zvířat z faremních chovů a malochovů. Zatímco v roce 1991 byl podíl králíků z faremních chovů 7,7% z celkového počtu jatečných králíků nakoupených na porázku a export, v roce 1997 už činil 61,4%. Obdobně je tomu v EU, kde podíl králíků produkovaných z intenzivních faremních chovů byl 60% v roce 1997.

Růst stavů králíků pokračoval až do roku 1999 a to jak ve faremních chovech, tak i v malochovech. Od roku 2000 do roku 2002 je situace opačná. Stavy králíků celkem proti roku 1999 zaznamenaly pokles (o 27,8%) a to převážně u malochovů, ale u faremních chovů stavy králíků vzrostly o 29,5%. V roce 2003 došlo k mírnému nárůstu počtu chovaných králíků, v roce 2004 však došlo opět k poklesu.

Technologické postupy faremních chovů v ČR jsou propracovány, např. 90% králic je inseminováno, systémy produkce jsou sice srovnatelné s úrovní chovů v EU, dosažené výsledky jsou však až na vyjímky nižší. V ČR je v současné době cca 140 faremních chovů, jejich velikost je však různá (situace zmapována ve 136 chovech). Výrazně převládají chovy s počtem králic do 50 ks (jejich průměrný počet je cca 35 kusů). Otázkou je, zda se v tomto případě dá vůbec hovořit o faremním chovu. V ČR, narozdíl od např. Polska nebo Maďarska, je prakticky nulová finanční podpora chovatelů. Všichni naši chovatelé využívají pro chov brojlerových králíků budovy, které dříve sloužily jiným účelům (kravíny, teletníky aj.). Králík chovaný ve větším měřítku je však náročný na prostředí, je třeba zajistit teplotu mezi 14-16 °C, výměnu vzduchu 3-4 m³/kg/hod při rychlosti proudění mezi 0,2-0,4m/s atd., což bývá v adaptovaných prostorách problém. Adaptované objekty také většinou neumožňují turnusový systém chovu (plná-prázdná část haly), který je naprosto běžný u prasat či drůbeže. Jsou-li v jednom objektu ustájeny zpravidla kontinuálně všechny kategorie chovaných zvířat (králice s mláďaty, odchov, výkrm), dříve nebo později se tato skutečnost promítne do zhoršení zdravotního stavu a poklesu užitkovosti.

Pokud má být faremní chov brojlerových králíků dostatečně rentabilní, je mj. třeba, aby na jednu inseminaci bylo vyprodukovaných 14-15 kg jatečných králíků (v živé hmotnosti). Tomu odpovídá 56-60 vykrmených králíků na jedno místo pro chovnou králici. Tyto výsledky lze v ČR považovat za špičkové a jsou průběžně dosahovány v necelé čtvrtině chovů, ve faremních chovech západní Evropy se jedná o výsledky průměrné. Na současné stagnaci (až na vyjímky nevznikají nové chovy, celá řada chovatelů svou činnost ukončila, resp. o tom uvažují) se rovněž podílí poměrně vysoké současné ceny kompletních krmných směsí a stagnace cen zemědělských výrobků. Je to však škoda, protože kvalitní chlazené králičí maso je jednou z mála komodit, kde poptávka v zemích západní Evropy převyšuje možnost našeho exportu (Mach a kol. 2005).

Tab. 3: Stavy králíků v tis. ks

Druh chovu	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Faremní	285	332	391	454	512	558
Malochovy	13350	11908	14100	13550	13730	14020
Celkem	13635	12241	14491	14004	14232	14578
Druh chovu	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Faremní	579	599	817	776	776	826
Malochovy	14700	16200	13337	11942	11345	11310
Celkem	15279	16799	14154	12818	12121	12136

Tab. 4: Spotřeba králičího masa v ČR v kg na obyvatele

Rok	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Spotřeba	3,6	3,5	3,5	3,4	3,4	3,5	3,3	3,1	3,0

2. TRÁVICÍ TRAKT KRÁLÍKA

2.1. Anatomie a fyziologie trávicího traktu králíka

Králík patří mezi býložravce (*Herbivora*). Býložravci mají trávicí trakt přizpůsoben k využití rostlinné potravy. Trávicí ústrojí (*apparatus digestorius*) umožňuje organismům získat z přijaté potravy všechny látky potřebné ke stavbě vlastního těla a k tvorbě energie pro záchovu vlastního života, k pohybu, k produkci různých tkání těla, včetně hospodářsky využitelných částí a k reprodukci.

Začíná v hlavě dutinou ústní (*cavum oris*), která je vybavena jazykem, slinnými žlázami a zuby (*dentes*) jež jsou upraveny podle druhu živočicha a přijímané potravy. U králíka jsou řezáky hypselodontního typu-stále dorůstají, ostatní zuby jsou brachyodontní. Zubní vzorec králíka je následující: 2 0 3 3 nahore a 1 0 2 3 dole. Trávicí ústrojí pokračuje hltanem (*pars oralis pharyngis*) a pak jako vlastní trávicí trubice (*canalis alimentarius*), která je rovněž různě upravená. Následuje jícn (*esophagus*) a žaludek (*ventriculus*), rozdelený na několik oddílů podle anatomie a funkce. V těchto oblastech jsou různé typy žlaznaté sliznice, ve fundální a pylorické části se ve větší míře vyskytují buňky hlavní (sekretují pepsinogen), krycí (sekretují HCl) a vedlejší, produkovající hlen (mucin). Další částí trávicího ústrojí je tenké střevo (*intestinum tenue*), anatomicky dělené na dvanácterník (*duodenum*), lačník (*jejunum*) a kyčelník (*ileum*). Dvanácterník je od lačníku zřetelně oddělen (*flexura duodenojejunalis*), přechod lačníku v kyčelník již není patrné. Do dvanácterníku vstupují vývody slinivky břišní a žlučovodu (*ductus choledochus*) ve dvanácterníkovém ohbí (*flexura duodeni caudalis*). Celý vnitřní povrch tenkého střeva je pokryt řasnatou sliznicí, která tvoří klky (*villi intestinales*) vysoké cca 0,5-2,0 mm a mikroklky. Tím se významně zvětší resorpční plocha na několik desítek m² (Marvan 1992, Koenig a kol. 2002).

Trávicí trubice pokračuje jako tlusté střevo (*intestinum crassum*) dělené na colon ascendens, colon transversum a colon descendens (tračník vzestupný, příčný a sestupný) a je zakončena konečníkem (*rectum*). Celý trávicí trakt se navenek otevírá řitním otvorem (*anus*) a uzavírá dvojitým mohutným svěračem (*musculus sphincter ani internus externus*). Součástí tlustého střeva je střevo slepé (*caecum*) s viditelnou základnou (*basis ceci*), mohutným tělem (*corpus ceci*) a je zakončeno asi 15 cm dlouhým přívěskem-hrotom (*apex ceci*). Morfologicky jsou na tlustém a slepém střevu patrný ténie a hily, které napomáhají motorice střeva a resorpci vody. Tlusté (a slepé) střevo nemá vyvinuty klky, zato

krypty jsou hluboké. Vysvětlení této skutečnosti podává embryologie. Původně založené klky srostly a tím se značně prohloubily krypty (Marvan 1992, Koenig a kol. 2002).

K trávicí trubici patří také velké orgány dutiny břišní-játra (*hepar*) a slinivka břišní (*pankreas*). Nejvýznamějším produktem jater je žluč (*bilis*) a především v ní obsažené cholové kyseliny, které emulgují tuk a tím usnadňují jeho štěpení lipasami a vstřebávání. Slinivka břišní produkuje pankreatickou štávu, tj. směs proteas (jejich neaktivních forem), lipas, nukleas a amylasy. V žaludku dochází účinkem pepsinu a nízkého pH k denaturaci proteinů krmiva a jejich částečnému štěpení. U králíků je žaludek stále z části zaplněn, pH kolísá od 1 do 5 v závislosti na části žaludku a přítomnosti nebo absenci „měkkých“ výkalů a době příjmu potravy (Griffiths 1963).

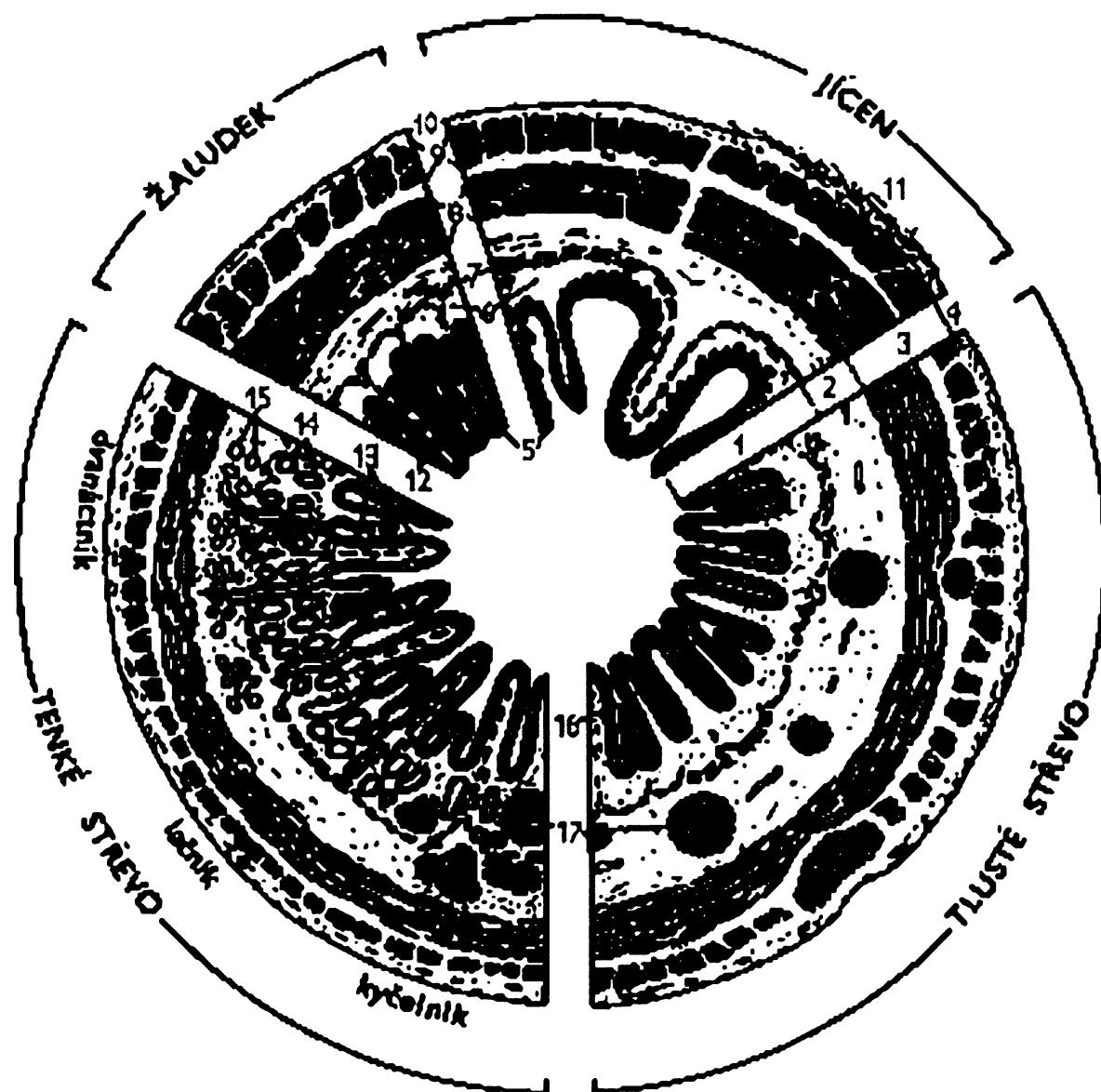
V tenkém střevě probíhá za účasti enzymů trávicích štáv (pankreatické, střevní a žluče) hydrolýza všech tří základních složek potravy (bílkoviny, sacharidy a lipidy) na nízkomolekulární látky rozpustné ve vodě a jejich vstřebávání (Marvan 1992, Koenig a kol. 2002).

Slepé střevo je vakovitý orgán dosahující největších rozměrů u nepřežívavých býložravců. U králíka je dlouhé asi 40 cm, jeho hmotnost je asi 25 g a pojme až 100 g tráveniny, tj. cca 40% (Gidenne 1996). Z celkové hmotnosti orgánů trávicího traktu připadá u králíka na slepé střevo 35% (Marounek a kol. 1999).

Fyzikálně-chemické parametry ve střevním systému jsou dosti stálé navzdory chemickým změnám, ke kterým při fermentaci dochází. Střevní prostředí se vyznačuje anaerobiosou, kontinuálním průtokovým charakterem, hodnotami pH v rozmezí 5,8-7,2 a teplotou 39-40°C. Prostředí zadních oddílů trávicího traktu charakterizuje vyšší viskozitu daná vyšším obsahem sušiny a přítomností mucinu.

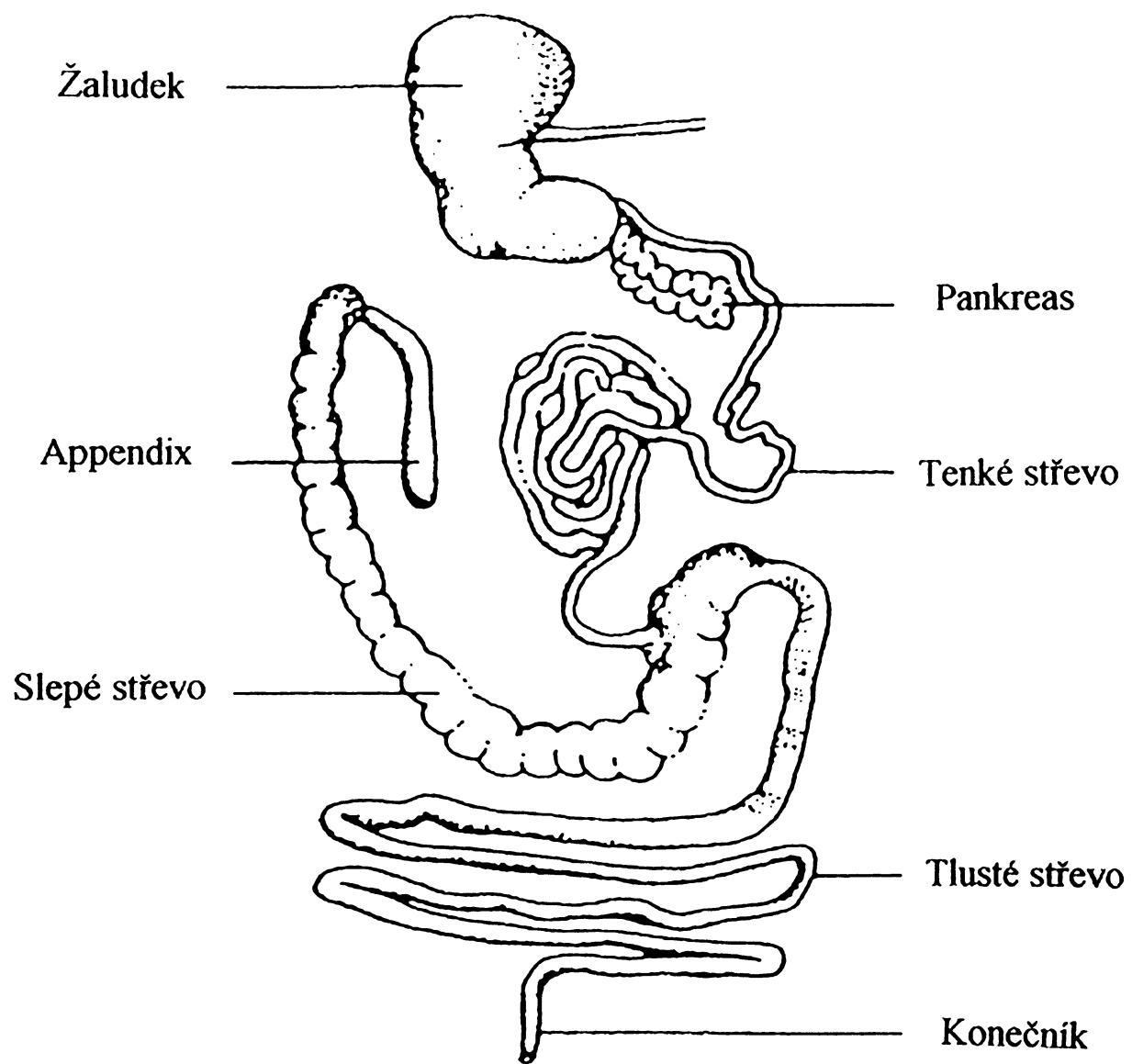
Mikroorganismy se zde účastní trávení živin, které nebyly využity v žaludku a tenkém střevu (pektin, celulosa, hemicelulosy apod.). Ze slepého a tlustého střeva je také vstřebáváno významné množství vody, iontů především sodných, draselných, vápenatých a hořečnatých kationtů společně s chloridovými a fosforečnanovými anionty. Doba zdržení tekutiny ve střevě králíků je daleko větší než doba zdržení pevných částic. Retenční čas pro kapalnou fázi se uvádí mezi 16 a 42 hodinami, zatímco pro hrubé částice je to jen 7 až 16 hodin (Gidenne 1996).

Obr. 1. Schéma mikroskopické stavby trávicí trubice (podle Marvana 1992)



1-sliznice, 2-podslizniční tkáň, 3-svalová vrstva, 4-povrchová vrstva, 5-epitel, 6-vlastní list sliznice, 7-svalovina sliznice, 8-vnitřní (kruhová) svalová vrstva, 9- vnější podélná svalová vrstva, 10-serosa, 11-adventicie, 12-žaludeční žlázy, 13-střevní klky, 14-střevní žlázy, 15-dvanácterníkové žlázy ve slizniční vrstvě, 16-žlázy tlustého střeva, 17-mízní uzlíky

Obr. 2. Anatomická stavba trávicí trubice králíka (podle Strawa 1988)



2.2. Ontogenese trávení králíků

Způsob trávení králíků se po narození vyvíjí podobně jako u jiných živočichů. Různé oddíly trávicího systému se vyvíjejí různě rychle. Slepé střevo a kolon se vyvíjejí rychleji než zbytek těla v období od 3 do 7 týdne věku, zatímco relativní velikost tenkého střeva a žaludku se od 3 do 11 týdne nemění. Slepé střevo dosáhne své velikosti mezi 7-9 týdnem věku (Carabaño a Picquer 1998).

Zásadních změn doznávají také enzymové aktivity, které se u králíka významně podílejí na rozkladu potravy. Zlomovým momentem u všech savců je odstav-přechod z mléčné stravy na tuhou potravu. U 4-týdenních králíčat aktivita žaludeční lipázy reprezentuje většinu lipolytické aktivity celého trávicího traktu, u 3-měsíčních králíků už její aktivita není detekovatelná (Marounek a kol. 1995). Odstavem se též mění žaludeční proteáza. V období mléčné výživy je jí rennin, který má schopnost mléčnou bílkovinu srážet do podoby vloček tak, aby ze žaludku rychle neodešla. Má optimální pH asi 4, což odpovídá nízké žaludeční kyselosti u sajících králíků. Po odstavu je žaludeční proteasou pepsin s pH optimem kolem 2.

Po odstavu velmi vzrostou aktivity enzymů, které v tenkém střevě štěpí škrob a produkty jeho částečné hydrolýzy, tj. aktivity amylasy a maltasy. První 2 týdny jsou jejich aktivity nepatrné, v 3. a 4. týdnu života a dále po odstavu se však prudce zvýší. Mezi narozením a odstavem vzrostou 7-9x aktivity proteolytických enzymů, trypsinu a chymotrypsinu, po odstavu se již mění málo. V důsledku příjmu pevného krmiva se mění i aktivity enzymů ve slepém střevě. Dospělí králíci mají signifikantně vyšší aktivity pektinas a celulas než králíci před odstavem (Marounek a kol. 1995).

Také mikrobiální osídlení trávicího traktu není během vývoje konstantní. U čerstvě narozených králíčat je trávicí trakt sterilní. Během prvního týdne života je kolonizován fakultativně anaerobními bakteriemi, především rody *Streptococcus* a *Enterococcus*. Přední část trávicího traktu zůstává prakticky sterilní 3 týdny po narození (tj. do počátku cékotrofie), důvodem je přítomnost antimikrobiálních látek, kyseliny kaprylové a kaprinové, v mléčném tuku králíků. Fakultativně anaerobní bakterie jsou po začátku příjmu pevné potravy vystřídány bakteriemi přísně anaerobními, především rodem *Bacteroides*, dále rody *Bifidobacterium*, *Bacillus* a v menší míře i *Clostridium*. Malé počty streptokoků a enterokoků zůstávají v trávicím traktu i nadále. Osídlení trávicího traktu je dokončeno příchodem metanogenních bakterií, ke kterému dochází až ve věku 6-8 týdnů (Gouet a Fonty 1979, Gidenne 1996, Marounek 1999).

2.3. Role střevní mikroflóry v trávicím procesu u králíků

Přítomnost mikrobiální populace ve slepém střevě společně s cékotrofií umožňuje králíkům získávat z rostlinné potravy energii, aminokyseliny a vitamíny. Mikroorganismy jsou však přítomny ve všech úsecích trávicí trubice. Dutina ústní, slepé a tlusté střevo jsou nejvíce osídleny, nejméně je osídlen žaludek a horní část tenkého střeva.

Za nejhojněji zastoupený bakteriální rod byl dosud považován rod *Bacteroides* (Gouet a Fonty 1979, Forsythe a Parker 1985). Cortez a kol. (1992) ve střevě nalezli kromě rodu *Bacteroides* též rody *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Escherichia* a *Clostridium*. Běžným obyvatelem slepého střeva je také rod *Bifidobacterium*. Dále zde byly nalezeny kvasinky *Cyniclomyces guttulatus* (10^6 /g). Symbiotická protozoa ani anaerobní houby nebyly pozorovány. Je důležité zmínit, že většina bakterií trávicího traktu je pravděpodobně nekultivovatelná v čisté kultuře. Podle de Rozas a kol. (2002) je kultivovatelných méně než 25% bakterií ze slepého střeva králíka. Výše uvedené výsledky byly získány pomocí klasických mikrobiologických a biochemických metod. Je však zřejmé, že dosavadní poznatky o mikrobiálním osídlení trávicího traktu králíků se budou měnit s tím, jak bude pokračovat mapování osídlení za pomoci genetických metod. Abecia a kol. (2005) mapovali bakteriální diverzitu slepého střeva králíků za použití PCR. Identifikovali 44 nových bakteriálních druhů a zřejmě dokonce i bakteriální rod, který nebyl dosud popsán. Je zajímavé, že nebyla nalezena žádná sekvence odpovídající skupině *Bacteroides/Prevotella*, jejíž zástupci byli zatím vždy ve slepém střevu králíků identifikováni. Výskyt nových sekvencí je u králíků vysoký a zřejmě souvisí s cékotrofií.

Mikroflóra v žaludku obsahuje hlavně striktní anaeroby (bakteroidy) a je výsledkem recyklace bakteriální flóry při cékotrofii. Bakterie, které se tímto způsobem do žaludku dostávají, jsou stráveny, čímž králík získá hodnotné bakteriální proteiny a některé vitamíny (Jilge a Meyer 1975).

Množství bakterií v distální části trávicího traktu je 100-1000x vyšší než v tenkém střevě. Počet kultivovatelných mikrobů se ve slepém střevě pohybuje mezi 10^{10} až 10^{12} v 1 g tráveniny (Gouet a Fonty 1979).

Emaldi a kol. (1979) ve své studii uvádí, že důležité enzymatické aktivity střevní mikroflóry jsou deaminační, ureolytická, proteolytická, amylolytická a v malé míře i celulolytická. Další velmi významné enzymatické aktivity jsou xylanolytická a pektinolytická (Forsythe a Parker 1985, Marounek a kol. 1995).

Výsledkem fermentační aktivity střevní mikroflóry jsou těkavé mastné kyseliny (TMK), amoniak a metan. U dospělých králíků jsou TMK produkovaný v množství 60-80 mmolů acetátu, 8-20 mmolů butyrátu a 3-10 mmolů propionátu na 100 mmolů TMK.

V malé míře jsou produkovány též isobutyrát, valerát, isovalerát a kapronát (Gidenne 1997). Koncentrace TMK je nejvyšší (až 100 mmol) ve slepém střevě, nižší (asi 50 mmol) v tlustém střevě a nízká (asi 10 mmol) v žaludku a tenkém střevě. Tyto proporce jsou však ovlivněny denní dobou (cékotrofie), věkem králíka a druhem potravy. Profil produkovaných TMK je pro králíka specifický, propionátu vzniká méně než butyrátu, u ostatních živočišných druhů tomu tak zpravidla není. Bakteriální trávení se týká hlavně polysacharidů, které tvoří největší díl rostlinných krmiv (celulosa, hemicelulosy, pektin, škrob) (Marty a Vernay 1984).

2.4. Cékotrofie

Cékotrofie je příjem specifických výkalů, tzv. „měkkých“ výkalů, pocházejících ze slepého střeva. Rozdíl mezi „měkkými“ a „tvrdými“ výkaly se vytváří během průchodu tráveniny slepým střevem a proximálním kolonem. Podle Bjoernhagena (1972) a Pickarda a Stevense (1972) se „tvrdé“ výkaly tvoří mechanickou separací tráveniny, ve vodě rozpustné částice a malé částice (v průměru menší než 0,3 mm včetně bakterií) jsou transportovány zpět do slepého střeva pomocí antiperistaltických pohybů a zpětného toku tráveniny. Větší částice (v průměru větší než 0,3 mm) přecházejí do distální části kolonu a tvoří „tvrdé“ výkaly. Během cékotrofické fáze prochází trávenina slepým střevem bez větších změn (pouze změny v obsahu vody a minerálů), motilita slepého střeva a kolonu je během cékotrofické fáze minimální. „Měkké“ výkaly králíci požírají přímo od análního otvoru již asi od 20. dne od narození (Gouet a Fonty 1979, Carabaño a Piquer 1998).

Cékotrofie u králíků představuje specializovanou strategii umožňující získat živiny obsažené v bakteriálních buňkách, hlavně proteiny a lipidy, a rovněž vitamíny skupiny B a K. Cékotrofii králíci většinou provozují v ranních hodinách a během této doby nevylučují „tvrdé“ výkaly a i příjem potravy je nízký. Koncentrace TMK ve slepém střevě je vyšší během vylučování „tvrdých“ výkalů, což je způsobeno větším tokem substrátu do slepého střeva a obohacení slepého střeva o mikrobiální populaci jako důsledek antiperistaltických pohybů proximálního kolonu (Bellier 1995).

Tab. 5: Průměrné chemické složení "měkkých" a "tvrdých" výkalů

	Měkké výkaly	Tvrde výkaly
Suchá hmota (g/kg)	340,0	470,0
Hrubý protein (g/kg)*	300,0	170,0
Hrubá vláknina (g/kg)*	180,0	300,0
MgO (g/kg)*	12,8	8,7
CaO (g/kg)*	13,5	18,0
Fe ₂ O ₃ (g/kg)*	2,6	2,5
anorg. P (g/kg)*	10,4	6,0
org. P (g/kg)*	5,0	3,5
Cl- (mmol/kg)*	55,0	33,0
Na+ (mmol/kg)*	105,0	38,0
K+ (mmol/kg)*	260,0	84,0
Bakterie (10^{10} g ⁻¹)*	142,0	31,0
Kys. nikotinová (mg/kg)	139,0	40,0
Riboflavin (mg/kg)	30,0	9,0
Kys. pantothenová (mg/kg)	52,0	8,0

* počítáno na množství suché hmoty

2.5. Vláknina a její vliv na trávicí procesy u králíků

Vláknina je hlavní složka potravy králíků. Vyslovit přesnou definici vlákniny je poměrně složité. V oblasti humánní výživy je dietní vláknina definována jako poživatelné části rostlin nebo analogy sacharidů, které jsou rezistentní k trávení a absorpci v tenkém střevě, s kompletní nebo částečnou fermentací v tlustém střevě. Vláknina zahrnuje polysacharidy, oligosacharidy, lignin a přidružené rostlinné substance.

V živočišné výživě je lépe vlákninu definovat jako součet neškrobových polysacharidů a ligninu, protože tyto jsou hydrolyzovány jen bakteriálními enzymy a mají společné fyziologické vlastnosti (Gidenne a Lebas 2002).

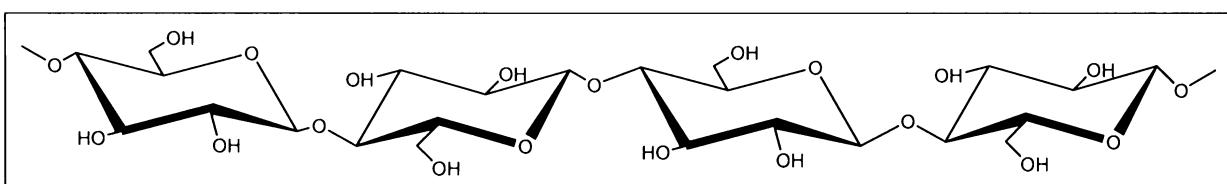
2.5.1. CHEMICKÉ SLOŽENÍ VLÁKNINY

Chemické rysy vlákniny velmi kolísají a závisí na mnoha faktorech (molekulová váha, povaha monomerních jednotek a typ vazeb). Jak bylo výše uvedeno, vláknina je odvozena zejména z buněčných stěn rostlin. S vyjímkou ligninu jsou složky rostlinných buněčných stěn hlavně neškrobové polysacharidy složené z neutrálních nebo kyselých sacharidů (Gidenne a kol. 1998). Mezi hlavní neškrobové polysacharidy buněčných stěn patří: celulosa, hemicelulosy (arabinoxylany, β-glukany, xyloglukany, xylany) a pektin.

Lignin je jedinou složkou vlákniny, která se neřadí mezi polysacharidy (Gidenne a kol. 1998, Gidenne a Lebas 2002, Gidenne 2003).

Celulosa je hlavním strukturální polysacharid buněčných stěn. Je to homopolymer tvořený řetězcem $\beta(1 \rightarrow 4)$ glukopyranosových jednotek, stupeň polymerace je většinou 8000-10000, má vysokou molekulovou hmotnost a její štěpení není snadné. Molekuly celulosy tvoří vlákna, kde se střídají oblasti paralelního uspořádání, tzv. krystalické, s oblastmi kde tomu tak není, tzv. amorfni. Štěpení molekul v oblastech krystalických je

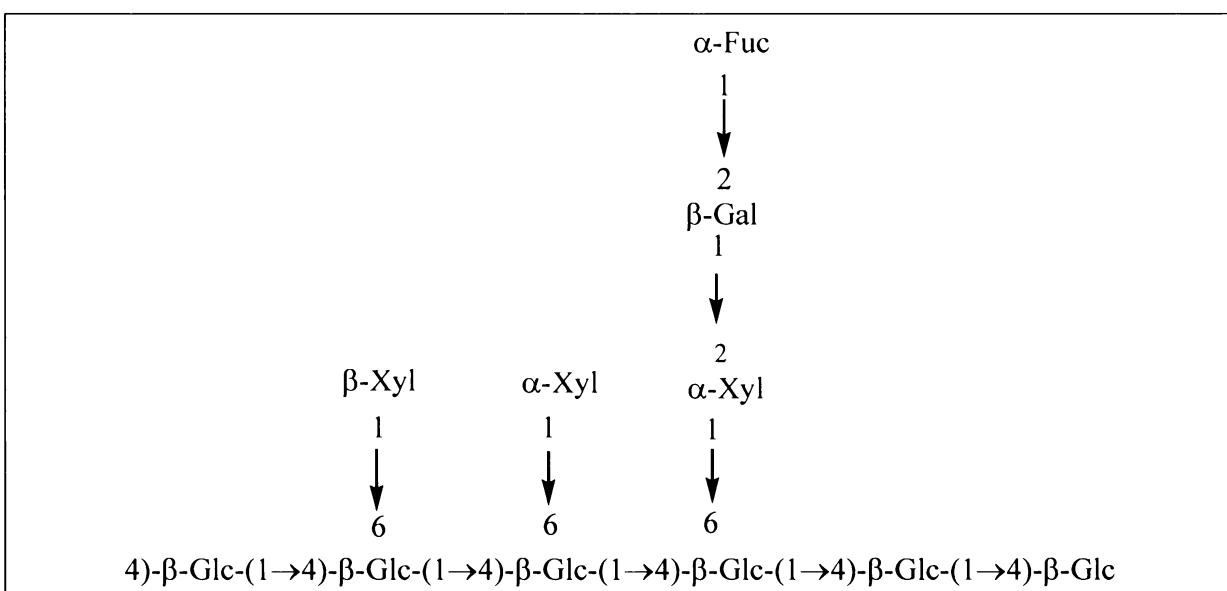
Obr. 3. Struktura celulosy



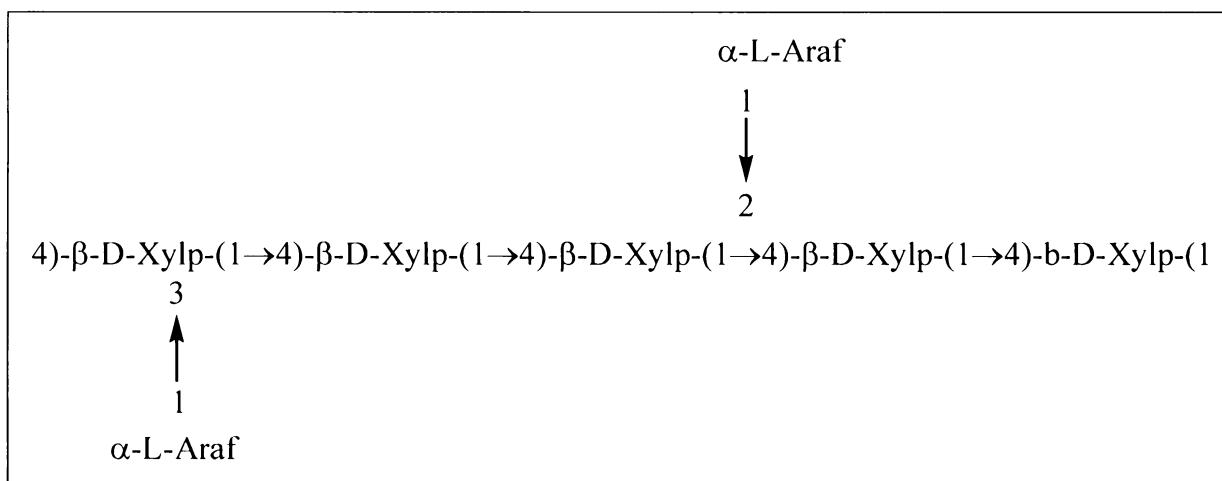
obtížnější, probíhá současným působením několika enzymů (celulolytický komplex), kterým disponuje jen omezený počet bakterií. U králíků celulolytická složka mikroflóry téměř chybí. Celulosa tvoří 40-50% sušiny luštěnin a olejnatých semen a 10-30% sušiny pícnin a cukrové řepy.

Hemicelulosy jsou skupina heterogenních glykanů s nižším stupněm polymerace než celulosa a jsou po celulose druhými v přírodě nejhojnějšími polysacharidy. Skládají se z $\beta(1 \rightarrow 4)$ vázaných xylosových, manosových nebo glukosových zbytků a mohou tvořit vodíkové vazby s celulosou. Mezi hemicelulosy řadíme především xylany, xyloglukany a arabinoxylany.

Obr. 4. Struktura xyloglukanu

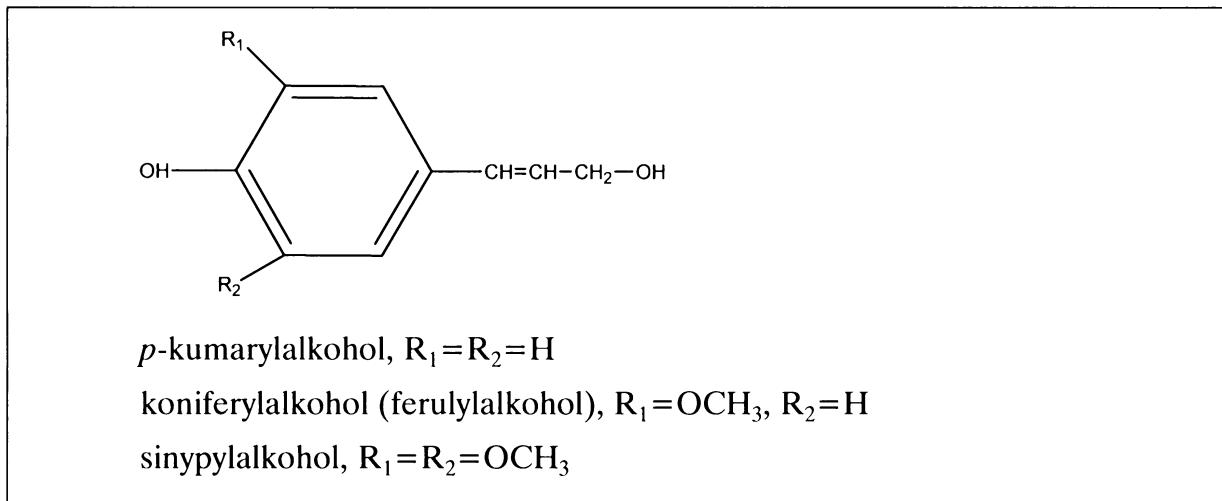


Obr. 5 Struktura arabinoxylanu (f-furanosa, p-pyranosa)



Xylany se skládají z β -D-xylosových zbytků vázaných vazbou $\beta(1 \rightarrow 4)$ a často jsou substituovány α -L-arabinosou nebo α -D-glukosou. Xylany se často vážou k povrchu celulosových mikrofibril. Xyloglukany mají základní řetězec podobný celulose, β -D-glukosa vázaná $\beta(1 \rightarrow 4)$, ale jsou bohatě substituovány α -D-xylosou, která může být dále substi-

Obr. 6 Fenylpropanové stavební jednotky ligninu



tuována především β -D-galaktosou nebo α -L-fukosou. Hemicelulosy tvoří zhruba 10-25 % suché hmoty v pícninách.

Lignin je jediný polymer buněčných stěn, který se neřadí mezi polysacharidy. Lignin tvoří velmi větvenou a komplexní síť o vysoké molekulové hmotnosti. Lignin se skládá ze tří hlavních aromatických sloučenin: *p*-kumarylalkoholu, koniferylalkoholu a sinapin-alkoholu. Součástí ligninu je i kutin.

Další polysacharidy, neobsažené v buněčných stěnách, řazené mezi vlákninu jsou galaktomannany, glukomannany a fruktany. Galaktomannany se skládají z řetězce $\alpha(1 \rightarrow 4)$ vázaných β -D-mannosových zbytků, ke kterým jsou na pozici C6 vázány

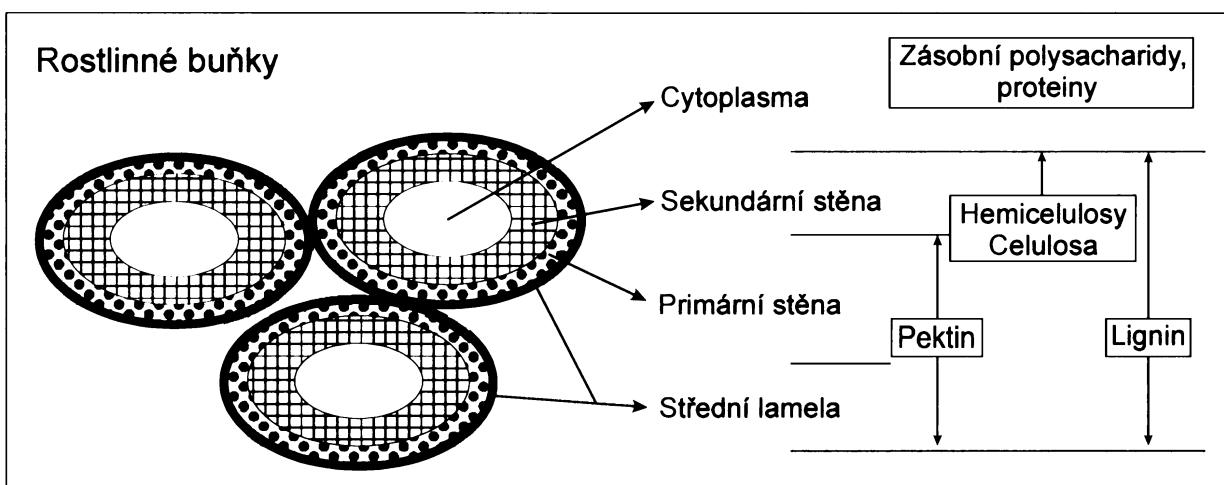
α -D-galaktosové zbytky. Glukomannany jsou lineární polymery β -D-glukosových a β -D-mannosových zbytků vázaných vazbou α (1→4).

Neškrobové polysacharidy mohou být buď ve vodě rozpustné či nerozpustné. Obecně rostliny obsahují směs rozpustných i nerozpustných neškrobových polysacharidů v různém poměru v závislosti na druhu a stáří rostlin.

Množství vlákniny v krmivu králíků je velmi významné, protože deficit vlákniny vede k vážným trávicím problémům. V krmivech pro králíky se vláknina stanovuje nejčastěji na základě frakcionace buněčných stěn kombinovaným působením detergentů (neutrálních a pak kyselých), kdy se získají tři vláknité frakce: NDF, ADF a ADL (van Soest a kol. 1991). NDF (neutral detergent fibre) vyjadřuje obsah hemicelulos, ligninu a celulosy, ADF (acid detergent fibre) obsah lignocelulosy a ADL (acid detergent lignin) obsah ligninu. Z těchto je možné zjistit obsah hemicelulos (NDF-ADF), celulosy (ADF-ADL) a ligninu (ADL). Nevýhodou této metody je velká variabilita obsahu hrubého proteinu v NDF frakci (1-20%) a ztráta pektinových látek a neškrobových polysacharidů při ADF procedůrě. Přesto je technika dle van Soesta nejvíce využívanou metodou při stanovení vlákniny v krmivech (Gidenne a Lebas 2002).

Stanovení pektinu v krmivech je velmi problematické. Částečně lze množství pektinu stanovit určením obsahu uronových kyselin (hlavní složka pektinu) dle Blumenkrantze a Ashboe-Hansenové (1973). Tato metoda se kombinuje s měřením obsahu neutrálních cukrů, takže množství pektinu je suma uronových kyselin a neutrálních cukrů. Avšak jak bude popsáno v kapitole „Struktura pektinu“, množství neutrálních cukrů se velmi liší v jednotlivých typech pektinu a množství pektinu v rostlině závisí i na jejím stáří (Gidenne a Lebas 2002).

Obr. 7 Schématické rozložení hlavních stavebních jednotek v rostlinné buňce



2.5.2. VLIV VLÁKNINY NA TRÁVENÍ KRÁLÍKŮ

Vláknina hraje důležitou roli v trávicím procesu králíků především v době po odstavu. Trávicí poruchy králíčat po odstavu jsou často způsobeny nevyhovující krmnou směsí, kterou králíci v té době přijímají. Důležitým bodem při sestavování receptur krmných směsí pro tuto kategorii králíků je obsah vlákniny a škrobu, případně jejich optimální poměr. Příliš velké množství škrobu v krmných směsích nestačí tenké střevo (hlavní místo trávení škrobu) malých králíků vzhledem k rychlému průchodu tráveniny strávit a nestrávený škrob tak vstupuje do zadních oddílů trávicího traktu. Fyziologie trávení však není ještě zcela vyvinuta. Sekrece pankreatické amylasy (enzym odpovědný za hydrolýzu škrobu) není v potřebné míře a škrob je proto neúplně hydrolyzován. Přebytek škrobu pak může pozměnit střevní fermentační aktivitu a inhibovat činnost symbiotické mikroflóry, která je určitou ochranou před rozvojem pathogenní mikroflóry. Přetížení tlustého střeva škrobem pak umožňuje proliferaci enteropathogenních bakterií především z rodu *Clostridium* a *Escherichia coli*. Tyto skutečnosti pak vyvolávají trávicí potíže, snižují přírůstky a mohou být fatální. Určitou možností jak těmto problémům předcházet je částečná nahada škrobu (zrnin) stravitelnou vlákninou. Vhodnými zdroji stravitelné vlákniny jsou cukrovarské řízky a pšeničné otruby (Cheeke a Patton 1980, Bennegadi a kol. 2001, Gidenne a kol. 2002).

Pro odstranění trávicích problémů u rostoucích králíků a pro zachování optimálního růstu je třeba zajistit adekvátní množství vlákniny v potravě. Je však také nutné vzít v úvahu typ vlákniny. Gidenne a Lebas (2002) stanovují 4 body pro optimální poměr vlákniny v potravě králíků:

1. množství ADF frakce 19%
2. poměr lignin/celulosa vyšší než 0,4
3. množství stravitelné vlákniny ve srovnání s lignocelulosou (poměr stravitelné vlákniny/ADF) 1:1,3
4. množství škrobu

Gidenne a kol. (1998) zjistili, že tzv. zdravotní riziko (nemocnost +úmrtnost) se zvýšilo z 18 na 28% když poklesl obsah ADF v potravě z 19 na 15%. Významný je však nejen obsah ADF, ale také poměr lignin/celulosa. Lignin zvyšuje konverzi potravy a snižuje stravitelnost, tím že urychluje průchod tráveniny trávicím traktem. Konverze potravy je ovlivněna i botanickým původem ligninu. Vliv celulosy je podobný, avšak v porovnání s ligninem méně významný. Ligninu by proto mělo být v krmivech pro králíky po odstavu 5-7g/den a celulosy 11-12g/den, poměr lignin/celulosa má být vyšší než 0,4. Pokud

je poměr lignin/celulosa nižší než 0,4 snižuje se rychlosť růstu a zvyšují se trávicí problémy (Gidenne a Lebas 2002, Gidenne 2003).

Jak již bylo uvedeno výše, mezi stravitelnou vlákninou se řadí hemicelulosy a pektin. Retenční čas tráveniny v trávicím traktu je u králíka poměrně krátký, což představuje limitující faktor pro méně stravitelnou část vlákniny. Snadno stravitelná vláknina pak hraje významnou roli při trávicích procesech a má vliv na zdravotní stav králíků. Garcia a kol. (2000) ukázali, že uronové kyseliny (hlavní součást pektinu) významně ovlivňují fermentační aktivitu ve slepém střevě (zvýšení množství TMK) a příznivě ovlivňuje pH ve slepém střevě. Bylo také zjištěno, že trávicí problémy králíků se zmenší, je-li v jejich dietě škrob nebo protein částečně nahrazen stravitelnou vlákninou (Gidenne a Bellier 2000). Avšak příliš vysoké množství stravitelné vlákniny v potravě králíků časně po odstavu způsobuje zvýšenou úmrtnost (Gidenne a kol. 2004, Volek a kol. 2005). Zdá se, že vysvětlením by mohlo být zvýšení viskozity tráveniny v tenkém střevě, které zpomaluje tok zažitiny a napomáhá proliferaci pathogenů ve střevním traktu (Volek a kol. 2005).

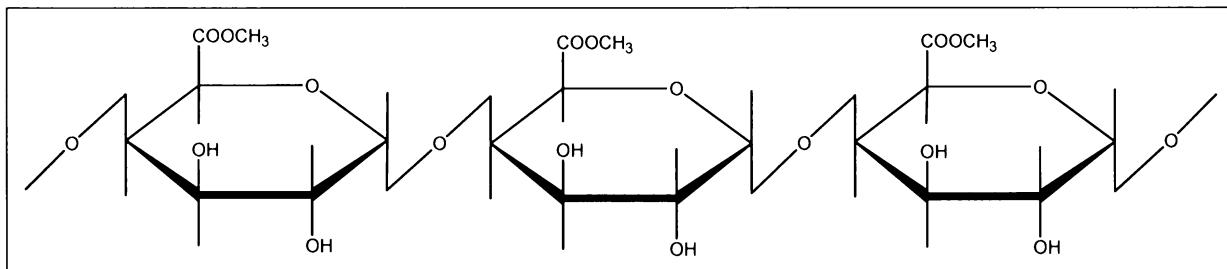
3. PEKTIN

3.1. Struktura pektinu

Pektin je strukturální heteropolysacharid, který se nachází v pletivu vyšších rostlin. Je součástí stěn primárních buněk a mezibuněčných prostor kde tvoří síť společně s celulosou a hemicelulosou. Pektin je odpovědný za udržování integrity a soudržnosti rostlinného pletiva a tvoří asi 56% celkové hmoty rostlinné buněčné stěny (Vincken 2003). Pektin vzniká a ukládá se hlavně v ranných stádiích růstu rostlin, kdy se zvětšuje plocha rostlinných stěn. Pektin se nachází prakticky ve všech druzích ovoce a zeleniny, jeho obsah však není vysoký, v ovocné dužině kolísá okolo 1%, více pektinu se nachází např. v jablkách, citrusových plodech, švestkách, rybízu, angreštu, ze zeleniny obsahují nejvíce pektinu rajčata a mrkev, tráva obsahuje 3-4% pektinu, luštěniny 5-10% a cukrová řepa 25% (Marounek a kol. 1999).

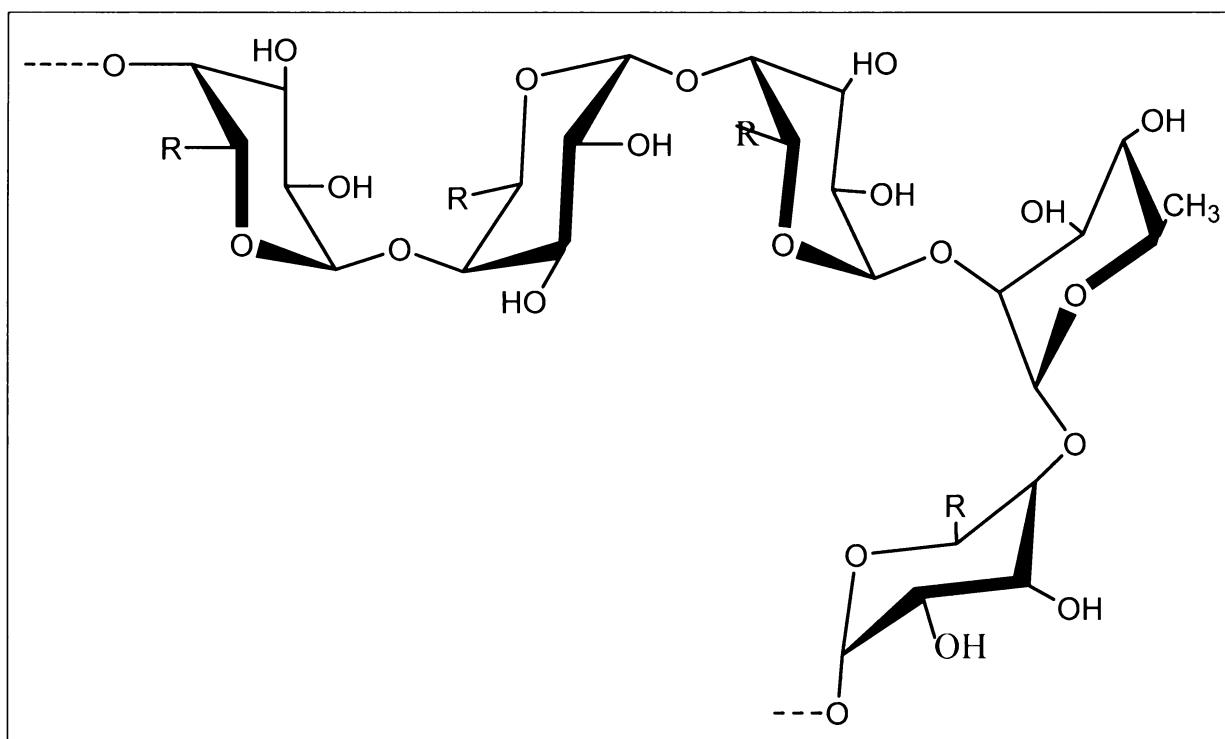
Základní struktura pektinu je tvořena lineárním řetězcem jednotek D-galakturonové kyseliny spojených vazbami α ($1 \rightarrow 4$), která se také nazývá kyselina polygalakturonová. V roztoku je řetězec kyseliny polygalakturonové zakřiven. Polygalakturonový řetězec může mít řadu modifikací. Jednotky galakturonové kyseliny jsou do různého stupně esterifikovány methanolem. Podle stupně esterifikace se pektin dělí na nízkomethylováný pektin (methylováno je méně než 50% karboxylových zbytků) a vysokomethylováný pektin (methylováno je více než 50% karboxylových zbytků). Stupeň esterifikace methanolem výrazně ovlivňuje fyziologické i chemické vlastnosti pektinu (Rombouts a Pilnik

Obr. 8 Schématická struktura pektinu



1980). Další možnou modifikací polygalakturonového řetězce je acetylace v poloze C2 nebo C3. Vyšší stupeň acetylace se nachází především v pektinu z cukrové řepy (Baciu a Jördening 2004). Lineární sekvence jednotek α -D-galakturonové kyseliny mohou být přerušovány jednotkami α -L-rhamnopyranosy vázané glykosidovou vazbou α ($1 \rightarrow 2$). Tyto úseky se nazývají rhamnogalakturonany (Baciu a Jördaning 2004, Vincken a kol.

Obr. 9 Struktura rhamnogalakturonanu v roztoku



2003). Galakturonový řetězec může dále obsahovat postranní řetězce β -D-xylopyranosy, pak se nazývá xylogalakturonan. Xylogalakturonany se vyskytují především v reprodukčních částech rostlin-plody, semena (Vincken a kol. 2003, Willats a kol. 2003).

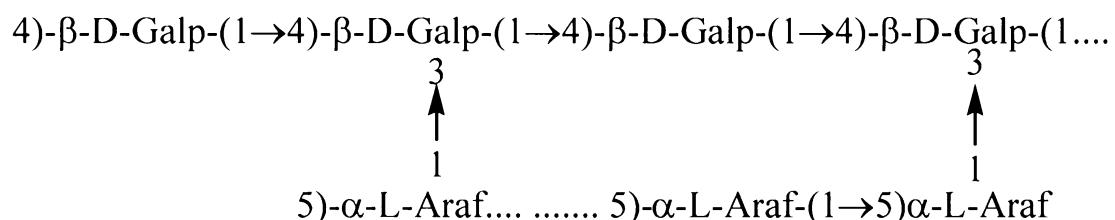
Další z možných modifikací je úsek devíti galakturonových zbytků, na které jsou navázány čtyři postranní řetězce obsahující různé spíše netradiční sacharidy. Takto modifikovaný úsek pektinu se nazývá rhamnogalakturonan II. (Vidal a kol. 2000). Název rhamnogalakturonan je v tomto případě zavádějící, protože naznačuje přítomnost rhamnosy v základním polygalakturonovém řetězci. Rhamnosa je ovšem přítomna pouze jako část postranních řetězců, přesto se tento název v odborné literatuře používá.

Rhamnogalakturonan I. se skládá z více než 100 opakování disacharidu [\rightarrow 2]- α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- α -D-Gal-(1 \rightarrow). Rhamnosylové zbytky mohou být na O4 substituovány neutrálními cukry. Tyto postranní řetězce neutrálních cukrů obsahují především galaktosylové a arabinosylové zbytky, a to buď jeden zbytek nebo delší polymer. Polymerní postranní řetězce se rozlišují na arabinogalaktany nebo arabinany (Willats a kol. 2003). Arabinogalaktany se dále rozlišují na arabinogalaktany I. a arabinogalaktany II. Arabinogalaktany I. mají v hlavním postranním řetězci vázanou β -D-(1 \rightarrow 4) galaktopyranosu a jsou substituovány krátkými řetězci tvořenými α -L-arabinofuranosou připojenými na C3 galaktosy. Jednotky arabinosy jsou vzájemně vazány vazbou α (1 \rightarrow 5).

Arabinogalaktany I. se vyskytují v pektinech jablek, citrusových plodů, zelí, rajčat a brambor (Vincken 2003).

U arabinogalaktanů II. se nachází hlavní postranní řetězec tvořený jednotkami β -D-galaktopyranosy vzájemně vázanými vazbou α ($1 \rightarrow 3$). Základní galaktopyranosová kostra obsahuje krátké postranní řetězce α -L- arabinofuranosy. Arabinogalaktany II. jsou v rostlinném pletivu spojeny s proteiny (arabinogalaktanové proteiny). V odborné literatuře se objevují názory, zda je tuto část ještě možno považovat za pektin

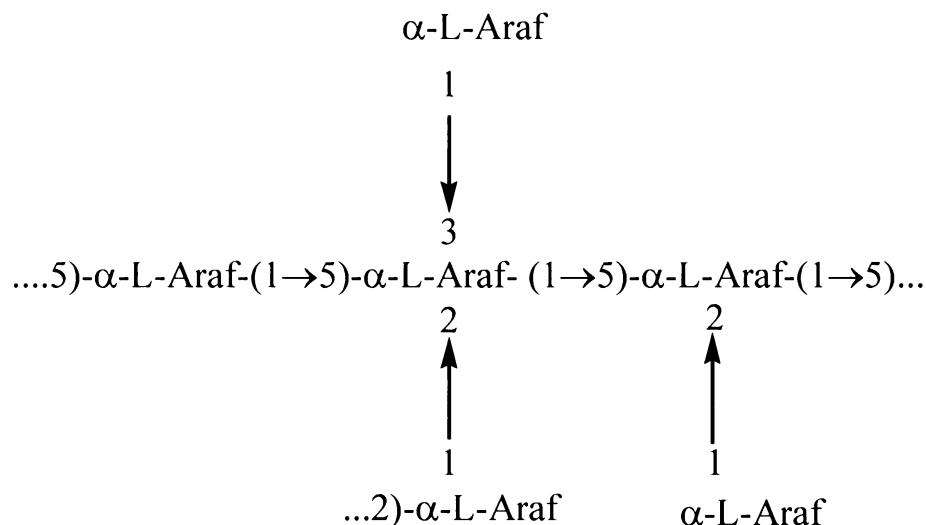
Obr. 10 Struktura arabinogalaktanu v postranním řetězci pektinu



(Vidal a kol. 2000). Arabinanogalaktany II. se vyskytují především v jablkách, hroznech a cukrové řepě.

Arabinany jsou větvené polysacharidy s hlavním postranním řetězcem tvořeným α -L-arabinofuranosami spojenými vazbami α (1 \rightarrow 5). Tento řetězec je dále substituován

Obr. 11 Struktura arabinanů v postranním řetězci pektinu



různým počtem arabinofuranosových zbytků vázaných na jednotky v poloze C2 nebo C3. Postranní řetězce bývají velmi často mnohonásobně větvené (Vincken 2003).

Řepný pektin obsahuje na rozdíl od pektinů z jiných zdrojů kyselinu ferulovou (0,5-1%), jednu z hlavních fenolických kyselin vyskytujících se v rostlinných buněčných stěnách. Kyselina ferulová se připojuje na O2 pozici (1→5) vázaných arabinos v arabinanech a k O6 pozici galaktopyranosových zbytků v arabinogalaktanech (Baciu a Jördening 2004). Arabinany a arabinogalaktany jsou často označovány jako tzv. „vlasové“ oblasti pektinu, zatímco nesubstituované části polygalakturonového řetězce (případně rhamnogalakturonového) jako „hladké“ oblasti (Baciu a Jördening 2004, Oomen a kol. 2003).

3.2. Chemické a biologické vlastnosti pektinu

Pektiny jsou obecně rozpustné ve vodě a nerozpustné ve většině organických rozpouštědel. Rozpustnost ve vodě klesá s rostoucí molekulovou hmotností a stupněm esterifikace karboxylových skupin (vysokoesterifikované pektiny se rozpouštějí za tepla).

Významnou vlastností pektinu je schopnost tvorby gelu. Mechanismus tvorby gelu závisí na stupni esterifikace pektinu. Vysokoesterifikované pektiny tvoří gely za přítomnosti sacharidů v kyselém prostředí, nízkoesterifikované pektiny tvoří gely v přítomnosti vápenatých iontů. Schopnost pektinu tvořit gel se využívá především v potravinářském průmyslu (Thibault a Ralet 2003, Kohnová a Kohn 1981).

Novým uplatněním pektinu je nahrazena tuku v nízkokalorických potravinách (Thakur a kol. 1997).

Další vlastností pektinu je schopnost vázat divalentní kationty včetně těžkých kovů. Tato schopnost je založena na přítomnosti neesterifikovaných galakturonových zbytků. Pektin váže kationty selektivně $Cu^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+} > Ca^{2+}$ (Thibault a Ralet 2003).

Pektinu se přisuzuje schopnost snižovat hladinu cholesterolu v krvi. Předpokládá se, že tento jev je způsoben zvýšeným vylučováním žlučových kyselin stolicí a snížením přestupu cholesterolu a žlučových kyselin z trávicího traktu do hepatálního oběhu. Těžiště účinku pektinu je v tenkém střevě. Pektin zde tvoří gel, který ztěžuje absorpci cholesterolu, žlučových kyselin a lipidů. (Kohnová a Kohn 1981, Judd a Truswell 1985, Hexenberg a kol. 1994).

Tsujita a kol. (2003) se zabývali vlivem pektinu na trávení a absorci triacylglycerolů. Po orálním podání pektinu potkanům došlo k poklesu koncentrace triacylglycerolů

v plazmě, koncentrace volných mastných kyselin v plazmě ovlivněna nebyla. Dále byl zkoumán vliv pektinu na aktivitu pankreatické lipasy. Pektin inhiboval činnost pankreatické lipasy v závislosti na dávce a molekulové hmotnosti pektinu. Nejsilnější inhibiční účinky vykazoval pektin o molekulové hmotnosti 90 000 při pH nižším než 7, z těchto výsledků vyplývá, že pektin může inhibovat i gastrickou lipázu.

Pektin a především oligogalakturonidy vzniklé jeho degradací vykazují i určité probiotické vlastnosti. Bylo však zjištěno, že probiotický efekt je nižší ve srovnání s dosud používanými probiotiky (Olano-Martin a kol. 2002).

3.3. Metabolismus pektinu

Pektin stejně jako ostatní rostlinné polysacharidy s vyjímkou škrobu, není štěpen endogenními enzymy savců, ale je fermentován bakteriemi v trávicím traktu, u králíků ve slepém střevu.

Velká molekula pektinu (molekulová hmotnost 30 000-300 000) neumožňuje pektinu vstoupit do buňky přímo, enzymy degradující pektin jsou tedy buď uvolňovány do extracelulárního prostředí nebo vázány na buňku na její extracelulární straně.

Pektinolytické enzymy lze obecně rozdělit na deesterifikující enzymy a enzymy štěpící řetězec. Deesterifikujícím enzymem je pektinesterasa (EC 3.1.1.11), která odštěpuje z pektinu methanol a produkuje kyselinu polygalakturonovou. Depolymerasy štěpí glykosidickou vazbu pektinu buď hydrolyticky (hydrolasy) nebo β -eliminací (lyasy).

Tab. 6: Základní typy pektinolytických enzymů

Jméno	EC číslo	preferovaný substrát	způsob účinku
endopolygalakturonasa	3.2.1.15	kys. polygalakturonová	random
exopolygalakturonasa	3.2.1.67	kys. polygalakturonová	terminální
endopectate lyasa	4.2.2.2.	kys. polygalakturonová	random
exopectate lyasa	4.2.2.9	kys. polygalakturonová	terminální
endopectin lyasa	4.2.2.10	pektin	random

Hydrolasy a lyasy mohou být dále děleny podle preferenčního substrátu. Buď jsou schopny atakovat přímo pektin, nebo vyžadují působení esteras, která odštěpí methylové zbytky a depolymerizující enzym tak štěpí kyselinu polygalakturonovou. Lyasy a hydrolasy se dělí ještě podle způsobu ataku pektinové molekuly na endo- enzymy, které atakují polymer v kterémkoliv místě řetězce (random mechanismus), a exo- enzymy, které štěpí polymer terminálně (Rombouts a Pilnik 1980). Lyasy štěpí pektin β -eliminací za vzniku dvoj-

né vazby mezi C4 a C5. Konjugace dvojných vazeb s karboxylovou skupinou na C5 způsobuje vznik absorpčního pásu při vlnové délce 235 nm. Lyasy od hydrolas lze odlišit i tím, že lyasy pro svou aktivitu vyžadují přítomnost Ca^{2+} iontů (Collmer a kol. 1988).

Pektinesterasa

Pektinesterasy jsou produkovaný vyššími rostlinami, houbami, kvasinkami a bakteriemi. Enzymatická deesterifikace probíhá lineárně podél molekuly. Působením pektinesterasy vzniká kyselina polygalakturonová a methanol.

Endopolygalakturonasa

Endopolygalakturonasa (nebo také endopektát hydrolasa či pektinasa) je produkovaná různými pro rostliny pathogenními a saprofytickými houbami, bakteriemi a také některými kvasinkami. Endopolygalakturonasa štěpí polygalakturonát, schopnost hydrolyzy tohoto enzymu klesá se zvyšujícím se stupněm esterifikace a klesá s klesajícím stupněm polymerace. Digalakturonát už hydrolyzován není, trigalakturonát zřídka. Endopolygalakturonasa degraduje pektin náhodně v kterémkoliv místě řetězce.

Exopolygalakturonasa

se nalézá u vyšších rostlin, v trávicím traktu hmyzu, u hub a některých bakterií. Aktivita tohoto enzymu je závislá na délce řetězce substrátu, preferenčním substrátem je kyselina polygalakturonová. Enzym štěpí polymer terminálně. Mezi nejlépe popsané bakteriální exopolygalakturonasy patří exo-D-galakturonasa izolovaná z bakterie *Butyrivibrio fibrisolvens*. pH optimum tohoto enzymu je 5,6, preferenčním substrátem digalakturonát, produktem hydrolyzy je kyselina D-galakturonová (Heinrichová a kol. 1985).

Endopektát lyasa

je produkovaná různými typy bakterií a některými houbami pro rostliny pathogenními. Všechny dosud popsané enzymy tohoto typu mají vysoké pH optimum a vyžadují přítomnost Ca^{2+} iontů. Preferenčním substrátem je kyselina polygalakturonová. Dobře popsaným enzymem tohoto typu je endopektát lyasa izolovaná z bakterie *Streptococcus bovis*. pH optimum tohoto enzymu je 8,0-8,5, vápenaté ionty aktivitu enzymu stimulují, EDTA aktivitu inhibuje. Degradačními produkty jsou nenasycené tetra- a trigalakturonidy (Wojciechowicz a Ziolecki 1984). Endopektát lyasa podobného typu je produkovaná i bakterií *Bacteroides caccae* KWN (Sirotek a kol. 2004).

Exopektát lyasa

je produkovaná především bakteriemi a plísňemi. Enzym preferuje jako substrát kyselinu polygalakturonovou. Trigalakturonát je substrát s nejnižší molekulovou hmotností, který je tento enzym schopen degradovat. Všechny dosud popsané enzymy tohoto

typu měly vysoké pH optimum (8,0-9,5) a vyžadovaly přítomnost Ca^{2+} iontů. Wojciechowicz (1982) popisuje exopektát lyasu izolovanou z *Butyrivibrio fibrisolvens*, enzym má pH optimum 8,0-8,5, je stimulován Ca^{2+} ionty, hlavním degradačním produktem je nenasycený trigalakturonát.

Endopektin lyasa

je produkována téměř výhradně houbami, několik vyjímek bylo zaznamenáno u pseudomonád pathogenních pro rostliny. Nejlepším substrátem pro tento enzym je vysoce esterifikovaný pektin, kyselina polygalakturonová degradována není. Endopektin lyasa je stimulována Ca^{2+} ionty, pro svou aktivitu je však nepotřebuje (Mc Donough a kol. 2004)

Mezi pektinolytické enzymy se dále řadí enzymy štěpící rhamnogalakturonanovou součást pektinu. Jsou to rhamnogalakturonan acetylesterasa, která odštěpuje acetylóvé zbytky z rhamnogalakturonanu, rhamnogalakturonan hydrolasa, která hydrolyticky štěpí $\alpha(1 \rightarrow 4)$ vazbu mezi L-rhamnosou a D-galakturonovou kyselinou, a rhamnogalakturonan lyasa štěpící vazbu $\alpha(1 \rightarrow 4)$ β -eliminací. Tyto enzymy se vyskytují především u pektinolytických plísni a u saprofytických bakterií, u bakterií z trávicího traktu králíka popsány nebyly (Molgaard 2003, McDonough a kol. 2004).

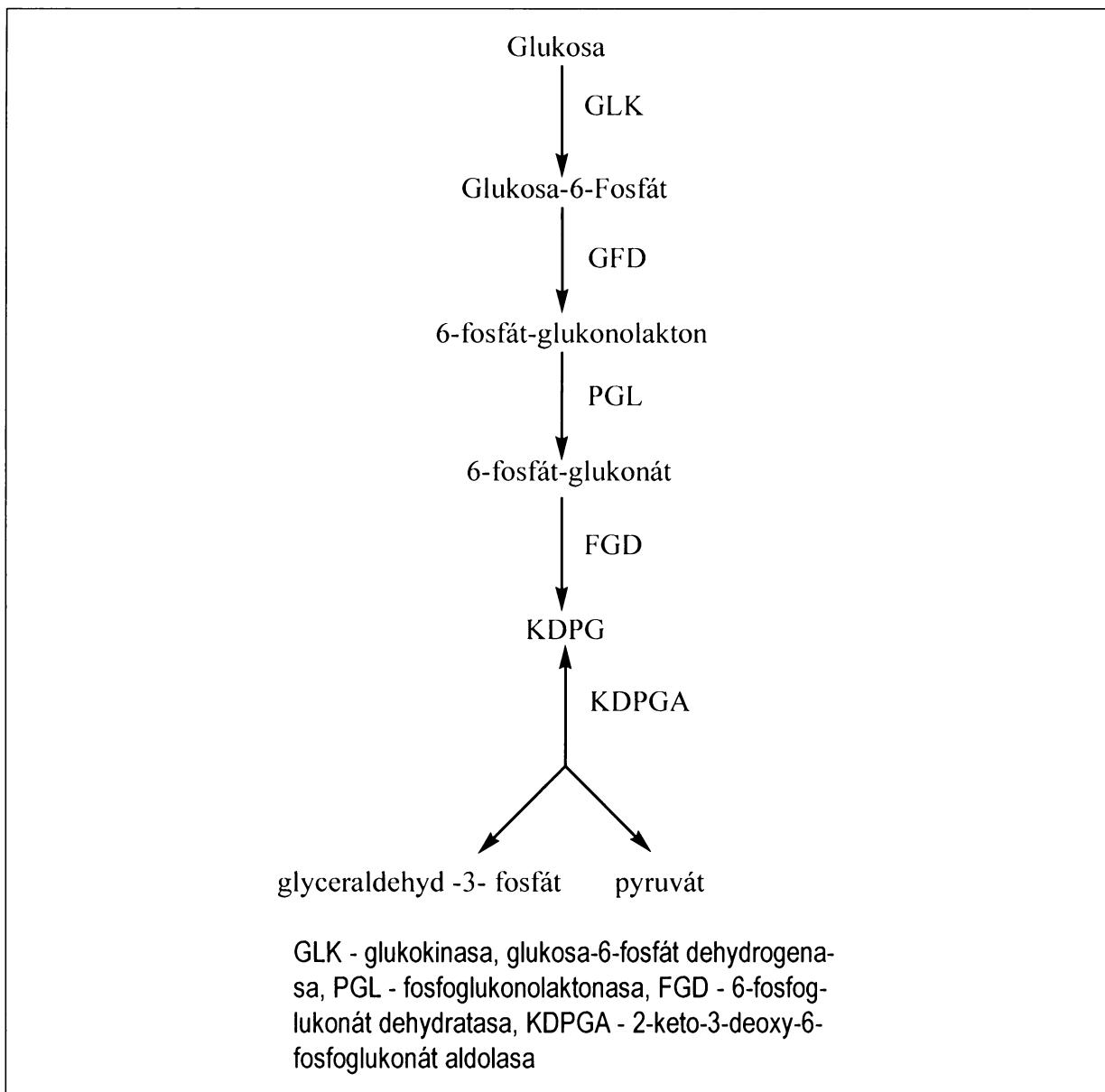
3.3.1. INTRACELULÁRNÍ METABOLISMUS URONOVÝCH KYSELIN

Degradační produkty vzniklé působením extracelulárních pektinolytických enzymů jsou především nasycené nebo nenasycené di- a trigalakturonidy, vzácněji monomery nebo tetra- či pentagalakturonidy. Způsob, jakým se tyto degradační produkty dostávají dovnitř bakteriální buňky není u bakterií izolovaných z trávicího traktu dosud zcela objasněn.

Byla prokázána existence oligogalakturonát lyasy a oligogalakturonát hydrolasy, enzymů, které štěpí degradační produkty na monomerní jednotku D-galakturonát. Van Rijssen a kol. (1992) se zabývali intracelulárním metabolismem pektinu u *Clostridium thermosaccharolyticum*. U této bakterie byly do buňky transportovány di- a trigalakturonidy a oligogalakturonát hydrolasa je štěpila uvnitř buňky. V některých starších pracích (Rombouts a Pilnik 1980) jsou popisovány oligogalakturonát lyasa a hydrolasa jako enzymy vázané na buněčnou stěnu, které se liší od extracelulárních pektinolytických enzymů tím, že výrazně preferují nízkomolekulové substráty. Jednou z nejlépe prostudovaných pektinolytických bakterií je *Erwinia chrysanthemi*, která způsobuje některé choroby

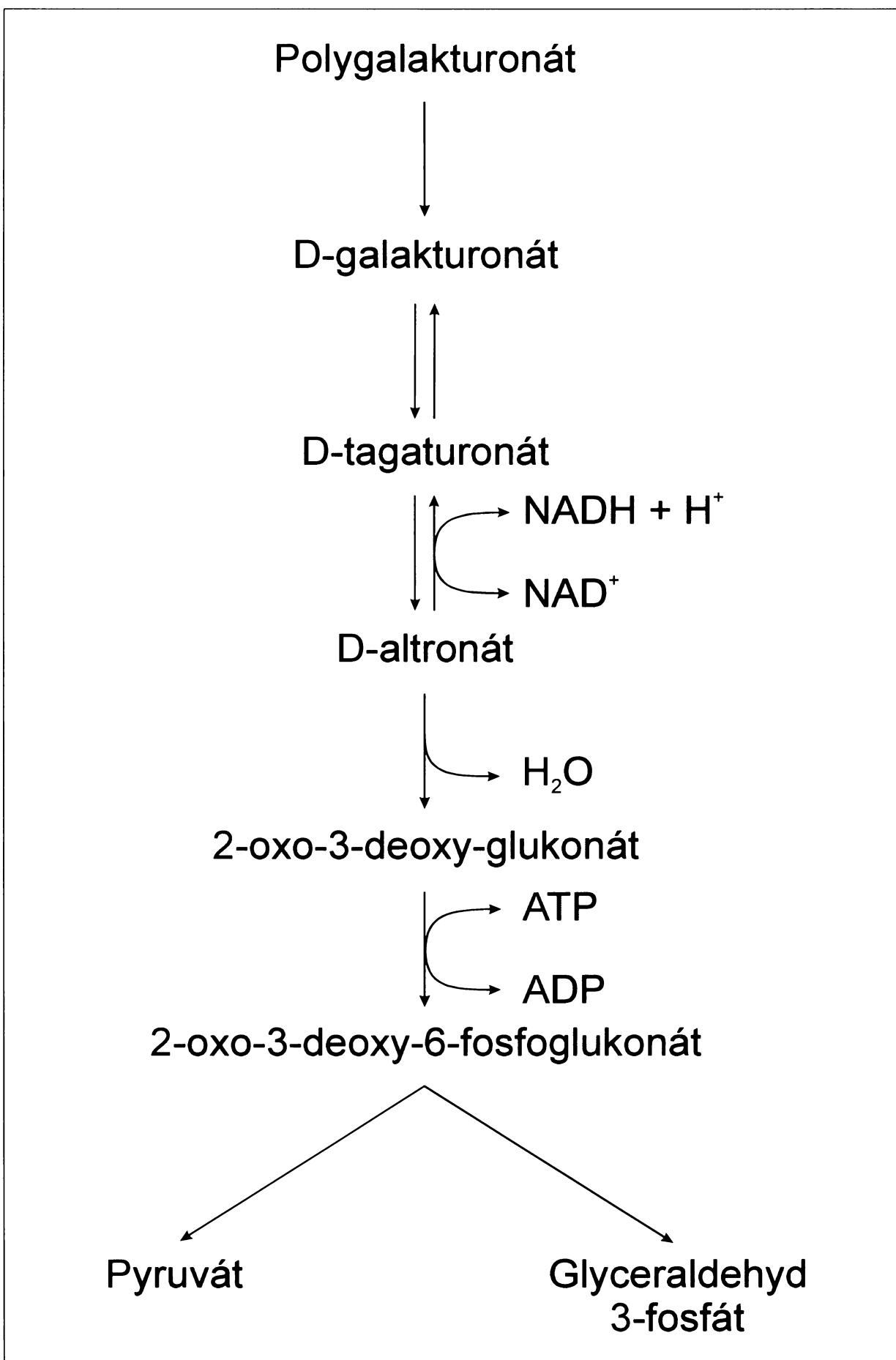
by rostlin. Zde byly identifikovány a popsány dva transportní systémy pro monomery (Hugovieux-Cotte-Pattat 1996, Pellinen a kol. 2003).

Obr. 12 Konvenční Entner-Doudoroffova metabolická dráha



V bakteriální buňce je D-galakturonát, nasycený i nenasycený, dále metabolizován. Jednou z drah, kterou se D-galakturonát odbourává je tzv. modifikovaná Entner-Doudoroffova metabolická dráha. Konvenční Entner-Doudoroffova metabolická dráha je vedle glykolýzy alternativní cestou odbourávání glukosy na pyruvát. Tato metabolická cesta, objevená r. 1952 Entnerem a Doudoroffem u *Pseudomonas saccharophila*, se nevyskytuje obecně, je však poměrně široce rozšířená mezi Gram-pozitivními i Gram-negativními bakteriemi i u některých eukaryot (Conway 1992). Její průběh je znázorněn na obr 9.

Obr. 13 Intracelulární metabolismus polygalakturonátu u baktérií



První krok metabolismu glukosy je shodný s prvním krokem glykolýzy a druhý je shodný s druhým krokem pentosového cyklu. Teprve třetí krok je specifický, dehydratasa odejme z 6-fosfoglukonátu vodu za vzniku 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonátu, který je enzymem 2-keto-3-deoxy-6-fosfoglukonát aldolázou (KDPG aldoláza) převeden na glyceraldehyd-3-fosfát a pyruvát, obě tyto látky jsou pak dále zpracovávané jako v případě glykolýzy. Energeticky je Entner-Doudoroffova dráha méně účinná ve srovnání s glykolýzou (Conway 1992).

V modifikované Entner-Doudoroffově metabolické dráze je D-galakturonát převeden na 2-oxo-3-deoxy-6-fosfoglukonát dvěma možnými způsoby: pomocí uronát izomerasy na D-tagaturonát, který je redukován D-altronát dehydrogenasou na D-altronát a ten je dehydrován D-altronát dehydrasou na 2-oxo-3-deoxyglukonát. Nebo je D-galakturonát převeden na 4-deoxy-5-hexoseulosuronát, který je izomerizován na 3-deoxy-2,5-hexodiulsonát a ten je redukován oxodeoxyglukonát dehydrogenasou na 2-oxo-3-deoxyglukonát. Tento meziprodukt je dále metabolizován Entner-Doudoroffovou dráhou. Nejprve je fosforylován na 2-oxo-3-deoxy-6-fosfoglukonát a ten je převeden KDPG aldolásou na konečné produkty pyruvát a glyceraldehyd-3-fosfát. KDPG aldolasa je enzym unikátní pro Entner-Doudoroffovu metabolickou dráhu. Výše popsaným způsobem je pektin degradován u mnoha pektinolytických bakterií, např. *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus polymyxa*, *Erwinia carotovora* a *Escherichia coli* (Rombouts a Pilnik 1980).

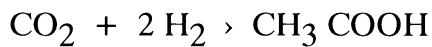
V naší laboratoři byl intracelulární metabolismus pektinu podrobně studován u vybraných pektinolytických bakterií izolovaných z trávicího traktu zvířat, u *Butyryvibrio fibrisolvens* a *Prevotella ruminicola* (Marounek a Dušková 1999), *Lachnospira multiparus* (Dušková a Marounek 2001), *Bifidobacterium pseudolongum* (Slováková a kol. 2002) a *Bacteroides caccae* (Sirotek a kol. 2004).

Jako další možnost degradace D-galakturonátu je předpokládána jeho dekarboxylace za vzniku L-arabinosy, která dále vstupuje do pentosového cyklu. Při této metabolické reakci se uvolňuje CO₂. Tato metabolická dráha je zmiňovaná především v souvislosti s bakteriemi izolovanými z bachoru přežívákavců (Phillipson 1970, Mackie a White 1997). Součástí dizertace je vyvrácení těchto předpokladů.

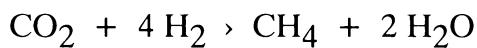
3.3.2. FERMENTACE PEKTINU SMĚSNOU KULTUROU MIKROORGANISMŮ SLEPÉHO STŘEVA KRÁLÍKŮ

Fermentace pektinu ve směsné kultuře mikroorganismů jakou představuje obsah slepého střeva se v řadě ohledů liší od fermentace čistými kulturami bakterií. Ve směsné

kultuře dochází k interakcím, k soutěži o substrát, vzniku potravního řetězce a soutěži o metabolický vodík mezi acetogenezí a methanogenezí, tj. mezi reakcemi sumárně vyjádřenými jako



a



Soutěž o vodík složení metabolitů velmi ovlivňuje. Fermentační stechiometrii v kulturnách obsahu slepého střeva králíků popisují Marounek a kol. (1997). Fermentační poměry byly ovlivněny povahou substrátu. Pektin a inulin byly fermentovány rychleji než škrob a hemicelulosa. Hlavními metabolity byly acetát a butyrát, následované propionátem. Produkce methanu korelovala s produkcí TMK. Cílem níže popsáного pokusu bylo srovnat tvorbu metabolitů při fermentaci pektinu s fermentací škrobu a xylanu obsahem slepého střeva králíků. Porovnali jsme také výtěžky proteinu, tj. účinnost proteosyntézy při růstu mikroorganismů na těchto substrátech.

3.4. PEKTINOLYTICKÉ BAKTERIE V TRÁVICÍM TRAKTU KRÁLÍKŮ

Pektin je jedním ze základních rostlinných polysacharidů nacházejících se v potravě králíků. Jak již bylo výše uvedeno, organismus savců není schopen metabolizovat rostlinné polysacharidy s vyjímkou škrobu, a musí se proto při jejich degradaci spolehnout na enzymy bakterií v trávicím traktu. Hlavním místem mikrobiální degradace je u králíků slepé střivo. Stravitelnost pektinu je u králíků vyšší než stravitelnost celulosy a hemicelulos. Celková stravitelnost kyselin uronových (hlavní složka pektinu) je 71-76 % (Gidenne 1992), podobné hodnoty zjistili ve své práci i Skřivanová a kol. (1996). Množství pektinolytických bakterií ve slepém střevě králíků uvádí Sirotek a kol. (2001) v řádu 10^7 CFU/g, Forsyte a kol. (1985) uvádějí počty o něco vyšší (řádově 10^8 CFU/g).

Podrobnější zkoumání mikrobiálního osídlení trávicího traktu králíků brání skutečnost, že většina přítomných bakterií je zřejmě v izolované kultuře nekultivovatelná. Při identifikaci bakterií izolovaných z trávicího traktu králíků byly dosud nejvíce používány klasické biochemické a fyziologické parametry. S rozvojem moderních genetických metod se však objevují nové poznatky o příbuznosti jednotlivých bakterií a pomocí 16S rRNA sekvencí se ukazuje existence nových a dosud nepopsaných bakteriálních druhů.

Za dominantní pektinolytický rod ve slepém střevě králíků byl dosud považován rod *Bacteroides*, za pomocí klasických metod byly identifikovány *B. ovatus*, *B. thetaiotamicron*,

B. caccae, *B. stercoris*, *B. capillosus*. U všech výše uvedených bakterií byla nalezena vysoká aktivita pektinolytických enzymů, hodnoty lyas byly vyšší než hodnoty hydrolas (Sirotek a kol. 2001). U kmene *Bacteroides caccae* KWN byl u obou pektinolytických enzymů stanoven i mechanismus působení. Polygalakturonát hydrolasa má exo-typ degradace, polygalakturonát lyasa endo-typ. D-galakturonát byl intracelulárně metabolizován modifikovanou Entner-Doudoroffovou dráhou (Sirotek a kol. 2004).

Dalším pektinolytickým rodem vyskytujícím se fyziologicky ve slepém střevu králíků je zřejmě rod *Bifidobacterium*. Pektin fermentuje asi 10% bifidobakterií (Crociani a kol. 1994). Detailněji byl studován metabolismus pektinu u kmene *Bifidobacterium pseudolongum* P6. Tento kmen produkoval jako jediný pektinolytický enzym polygalakturonát hydrolasu, což je neobvyklé. U všech dříve detailněji studovaných pektinolytických bakterií byla dominantním enzymem polygalakturonát lyasa, popřípadě byly produkovány oba typy enzymů (Wojciechowicz 1972, Wojciechowicz a kol. 1980, Wojciechowicz a kol. 1982, Wojciechowicz a Ziolecki 1984, Marounek a Dušková 1999, Dušková a Marounek 2001, Sirotek a kol. 2004). Kmen *B. pseudolongum* P6利用oval 76% pektinu v kultivačním médiu. D-galakturonát, degradační produkt působení pektinolytických enzymů, tento kmen metabolizoval modifikovanou Entner-Doudoroffovou dráhou (Slováková a kol. 2002).

Abecia a kol. (2005) zjišťovali bakteriální diverzitu slepého střeva králíků za použití PCR. Identifikovali 44 nových bakteriálních druhů a zřejmě dokonce i bakteriální rod, který nebyl dosud popsán. Překvapivě však nenalezli žádného zástupce rodu *Bacteroides*. Rody *Bacteroides* a *Bifidobacterium* byly dosud považovány za nejvýznamější pektinolytické rody přítomné v trávicím traktu králíků. Je však zřejmé, že dosavadní poznatky o mikrobiálním osídlení trávicího traktu králíků se budou měnit s tím, jak bude pokračovat výzkum osídlení za pomoci genetických metod.

3.5. VLIV PEKTINU NA TRÁVICÍ PROCESY KRÁLÍKŮ

Pektin je z nutričního hlediska označován, spolu s hemicelulosou, jako tzv. stravitevná vláknina. Vysoká stravitelnost pektinu souvisí s jeho částečnou rozpustností ve vodném prostředí, je tedy snadno dostupným substrátem pro mikroflóru slepého střeva. Ačkoliv hlavním místem mikrobiální fermentace u králíků je slepé střevo, pektin je cca z 25-50% fermentován už v ileu, na rozdíl od hemicelulos a celulosy (0-17%) (Gidenne 1992). Významná pektinolytická aktivita byla nalezena i v žaludku králíků, kde celuloly-

tická i xylanolytická aktivita byly nulové (Marounek a kol. 1995). Tento fakt lze vysvětlit cékotrofií, neboť „měkké“ výkaly se v žaludku zdrží asi 5-6 hod (Gidenne 2003).

Vysoká stravitelnost pektinu v porovnání s ostatními složkami vlákniny koresponduje i s vyššími počty pektinolytických bakterií v trávicím traktu králíků (Forsyte a kol. 1985, Sirotek a kol. 2001). Výsledkem fermentační aktivity mikroflóry jsou TMK. TMK jsou využity v intermediálním metabolismu a kryjí až 40% z celkové energetické potřeby králíka.

Dospělí králíci krmeni potravou s vyšším obsahem pektinu měli nižší pH ve slepém střevě, pH pokleslo o $0,56 \pm 0,11$ na každé 1% obsažené koncentrace pektinu. Králíci krmení dietou s nejvyšším obsahem pektinu produkovali nejvyšší množství TMK ($64,4 \text{ mmol.l}^{-1}$), králíci krmeni dietou s nejnižším obsahem pektinu pak měli nejnižší množství TMK ($38,2 \text{ mmol.l}^{-1}$) (Garcia a kol. 2000). Podobně u rostoucích králíků vyšší obsah kyselin uronových v dietě způsobil pokles pH ve slepém střevu a vzrůst koncentrace TMK (Garcia a kol 2002).

Perez a kol. (2000) demonstrovali snížení mortality králíků po odstavu, byl-li škrob v potravě králíků nahrazen snadno stravitelnou vlákninou (pektin+hemicelulosy).

Volek a kol. (2005) se ve své práci zabývali náhradou škrobu v krmivu králíků pektinem a inulínem. Kontrolní krmná dávka (K) obsahovala 18,6% škrobu a 4,3% pektinu, potrava P obsahovala 12,5% škrobu a 9,0% pektinu a potrava PI 10,3% škrobu, 9,0% pektinu a 4% inulínu. Nejnižší mortalita byla zjištěna u králíků krmených dietou PI, stejně jako nejvyšší koncentrace TMK a nejnižší pH. Potrava se zvýšeným podílem stravitelné vlákniny však snížila stravitelnost proteinu (Volek a kol 2005, Gidenne a kol. 2002). Tento jev zřejmě může souviset s vyšší viskozitou tráveniny v tenkém střevě, která byla pozorována u králíků krmených dietou s vyšším obsahem pektinu. Vyšší viskozita je zřejmě i odpovědná za vyšší mortalitu králíků krmených dietou P než dietami K a PI, stejný jev byl pozorován u selat ve věku 21 dní, kdy zvýšení viskozity tráveniny vedlo k proliferaci patogenních mikroorganismů a zvýšení mortality (Hopwood a kol. 2002). Přídavek inulínu do krmiva PI měl příznivý účinek na mortalitu králíků, což zřejmě souvisí s jeho prebiotickou aktivitou (Volek a kol. 2005).

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem níže popsaných experimentů bylo objasnit metabolismus pektinu ve slepém střevu králíků. Metabolismus pektinu byl zjišťován jak v čistých kulturách bakterií, tak i ve směsných kulturách představovaných obsahem slepého střeva.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Seznam použitých chemikalií a přístrojů

Chemikálie

Běžné chemikálie jsme získali od firem Pliva - Lachema Neratovice, Lachema Brno, Dorapis Praha.

Od firmy Sigma jsme zakoupili bovinní sérový albumin, semikarbazid, síran ceričitý, 3-fenylfenol, arsenitan sodný, TRIS [tris(hydroxymethyl)-aminomethan], glyceraldehyd-3-fosfát, glutathionát sodný, jodacetát sodný, cystein.HCl, kyselinu polygalakturonovou, kyselinu D-galakturonovou, hydrazid kyseliny p-hydroxybenzoové, pyruvát sodný.

Folin-Ciocalteauovo činidlo jsme získali od firmy Penta Praha.

Od firmy Supelco (Bellefonte, USA) jsme zakoupili materiály pro plynovou chromatografií: SP 1220, SP 2340, Carboxen 100, Chromosorb WAW, vesměs již jako hotové náplně kolon.

Kolona pro kapalinový chromatograf obsahující Ostion LG KS 0800W byla dodána od firmy Tessek, ČR.

Jablečný pektin byl dodán firmou Danisco Smiřice, ovesný xylan firmou Fluka.

Kvasničný autolyzát a agar jsme koupili od firmy Imuna Šarišské Michalany (SR).

Komerční kity

Používali jsme kit pro enzymové stanovení glukózy Glukosa God od Plivy - Lachemy Brno. Od téže firmy jsme zakoupili kity pro stanovení biochemických charakteristik izolovaných bakterií ENTEROTest 24 a ANAEROTest 23.

Laboratorní přístroje

Plynový chromatograf Carlo Erba GC 6000 Vega 2, výrobce Carlo Erba (Itálie)

Plynový chromatograf Chrom 5 (Laboratorní přístroje Praha)

Spektrofotometr UV-VIS Specord M40 (Carl Zeiss Jena)

Spektrofotometr Jenway 6100 (Jenway Ltd, Anglie)

Ultrazvukový dezintegrátor (Sonic&Materials Inc., USA) o akustickém výkonu 600 W

Kapalinový chromatograf Shimadzu série VP, (Shimadzu, USA)

Hoeppler-Viskozimetr B3 (VEB-MLW, Prufgerate-Werk Medingen, Sitz Freital)

Mikroskop Fluoval 2 (Carl Zeiss, Jena)

Bakterie

Bifidobacterium pseudolongum P6, *Bifidobacterium pseudolongum* P13 a G1, *Bifidobacterium globosum* P11 a G4 a *Bacteroides caccae* KWN byly izolovány ze slepého střeva králíků prof. Ing. V. Radou z Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity. *Bifidobacterium sp.* byl izolován ze slepého střeva kuřat na stejném pracovišti. *Streptococcus bovis* X4 byl izolován z bachorové tekutiny ovcí v ÚŽFG AV ČR. *Pseudomonas fluorescens* DBM 3056 jsme získali z Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha.

4.2. Izolace a charakterizace pektinolytických bakterií ze slepého střeva králíka

4.2.1. POUŽITÁ ZVÍŘATA

Pro izolaci mikroorganismů jsme použili dva typy králíků. Dva králíci z drobnochovu krmení letní (luční tráva ad libitum, pšenice-30-40 g/d, oves apod.) a zimní (luční seno ad libitum, jablka-cca 20 g/d, pšenice-30-40 g/d, oves apod.) dietou. Dále 3 králíci z velkochovů (různé podniky v ČR), tj. brojleři typu HYLA 2000 (Achard, Francie) či Hyplus (Grimaud Feres, Francie), kteří byli krmeni komerčním granulovaným krmivem (obsahovalo ječmen, oves, pšeničné otruby, sušenou vojtěšku, slunečnicovou moučku, sojovou moučku a doplněk minerálů a vitamínů). Králíci byli utraceni ve věku 80 dní (komerční) či v hmotnosti 2,7-3,2 kg, tj. cca 5 měsíců (z drobnochovu).

4.2.2. IZOLACE A IDENTIFIKACE PEKTINOLYTICKÝCH BAKTERIÍ

V tomto pokusu jsme 1 ml naředěného obsahu slepého střeva králíků vpravili na Petriho misku a přelili cca 20 ml vitamino-minerálního agaru s 0,4% glukosou pro stanovení celkového počtu bakterií nebo vitamino-minerálním agarem s 0,4 g pektinu. Naočkované Petriho misky jsme kultivovali anaerobně ve 40° C dva dny. Pro kultivaci Petriho misek jsme použili anaerostaty Oxoid Anaerobic Jar (HP11) o obsahu 3,5 litru. V anaerostatu byl umístěn paladiový katalyzátor "Oxoid Anaerobic Catalyst (BR 42)" a proužek buničité vaty pohlcující vznikající vodu a tudíž udržující vnitřek nádoby suchý. Po uzavření jsme z anaerostatu vysáli vzduch olejovou vývěvou na hodnotu 80 až 100 kPa

a vpustili směs vodíku (90%) a oxidu uhličitého (10%). Anaerobní prostředí v anaerostatu bylo kontrolováno pomocí "Oxoid Anaerobic Indicator (1058)".

Celkový počet mikroorganismů jsme zjišťovali počítáním jednotek tvořících kolonie (CFU) na agarové plotně. Poté jsme některé kolonie z ploten s pektinem přeočkovali do vitamino-minerálního bujónu s 0,4% pektinem. Takto izolované bakterie jsme podrobili Gramovu barvení abychom zjistili morfologii bakterií.

Pro vyšetření biochemických parametrů jsme použili soupravy komerčních identifikačních testů ENTEROTest 24 a ANAEROTest 23 (Lachema, Brno) a soupravu testů pro anaeroby API Api-test 50 CHL (BioMérieux, Francie). Odděleně jsme provedli ještě testy na katalázu a hydrolýzu škrobu (Collins et al. 1995), růst v přítomnosti 20% žluči nebo 5% NaCl, teplotní rozmezí růstu a vztah ke kyslíku (Harrigan a McCance 1966).

4.3. Pektin

Jablečný pektin jsme získali z firmy Pektin, s.r.o. (nyní Danisco Smiřice, ČR). Pektin jsme přečistili extrakcí ethanolem (74% v/v) abychom odstranili nízkomolekulární kontaminanty. Obsah uronových kyselin v pektinu jsme stanovili 3-fenylfenolovou metodou za přítomnosti kyselého tetraboritanu v bazickém prostředí ve dvou paralelních uspořádáních (s fenylfenolem a bez). Standardem byla kyselina polygalakturonová. Absorbanci jsme měřili při 520 nm (Blumenkrantz a Asboe-Hansen 1973).

Obsah monosacharidů v pektinu byl určen plynovou chromatografií na koloně plněné 5% OV225 (Serva, SRN) na Chromosorbu N-AW. Teplota byla programována v rozmezí 120-200 °C.

Obsah uhlíku v pektinu byl změřen v laboratoři elementální analýzy VŠCHT na přístroji Perkin Elmer 2400.

Methanol jsme stanovili po předchozí alkalické hydrolýze v 0,5 M NaOH plynovou chromatografií na koloně 2,4 m dlouhé plněné Chromosorbem WAW s 15% SP1220/1% H₃PO₄ (Supelco, USA). Teplota stanovení byla 100° C.

4.4. Kultivační média

B. pseudolongum P6, *B. caccae* KWN, *Bifidobacterium. sp*, *Bifidobacterium pseudolongum* P13 a G1, *Bifidobacterium globosum* P11 a G4 a *S. bovis* X4 jsme kultivovali ve vitamino-minerálním médiu následujícího složení (množství na 1 l média):

NAHCO ₃	3,6 g
Ca(OH) ₂	0,25 g

MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
(NH ₄)SO ₄	5,2 g
kvasničný autolyzát	2,2 g
bakteopepton	2,2 g
NaOH	13,5 g
roztok vitamínů	1 ml
roztok mikroprvků	1 ml
resazurin	1,1 ml
cekální extrakt	90 ml
deion. H ₂ O	900 ml
H ₃ PO ₄	12,5 ml

Cékální extrakt jsme připravili smícháním obsahu slepých střev králíků a destilované vody v objemovém poměru 1:1. Směs jsme sterilovali 1 h při 110° C, poté odstředili 1 h při 5000 ot./min. a supernatant opět vysterilovali (40 min při 110° C). Takto připravený cékální extrakt byl skladován a před použitím ještě jednou odstředěn.

Po uvedení k varu jsme médium rozplnili do 100 ml nebo 500 ml NTS lahví, probublali CO₂, redukovali přídavkem cysteinu (0,5 g/l média) a uzavřeli gumovou zátkou s převlečnou hliníkovou maticí. Médium jsme sterilovali 50 min při 110° C. Jako substrát jsme použili pektin nebo glukosu, koncentrace byla 4 g/l (pro měření produkce metabolitů) nebo 6 g/l (měření aktivity enzymů).

Složení roztoku vitamínů (množství na 500ml):

Pyridoxin (B6)	1 g
Riboflavin (B2)	1 g
Thiamin (B1)	1 g
Nikotinamid	1 g
Pantothenol (B3)	1 g
p-aminobenzoát	0,005 g
Kys. listová	0,025 g
Biotin	0,025 g
Kobalamin (B12)	0,0025 g

Složení minerálního roztoku (množství na 500 ml):

NiSO ₄ · 7H ₂ O	0,275 g
H ₃ BO ₃	0,167 g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,075 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,5 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,127 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,127 g
Chelaton 1	50 g
NaOH 5M	127 ml
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,05 g

P. fluorescens DBM 3056 jsme kultivovali aerobně v médiu dle Van Dijkena a Quaylea (1977). Složení média (množství na 1l):

K_2HPO_4	1,74 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,66g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20 g
Roztok minerálů	0,5 ml
Roztok vitamínů	0,5 ml

Médium jsme rozplnili do 500ml NTS lahví, probublali O_2 a sterilovali 50 min při 110° C. Substrát byla glukosa o koncentraci 4 g/l.

4.5. KULTIVACE SMĚSNÝCH KULTUR OBSAHU SLEPÉHO STŘEVA

K pokusu jsme použili dva brojlerové králíky z komerční farmy, krmené běžnou granulovanou směsí obsahující 17 % N-látek a 13 % hrubé vlákniny. Králíci byli poraženi ve věku 12 týdnů. Slepá střeva byla vyprázdněna, jejich obsahy smíchány a ihned použity k inokulaci kultur. Inkubace probíhala na vodní lázni při 39°C v 300 ml NTS lahvích, hermeticky uzavřených zátkami z butylové gumy. Médium obsahovalo 25 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaHCO_3 , 15 mM KCl, 0,1% kvasničného autolyzátu 0,05% močoviny a 10% (v/v) cékálního extraktu. Před použitím bylo médium pasterováno zahřátím na 100°C po dobu 3 min. Jablečný pektin, pšeničný škrob a xylan z ovesných slupek (Fluka) byly přidány v množství 0,54 g na 90 ml média, k inokulaci byl použit 1 g obsahu slepého střeva. Anaerobiosa byla docílena přídavkem 45 mg $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a atmosférou CO_2 . Každý substrát byl inkubován ve 4 kulturách. Čtyři kultury byly okamžitě po inkubaci odstředěny (5000 g, 30 min., 4°C). Ostatní kultury byly inkubovány 18 h, pak rovněž odstředěny.

Supernatanty byly do doby analýzy uloženy při -20°C. Sedimenty byly 2x promyty fyziologickým roztokem a protein extrahován 1 M NaOH při 100°C po dobu 1 h. Na konci inkubace byl v NTS lahvích zmeřen manometrický tlak a odebrán vzorek plynu k analýze na plynovém chromatografu.

4.6. STANOVENÍ ETHANOLU A TĚKAVÝCH MASTNÝCH KYSELIN

Pro stanovení ethanolu a TMK byly bakterie kultivovány v 100 ml NTS lahvích v 6 opakováních 24 hod. při 39° C. *B. pseudolongum*, *B. globosum* a *B. caccae* rostly na pektinu nebo glukose, koncentrace substrátu byla 4 g/l, *Bifidobacterium sp.* a *S. bovis* rostly na směsném substrátu pektin+glukosa 2 g/l. Narostlé kultury jsme odstředili (30 min, 5000 ot./min, 4° C) a v supernatantu měřili produkci metabolitů.

Acetát a ethanol jsme stanovili plynovou chromatografií na koloně plněné Chromosorbem WAW s 15% SP1220/1% H₃PO₄ (Supelco, USA). Teplotní program byl od 120-195° C. Jako nosný plyn jsme použili N₂, nástřik byl 1 µl, jako kalibrační směs jsme použili vodný roztok o složení 50 mmol/l acetátu, 20 mmol/l propionátu, 20 mmol/l isobutyrátu, 20 mmol/l butyrátu, 5 mmol/l isovalerátu, 5 mmol/l valerátu a 50 mmol/l ethanolu, vnitřním standardem byl 5 mmol/l roztok kyseliny 2-ethylbutyrové ve 20% H₃PO₄.

Laktát a sukcinát jsme methylovali a stanovili plynovou chromatografií na koloně plněné DB-FFAP 30m x 0,53mm (J&W Scientific, Folsom, USA). Teplotní rozmezí bylo 110-165° C. Mobilní fáze byl N₂, nástřik vzorku 1 µl. Jako kalibrační směs jsme použili vodný roztok o koncentraci 10 mmol/l laktátu, 2 mmol/l fumarátu a 2 mmol/l sukcinátu, vnitřním standardem byl 40 mmol/l roztok kyseliny glutarové v 20% H₃PO₄. Formiat jsme stanovili spektrofotometricky acetamidovým činidlem. Při této reakci se vzorek smíchá s kyselinou citronovou a v přítomnosti acetanhydridu a roztoku acetamidu v isopropanolu dává formiat červené zbarvení (Sleat a Mah 1984).

4.7. STANOVENÍ CO₂, H₂ a CH₄

Pro stanovení CO₂ jsme vitamino-minerální médium modifikovali, vyneschali jsme NaHCO₃ a médium probublali N₂. Bakterie jsme kultivovali 48 h při 39° C v objemu 30 ml média v 100 ml NTS lahvích v 6 opakováních. CO₂ jsme stanovili plynovou chromatografií na chromatografu s tepelně vodivostním detektorem a kolonou plněnou Carboxenem 100 (Supelco, USA). Kultury jsme okyselili přídavkem 4 M HCl (2ml/láhev). Separace probíhala při 90° C. Produkci H₂ jsme měřili ve 100 ml NTS lahvích v 6 opakováních, objem kultivačního média v lávci byl 30 ml. Vzorky jsme analyzo-

vali na stejném chromatografu a stejné koloně jako CO₂. Methan jsme rovněž stanovili na plynovém chromatografu, avšak s detektorem plamenově - ionizačním.

4.8. STANOVENÍ PEKTINU, GLUKOSY, ŠKROBU A XYLANU

V odstředěném médiu po kultivaci bakterií jsme měřili množství nespotřebovaného substrátu. Pektin jsme stanovili 3-fenylfenolovou metodou (viz kap. 2.1. Pektin). Glukosu jsme stanovili za pomoci komerčního kitu (Glukosa GOD, Pliva - Lachema, Brno , ČR). Škrob, který nebyl spotřebován ve směsných kulturách, jsme stanovili reakcí s fenolem a H₂SO₄ (Herbert a kol. 1971). Nespotřebovaný xylan byl rozpuštěn zvýšením pH na 10-11, potom stanoven reakcí s orcinolem (Herbert a kol. 1971).

4.9. STANOVENÍ SUŠINY A BUNĚČNÉ BÍLKOVINY

Pro zjištění produkce sušiny jsme bakterie kultivovali v šesti 300 ml NTS lahvích, obsah média v každé lahvici byl 200 ml. Narostlé kultury jsme centrifugovali (30 min, 6000 ot./min) a 2x promyli promývacími roztoky (složení promývacího roztoku 1: 1,12 g KOH + 1,8m l H₃PO₄ + 8,77 g NaCl doplnit do 1 l, pH 7, složení promývacího roztoku 2: 0,75 g NaCl/l). Promyté buňky jsme kvantitativně převedli do předem vysušených a zvážených lékovek a sušili při 80° C do konstantní hmotnosti.

V buněčné sušině jsme stanovili množství bílkovin spektrofotometricky metodou dle Lowryho (Herbert a kol. 1971). Bílkoviny z buněčné sušiny jsme extrahovali v 1 M NaOH 1 hod. při 100 °C. Další postup byl pro různé vzorky společný: vzorky, vhodně naředěné, jsme nejprve inkubovali s roztokem CuSO₄ a vínanu sodno-draselného v alkalickém prostředí při pokojové teplotě. Pak jsme přidali ředěné Folinovo činidlo (Penta, Chrudim, ČR) a vzorky inkubovali 30 min při pokojové teplotě. Absorbanci jsme měřili při 750 nm proti slepému pokusu. Jako standard jsme použili bovinní sérový albumin (BSA).

4.10. PŘÍPRAVA BUNĚČNÉHO EXTRAKTU

Bakterie jsme kultivovali v 500 ml NTS lahvích 24 hod. při 39° C. Narostlé kultury jsme centrifugovali (30 min, 6000 ot./min, 4° C). Supernatant jsme dialyzovali 24 hod. při 4° C proti destilované vodě a použili pro stanovení extracelulárních enzymů uvolňovaných do prostředí. Buňky jsme dvakrát promyli 50 mM fosfátovým pufrem o pH 7,0 (pro stanovení KDPG aldolázy 25 mM fosfátovým pufrem o pH 7,65), resuspendovali v malém množství téhož pufru a rozbili sonikací. Sonikace probíhala v ochranné atmo-

sféře CO₂ a sonikační nádobka byla umístěna v ledové drtí. Rozbité buňky jsme odstředili (40 min, 15000 ot./min, 4° C) a supernatant použili pro stanovení intracelulární enzymové aktivity a enzymové aktivity vázané na buněčnou stěnu.

4.11. STANOVENÍ AKTIVITY POLYGALAKTURONÁT LYASY

Aktivitu polygalakturonát lyasy jsme stanovili v buněčném extraktu i v dialyzovaném médiu. Reakce je založena na růstu absorbance při 232 nm způsobeném vznikajícími 4,5 nenasycenými degradačními produkty při inkubaci vzorku se substrátem (Collmer a kol. 1988). Reakční směs obsahovala vhodně naředěný vzorek, TRIS-HCl o pH 8,5, CaCl₂ a kyselinu polygalakturonovou jako substrát. Aktivitu jsme měřili na spektrofotometru s temperovaným kyvetovým prostorem. Teplota reakce byla 40° C.

4.12. STANOVENÍ AKTIVITY POLYGALAKTURONÁT HYDROLASY

Aktivitu polygalakturonát hydrolasy jsme stanovili v buněčném extraktu i v dialyzovaném médiu. Reakce je založena na spektrofotometrickém stanovení redukujících cukrů vzniklých reakcí vzorku se substrátem (Lever 1977). Vzorky jsme nejprve inkubovali s roztokem 0,5% pektinu a 50mM fosfátového pufru o pH 7 při 40° C. Reakci jsme zastavili přídavkem 0,3M ZnSO₄ a 0,3M Ba(OH)₂. Vzniklou sraženinu jsme oddělili centrifugací (10 min, 4000 ot./min) a v supernatantu stanovili redukující cukry reakcí s hydrazidem kyseliny p-hydroxybenzoové (PAHBAH) při 410 nm.

4.13. STANOVENÍ AKTIVITY KDPG ALDOLASY

Aktivitu KDPG aldolasy jsme stanovili v buněčném extraktu metodou dle Wooda (1971). Reakční směs obsahovala 0,25 ml 0,8 M TRIS o pH 7,65, 0,35 ml buněčného extraktu (0,3-0,4 mg bílkovin) a 0,05 ml 0,06 M glutathionu sodného. Po dvou minutách jsme přidali 0,05 ml 0,01M MnCl₂. Směs byla ponechána 10 min při 37°C, pak jsme přidali 0,05 ml 0,1 M NaAsO₂, který inhibuje dekarboxylaci pyruvátu, 0,05 ml 0,06 M CH₂ICOONa, který zabraňuje tvorbě pyruvátu vedlejšími reakcemi, a 0,20 ml 0,35 M roztoku substrátu (KDPG nebo 6-fosfoglukonát). Směs jsme inkubovali 10 min (pro KDPG) nebo 40 min (pro 6-fosfoglukonát) při 37°C, pak byla reakce zastavena zahřátím (100°C, 4 min). Reakční směs jsme centrifugovali a množství vzniklého pyruvátu měřili vysokoučinnou kapalinovou chromatografií na přístroji Shimadzu série VP (Shimadzu, USA) na koloně Ostion LGKS0800H+ (Tessek, ČR). Pyruvát byl z kolony eluován 10 mM H₂SO₄ a detekován měřením absorbance při 190 nm. Nálezy pyruvátu jsme kori-

govali odečtem nálezů pyruvátu ve dvou inkubovaných slepých pokusech. První byla reakční směs bez substrátu, druhý reakční směs bez buněčného extraktu.

4.14. SYNTÉZA KDPG

KDPG bohužel není komerčně dostupný. Bylo proto nutno jej připravit z pyruvátu a glyceraldehyd-3-fosfátu (Meloche a Wood 1966). Metoda je založena na skutečnosti, že KDPG aldoláza katalyzuje kondenzační reakci obou látek jestliže je pyruvát v přebytku. Jako zdroj KDPG aldolázy posloužil buněčný extrakt z *P. fluorescens* DBM 3056. Tuto syntézu, která vyžaduje značnou zkušenosť, uskutečnila Ing. D. Dušková z ÚŽFG AV ČR.

4.15. VISKOZIMETRICKÁ STANOVENÍ

Pomocí viskozimetrických měření jsme určili způsob štěpení pektinu u obou pektinolytických enzymů produkovaných *B. caccae* KWN (Sirotek a kol. 2004) a u kmenů *Bifidobacterium pseudolongum* P13 a G1 a *Bifidobacterium globosum* P11 a G4. Pektinolytické enzymy štěpí pektinový polymer na krátké degradační produkty, což způsobuje pokles viskozity. Podle rychlosti poklesu viskozity a souběžně meřené rychlosti vzrůstu množství redukujících cukrů (hydrolasy), popř. nenasycených produktů (lyasy), lze určit, zda enzym štěpí pektin terminálně nebo náhodně v kterémkoliv místě řetězce tzv. random mechanismus (Rombouts a Pilnik 1980, Aymard a Mouquet 2001). Reakční směs pro měření viskozity obsahovala 100 ml 1,2% pektinu v 100 mM sodno-acetátovém pufru o pH 7,5 nebo 5,6 a 20 ml vzorku (dialyzované médium). Část této reakční směsi jsme použili pro měření viskozity v Hoepplerově viskozimetru. Tento viskozimetr pracuje na principu měření doby pádu kalibrované kuličky reakční směsi. Hoepplerův viskozimetr zároveň umožnuje temperování reakční směsi na přesnou teplotu, což je v případě enzymatických reakcí důležité. Teplota reakce byla 40°C. Zároveň s měřením poklesu viskozity jsme druhou část reakční směsi použili pro stanovení redukujících cukrů (enzym polygalakturonát hydrolasa) nebo nenasycených degradačních produktů (enzym polygalakturonát lyasa), které byly měřeny spektrofotometricky při 232 nm. Do reakční směsi pro polygalakturonát lyasu byl přidán CaCl₂ o koncentraci 7,5 mM.

4.16. VÝPOČTY

Recovery metabolického vodíku ($2H$) ve směsných kulturách bylo zjištěno podle Demeyera (1991).

$$2H_{rel.} = 2A + P + 4B + 3V$$

$$2H_{acc.} = 4M + 2P + 2B + 4V$$

$$2H_{rec.} = (2H_{acc.}/2H_{rel.}) \cdot 100$$

kde A, P, B, V a M představují molární produkci acetátu, propionátu, butyrátu, valerátu a methanu. K statistickému vyhodnocení rozdílů mezi substráty byla použita analýza variance a Bonferroniho test.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Metabolismus pektinu a glukosy a aktivita pektinolytickych enzymu u *Bacteroides caccae* KWN izolovaného ze slepého střeva králíků

Molekulárně genetickou analýzou, kterou provedli kolegové z Laboratoře anaerobní mikrobiologie ÚŽFG, byl pektinolytický izolát identifikován s vysokou pravděpodobností (98%) jako *Bacteroides caccae*. Identifikaci jsme navíc potvrdili biochemickými testy a nepochybujeme o jeho identitě, ačkoliv Abecia a kol. (2005) ve své studii nenašli ve slepém střevě králíků žádnou sekvenci odpovídající skupině *Bacteroides/Prevotella*.

Kmen利用oval všechnu glukosu a cca 81% pektinu. Kultura rostoucí na pektinu produkovala výrazně více acetátu a méně formiátu, laktátu, fumarátu a sukcinátu než kultura rostoucí na glukose. Pektin je více oxidovaný substrát než glukosa a proto byly jeho metabolity méně redukované než metabolity glukosy. Proto produkce acetátu, jehož tvorba nevyžaduje redukční ekvivalenty, byla o 40,7% vyšší u kultury rostoucí na pektinu v porovnání s kulturou rostoucí na glukose (o 72,7% vyjádřeno na gram využitého substrátu). Avšak produkce laktátu, fumarátu a sukcinátu byla nižší na pektinu. Laktát byl produkován pouze u kultur rostoucích na glukose. V souladu s literaturou (Johnson a kol. 1986) byla zaznamenána nízká produkce vodíku. Produkce CO₂ byla výrazně vyšší u kultur rostoucích na glukose. To je pravděpodobně důsledek vyšší produkce acetátu oxidační dekarboxylací pyruvátu než dekarboxylací D-galakturnové kyseliny na L-arabinosu. Úplná dekarboxylace námi použitého pektinu by vedla k produkci cca třikrát většího množství CO₂ než bylo pozorováno. Produkce methanolu z pektinu byla 11,5 ± 1,7 mmol.l⁻¹. Výtěžky buněčné sušiny a buněčného proteinu byly totožné u obou substrátů.

Molekula pektinu může být štěpena buď β-eliminací (lyasy) nebo hydrolyticky (hydrolasy). Oba typy enzymů mohou degradovat pektinový polymer v kterémkoliv místě řetězce (random mechanismus) nebo terminálně (Rombouts a Pilnik 1980). Pektin byl bakterií *Bacteroides caccae* KWN štěpen působením extracelulárních polygalakturonát hydrolasy a polygalakturonát lyasy. Typ působení pektinolytických bakteríí byl určen viskozimetricky a analýzou reakčních produktů. Viskozimetrie je citlivou metodou vhodnou k měření aktivity pektinolytických enzymů, oproti spektrofotometrickým metodám je výhodnější v tom, že pomocí měření poklesu viskozity reakční směsi lze určit způsob jakým enzym polymer degradiuje. Pokles viskozity při enzymatické reakci je způsoben štěpením dlouhého řetězce pektinu na krátké degradační produkty (Rombouts a Pilnik

1980, Aymard a Mouquet 2001). Vysoký vzrůst koncentrace redukujících cukrů u *Bacteroides caccae* KWN byl provázen velmi malou změnou viskozity, naproti tomu byl zjištěn malý nárůst redukujících cukrů a rychlý pokles viskozity u kontrolního kmene *Streptococcus bovis* X4. Tyto údaje napovídají, že polygalakturonát hydrolasa *Bacteroides caccae* KWN štěpí pektin terminálně (exo-typ), zatímco hydrolasa *Streptococcus bovis* X4 je typu endo.

Tvorba nenasycených vazeb a pokles viskozity u *Streptococcus bovis* X4 byl mnohem rychlejší než u *Bacteroides caccae* KWN. Poměr obou ukazatelů je však u obou bakterií téměř shodný. Wojciechowicz a Ziolecki (1984) identifikovali enzym štěpící pektin u *Streptococcus bovis* E13 jako endopolygalakturonát (endopektát) lyasu. Předpokládáme, že enzym stejného typu je produkován i bakterií *Bacteroides caccae* KWN.

U obou pektinolytických enzymů byla aktivita extracelulární frakce mnohem vyšší než aktivita buněčné frakce, což znamená, že enzym je převážně uvolňován do okolního prostředí. Oproti tomu, pektinolytické enzymy bakterie *Bacteroides thetaiotamicron*, polygalakturonát lyasa a polygalakturonát hydrolasa, byly vázané na buňku, z vnější strany buněčné stěny (McCarthy a kol. 1985).

Vysoká koncentrace methanolu u kultur rostoucích na pektinu ($11,5 \pm 1,7 \text{ mmol.l}^{-1}$) ukazuje, že methoxylové skupiny pektinu byly hydrolyzovány. Produkty degradace pektinu jsou metabolizovány intracelulárně. U kmene *Bacteroides caccae* KWN byla nalezena aktivita KDPG aldolasy, enzymu katalyzujícího konečný krok Entner-Doudoroffovy metabolismické dráhy stejně jako u mnoha dalších bakterií: *Treponema saccharolyticum* (Paster a Canale-Parola 1985), *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola* (Marounek a Dušková 1999), *Lachnospira multiparus* (Dušková a Marounek 2001), *Bifidobacterium pseudolongum* (Slováková a kol. 2002). Kmen *Bacteroides caccae* KWN nevyužíval fosfoglukonát, produkt metabolismu glukosy. Tento výsledek napovídá, že námi zkoumaný kmen nemá aktivitu fosfoglukonát dehydrasy, enzymu produkujícího KDPG z 6-fosfoglukonátu (Touster 1969) a tudíž, že u kmene *Bacteroides caccae* KWN neprobíhá klasická Entner-Doudoroffova dráha metabolismu glukosy.

Tab. 7 Produkce metabolitů u bakterie *Bacteroides caccae* KWN rostoucí na pektinu a glukose.

Metabolity (mmol.g ⁻¹ spotřebovaného substrátu)	Pektin	Glukosa
Formiát	0,20 ± 0,08 ^a	0,62 ± 0,16
Acetát	7,67 ± 0,35 ^a	5,52 ± 0,11
Propionát	2,36 ± 0,21 ^a	1,95 ± 0,20
Laktát	0 ^a	1,15 ± 0,22
Fumarát	0,08 ± 0,03 ^a	0,32 ± 0,12
Sukcinát	1,55 ± 0,28 ^a	2,05 ± 0,36
Oxid uhličitý	1,85 ± 0,25	0,59 ± 0,07
Vodík	0,038 ± 0,002	0,033 ± 0,007

^a významně odlišné od glukosy (P<0,05)

Průměry a SD byly spočítány ze 6-ti kultur.

Tab. 8 Růstové výtěžky bakterie *Bacteroides caccae* KWN rostoucí na pektinu a glukose.

Výtěžek (mg.g ⁻¹ spotřebovaného substrátu)	Pektin	Glukosa
Sušina	325 ± 53	328 ± 16
Protein	102 ± 15	105 ± 7

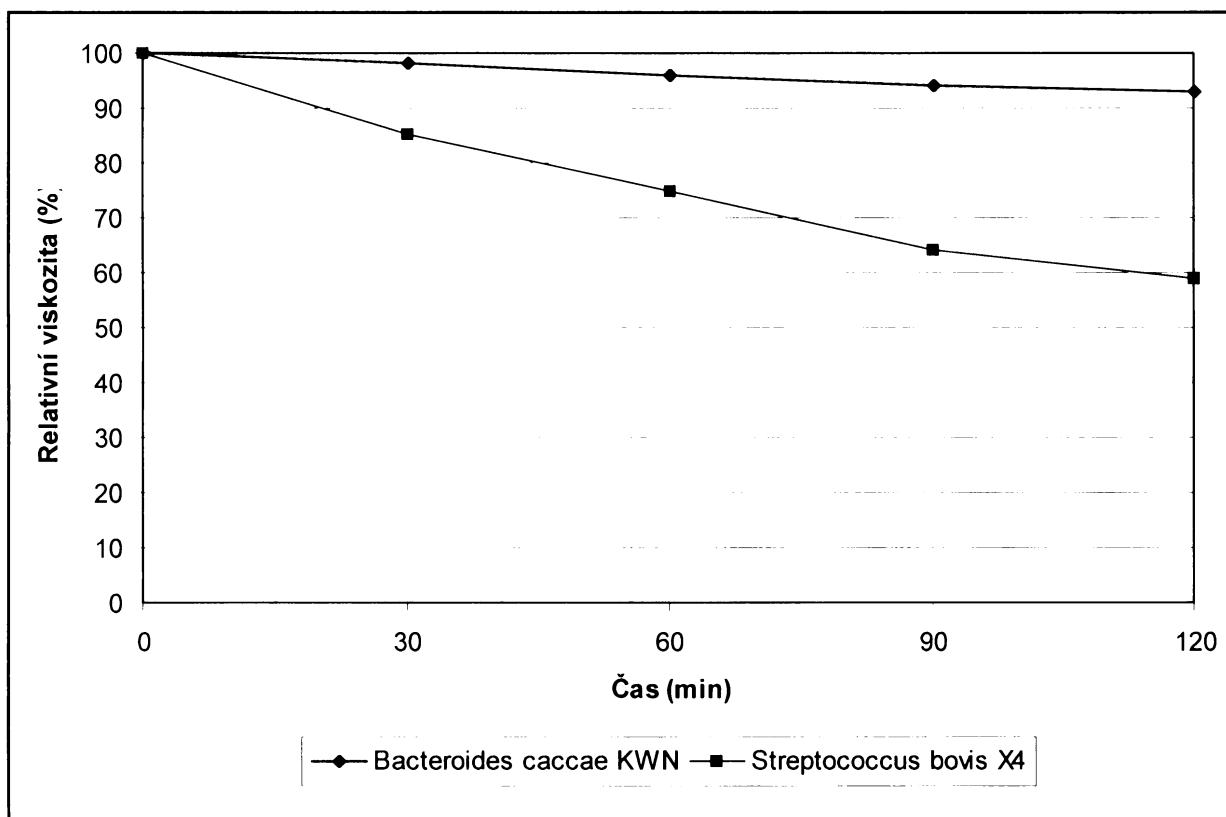
Průměry a SD byly spočítány ze 6-ti kultur.

Tab. 9 Aktivity pektinolytických enzymů bakterie *Bacteroides caccae* KWN.

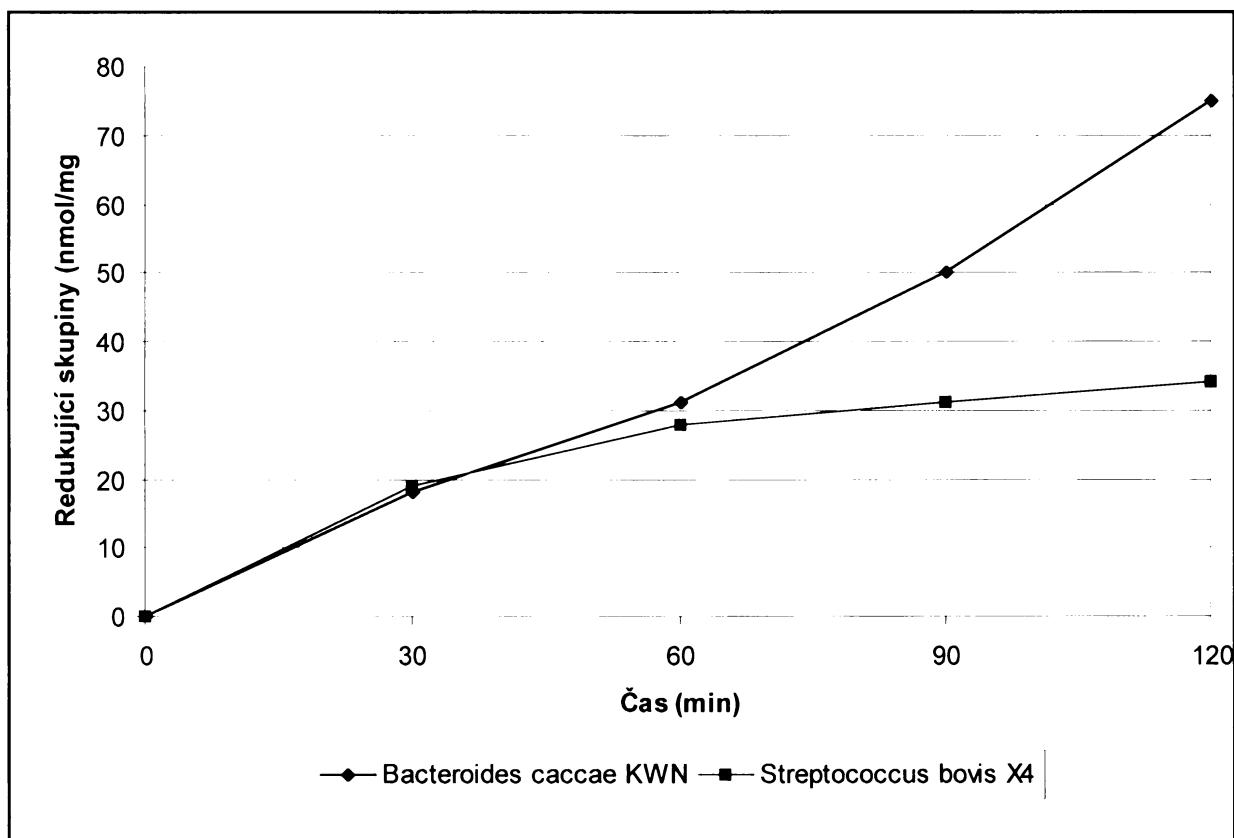
Enzym nmol.min.mg ⁻¹	Původ enzymu	Substrát		
		Pektin	Glukosa	Glukosa
		<i>B.caccae</i> KWN	<i>B. caccae</i> KWN	<i>Ps. fluorescens</i> ^a
Lyasy	Buněčný extrakt	2,9 ± 0,5	0,3 ± 0,1	-
	Supernatant	30,2 ± 5,1	2,8 ± 0,7	-
Hydrolasy	Buněčný extrakt	5,5 ± 1,1	0,5 ± 0,1	-
	Supernatant	55,9 ± 7,9	5,5 ± 0,3	-
KDPGA	Buněčný extrakt	662,0 ± 55,0	719,0 ± 31,0	568
PGD	Buněčný extrakt	0	0	95

^a Kontrolní kmen

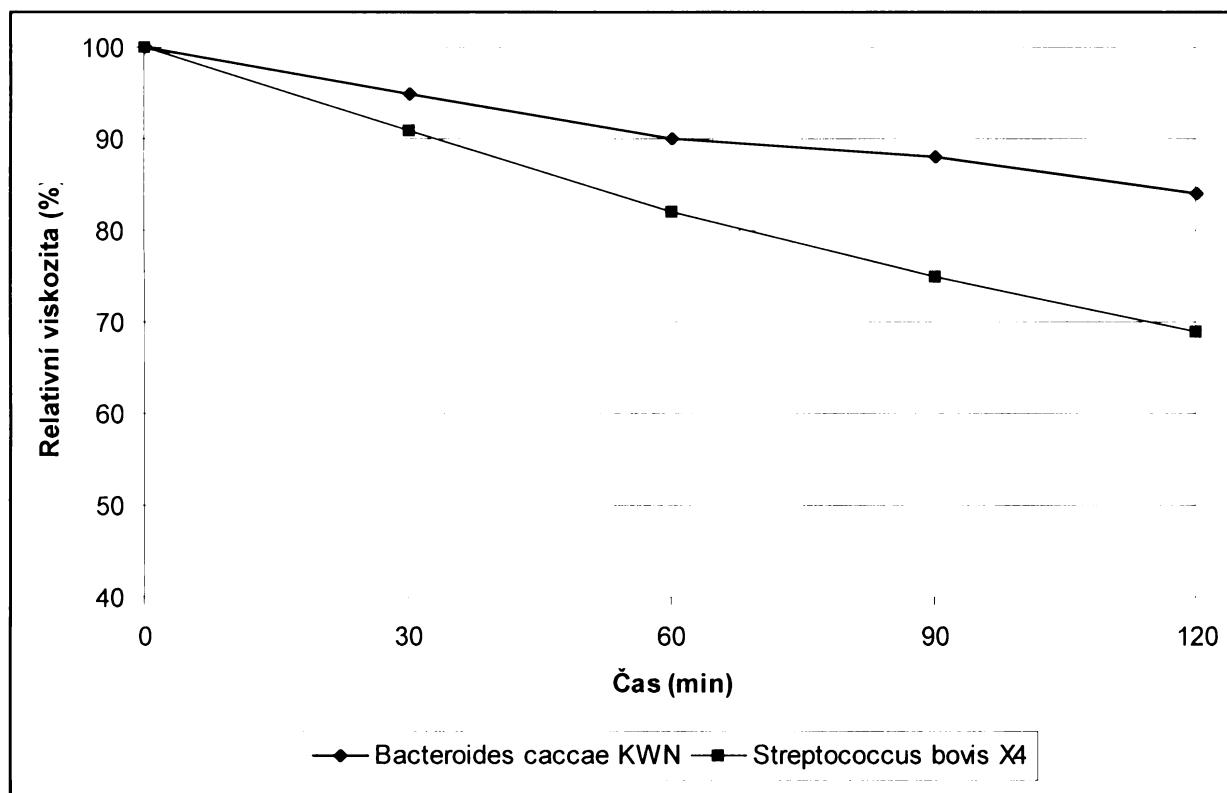
Graf 1 Změna viskozity reakční směsi s 1% roztokem pektinu při pH = 5,6 u pektinolytických bakterií *Bacteroides caccae* KWN a *Streptococcus bovis* X4



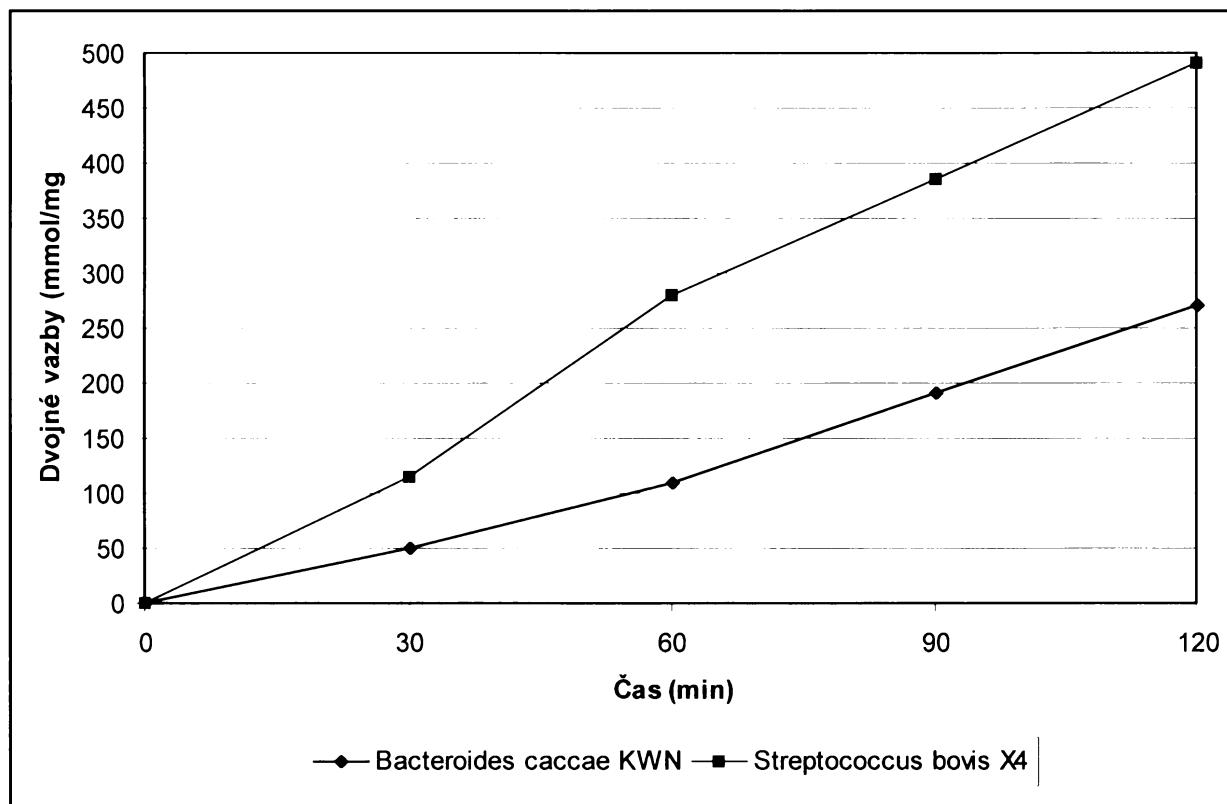
Graf 2 Produkce redukujících skupin v reakční směsi s 1% roztokem pektinu při pH = 5,6 u pektinolytických bakterií *Bacteroides caccae* KWN a *Streptococcus bovis* X4



Graf 3 Změna viskozity reakční směsi s 1% roztokem pektinu při pH = 7,5 u pektinolytických bakterií *Bacteroides caccae* KWN a *Streptococcus bovis* X4



Graf 4 Tvorba nenasycených produktů v reakční směsi s 1% roztokem pektinu při pH = 7,5 u pektinolytických bakterií *Bacteroides caccae* KWN a *Streptococcus bovis* X4



5.2. Metabolismus pektinu a glukosy a aktivita pektinolytických enzymů u kmene *Bifidobacterium pseudolongum* P6 izolovaného ze slepého střeva králíka

B. pseudolongum P6利用oval téměř všechnu glukosu ($3,92 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$) a cca 76 % pektinu. Také složení metabolitů se lišilo dle substrátu, kultury rostoucí na glukose produkovały významně více formiátu, laktátu a ethanolu a méně acetátu a sukcinátu než odpovídající kultury na pektinu. Metabolismus glukosy je u rodu *Bifidobacterium* specifický, glukosa je fermentována tzv. fruktosa-6-fosfátovým zkratem, kdy enzym fruktosa-6-fosfoketolasa štěpí fruktosu-6-fosfát na acetylfosfát a erythrosa-4-fosfát (Scardovi a Trovatelli 1965). Při fermentaci hexos u bifidobakterií by teoreticky měl vzniknout acetát a laktát v molárním poměru 1,5:1. Při růstu na pektinu se fermentační poměr změnil ve prospěch acetátu a sukcinátu. Podobné změny odpovídající změně substrátu (glukosa vs. pektin) byly pozorovány u bactérií *Butyrivibrio fibrisolvans*, *Prevotella ruminicola* a *Lachnospira multiparus* (Marounek a Dušková 1999, Dušková a Marounek 2001). Pektin je více oxidovaný substrát než glukosa a proto jeho metabolity byly méně redukované než metabolity na glukose. V rozporu s Bergeyho mikrobiologickým manuálem *B. pseudolongum* P6 produkoval malé, ale měřitelné množství CO_2 při růstu na glukose. Výtežek suché hmoty byl u kmene P6 nesignifikantně vyšší u kultury rostoucí na glukose.

U kmene *B. pseudolongum* P6 byl hlavní pektinolytický enzym polygalakturonát hydrolasa, aktivita polygalakturonát lyasy nebyla nalezena. Tento výsledek je neobvyklý, protože u všech dosud zkoumaných pektinolytických bakterií byla dominantním pektinolytickým enzymem polygalakturonát lyasa, popřípadě byly přítomny oba enzymy (Wojciechowicz 1972, Wojciechowicz a kol. 1980, Wojciechowicz a kol. 1982, Wojciechowicz a Ziolecki 1984, Sirotek a kol. 2001, Dušková a Marounek 2001). Aktivity extracelulární frakce byly u obou kmenů mnohem vyšší než aktivity buněčné (intracelulární) frakce, což pravděpodobně znamená, že enzym je uvolňován do okolního prostředí. Pektin je jako velká makromolekula štěpen pouze mimo buňku, to bylo již dříve pozorováno u bactérií *Prevotella* (dříve *Bacteroides*) *ruminicola* (Wojciechowicz 1972), *Lachnospira multiparus* (Dušková a Marounek 2001) a také u bactérií hub (Kopečný a Hodrová 1995).

U kmene *B. pseudolongum* P6 byla detekována aktivita KDPG aldolasy, enzymu katalyzujícího finální krok Entner-Doudoroffovy metabolické dráhy. Tato enzymová aktivita byla prokázána i u bactérií pektinolytických *Treponema saccharophilum*

(Paster a Canale-Parola 1985), *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola* (Marounek a Dušková 1999), *Lachnospira multiparus* (Dušková a Marounek 2001) a u dalších saprofytických bakterií. Podobně jako u výše zmíněných bacterových bakterií, kmen *B. pseudolongum* P6 nevyužíval 6-fosfoglukonát, pravděpodobně kvůli chybějící aktivitě 6-fosfoglukonát dehydrasy. Z těchto výsledků vyplývá, že u kmene *B. pseudolongum* P6 je pektin degradován modifikovanou Entner-Doudoroffovou dráhou, žádný z výsledků nenaznačuje přítomnost reakční sekvence, kdy D-galakturonát je dekarboxylován na L-arabinisu a dále metabolizován pentosofosfátovou dráhou, která je zmiňována v souvislosti s některými bacterovými bakteriemi (Leng 1970, Van Soest 1983). Kultury na pektinu neprodukovaly žádný CO₂, ačkoliv dekarboxylací množství pektinu použitého v tomto pokusu by teoreticky mohlo vzniknout 5,08 mmol CO₂/g. Námi zkoumaný kmen *Bifidobacterium pseudolongum* P6 neměl aktivitu fosfoglukonát dehydrasy, enzymu produkujícího KDPG z 6-fosfoglukonátu (Touster 1969), tudíž u něj nemůže probíhat klasická Entner-Doudoroffova dráha metabolismu glukosy.

Při měření pektinolytických aktivit kmene *B. pseudolongum* P6 byly použity dva kontrolní kmeny: pektinolytický *Streptococcus bovis* X4 a *Bifidobacterium* sp., který pektin nedegraduje.

S. bovis X4 degraduje pektin na nenasycené oligogalakturonidy, které dále nevyužívá (Wojciechowicz a Ziolecki 1984). Proto byl kultivován na směsném substrátu pektin + glukosa. U kmene *S. bovis* X4 nebyla nalezena aktivita KDPG aldolasy což může být důvod, proč tento kmen není schopen využít degradační produkty pektinu. U kmene *S. bovis* X4 byla nalezena aktivita polygalakturonát hydrolasy i polygalakturonát lyasy, aktivita polygalakturonát hydrolasy byla velmi nízká. *Bifidobacterium* sp. neměl žádnou z námi stanovených enzymových aktivit. Kmen *Pseudomonas fluorescens* byl použit jako pozitivní kontrola při stanovení aktivit KDPG aldolasy a 6-fosfoglukonát dehydrasy.

Tab. 10 Produkce metabolitů u bakterie *Bifidobacterium pseudolongum* P6 při růstu na pektinu a glukose

Metabolity (mmol.g ⁻¹ spotřebovaného substrátu)	Pektin	Glukosa
Formiát	3,22 ± 0,23*	3,63 ± 0,38
Acetát	6,01 ± 0,64	5,81 ± 0,45
Laktát	1,58 ± 0,25*	2,42 ± 0,17
Sukcinát	0,66 ± 0,10*	0,48 ± 0,09
Ethanol	0,32 ± 0,10*	0,51 ± 0,12

*Významně odlišné od hodnot při růstu na glukose (p < 0,05).

Tab. 11 Růstové výtěžky u bakterie *Bifidobacterium pseudolongum* P6 při růstu na pektinu a glukose

Výtěžek (mg.g ⁻¹ spotřebovaného substrátu)	Pektin	Glukosa
Sušina	154 ± 37	168 ± 40
Protein	71 ± 29	84 ± 41

Tab. 12 Aktivity pektinolytických enzymů bakterií *Bifidobacterium pseudolongum* P6, *Pseudomonas fluorescens* DBM 3056, *Streptococcus bovis* X4 a *Bifidobacterium* sp.

Enzym. aktivita nmol.min.mg ⁻¹	Původ enzymu	Substrát		
		Pektin	Glukosa	Glukosa
		<i>B. pseudolongum</i>	<i>B. pseudolongum</i>	<i>Ps. fluorescens</i>
Lyasy	Buněčný extrakt	0	0	
	Supernatant	0	0	
Hydrolasy	Buněčný extrakt	3,7 ± 0,2	0	
	Supernatant	87,4 ± 16,5	11,4 ± 0,6	
KDPGA	Buněčný extrakt	919,0 ± 274,0	254,0 ± 194,0	562 ± 72
PGD+KDPGA	Buněčný extrakt	0	0	80 ± 27

Enzym. aktivita nmol.min.mg ⁻¹	Původ enzymu	Pektin + Glukosa	Pektin + Glukosa
		<i>Strep. bovis</i>	<i>Bifidobacterium</i> sp.
Lyasy	Buněčný extrakt	0	0
	Supernatant	102,0 ± 22,0	0
Hydrolasy	Buněčný extrakt	3,5 ± 0,3	0
	Supernatant	11,6 ± 0,3	0
KDPGA	Buněčný extrakt	0	0
PGD+KDPGA	Buněčný extrakt	0	0

5.3 Pektinolytické enzymy čtyř kmenů bifidobakterií izolovaných z trávicího traktu králíka

Kmeny *Bifidobacterium pseudolongum* P13, *Bifidobacterium pseudolongum* G1, *Bifidobacterium globosum* P11 a *Bifidobacterium globosum* G4利用ovaly pektin pomocí enzymu polygalakturonát hydrolasa, stejně jako *B. pseudolongum* P6 zkoumaný v předchozím pokusu (Slováková a kol. 2002). Polygalakturonát lyasa nebyla nalezena ani u jednoho z námi zkoumaných kmenů bifidobakterií což je neobvyklé. U všech dříve zkoumaných pektinolytických bakterií z trávicího traktu se na štěpení pektinu podílely oba enzymy (Wojciechowicz 1972, Wojciechowicz a kol. 1980, Wojciechowicz a kol. 1982, Wojciechowicz a Ziolecki 1984, Marounek a Dušková 1999, Dušková a Marounek 2001, Sirotek a kol. 2004). Ovšem pro potvrzení hypotézy, že rod *Bifidobacterium* využívá pro utilizaci pektinu pouze enzym polygalakturonát hydrolasu, by bylo potřeba provést pokusy na dostatečně velkém počtu kmenů. Aktivita polygalakturonát hydrolasy všech čtyř kmenů byla nalezena pouze v extracelulární frakci, což je v souladu s našimi předchozími pokusy, kdy aktivity pektinolytických enzymů buněčné frakce byly velmi nízké popřípadě nedetektovatelné (Sirotek a kol. 2001, Slováková a kol. 2002, Sirotek a kol. 2004).

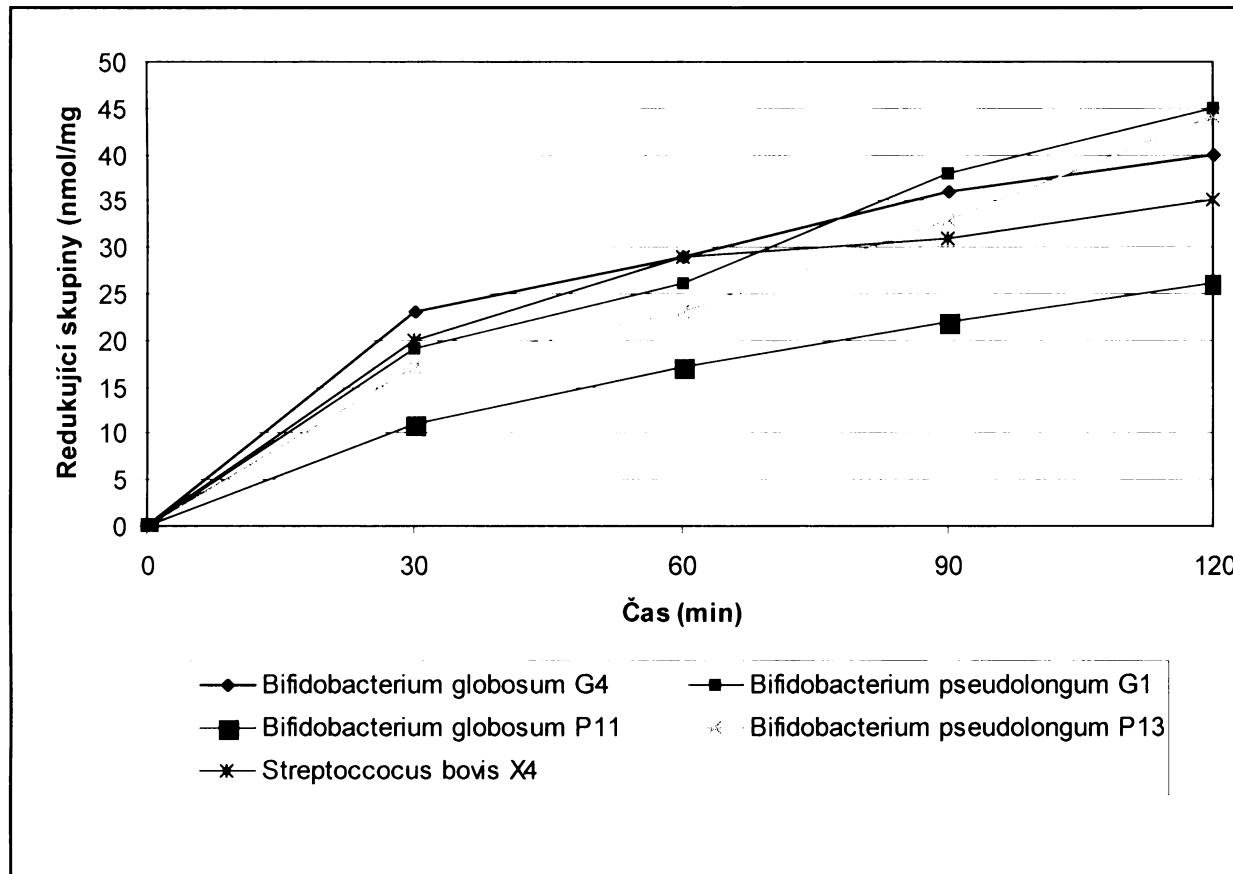
Pomocí viskozimetrických měření byl stanoven mechanismus štěpení polygalakturonát hydrolas všech čtyř kmenů pektinolytických bifidobakterií. U kmenů *B. pseudolongum* P13, *B. globosum* G4 a *B. pseudolongum* G1, byla zaznamenána malá změna poklesu viskozity a vysoký nárůst redukujících skupin. Lze tedy předpokládat, že všechny tři kmeny mají polygalakturonát hydrolasu typu *exo*. U kmene *B. globosum* P11 byly zaznamenány odlišné výsledky oproti předcházejícím kmenům, rychlejší pokles viskozity provedený malou změnou redukujících skupin. Polygalakturonát hydrolasa tohoto kmene je tedy zřejmě typu *endo*, podobně jako u kontrolního kmene *S. bovis* X4, ačkoliv u kontrolního kmene je pokles viskozity výraznější.

Tab. 13 Pektinolytické enzymy čtyř kmenů bifidobakteríí izolovaných z trávicího traktu králíků

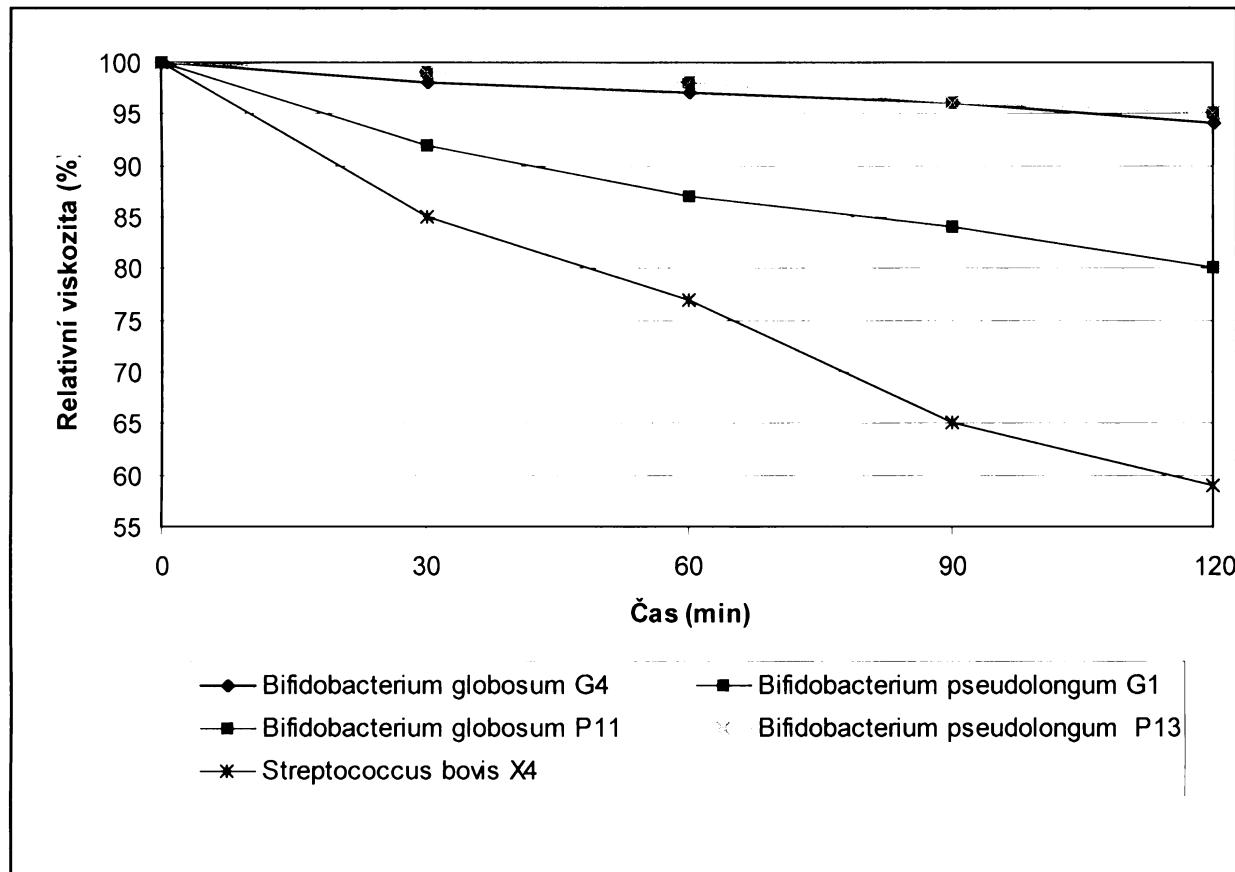
Enzym nmol.min.mg ⁻¹	Původ enzymu	Substrát		
		Pektin	Pektin	Pektin
		<i>B. pseudolongum</i> P13	<i>B. pseudolongum</i> G1	<i>B. globosum</i> P11
Lyasy	Buněčný extrakt	0	0	0
	Supernatant	0	0	0
Hydrolasy	Buněčný extrakt	0	0	0
	Supernatant	121,1 ± 20,0	60,7 ± 18,2	143,4 ± 19,9

Enzym nmol.min.mg ⁻¹	Původ enzymu	Pektin	Pektin + Glukosa
		<i>B. globosum</i> G4	<i>S. bovis</i> X4
Lyasy	Buněčný extrakt	0	0
	Supernatant	0	85,0 ± 13,1
Hydrolasy	Buněčný extrakt	0	5,1 ± 0,8
	Supernatant	108,7 ± 22,5	23,2 ± 9,7

Graf 5 Tvorba redukujících skupin v reakční směsi s 1% roztokem pektinu při pH = 5,6 u pektinolytických bakterií *Bifidobacterium globosum* G4, *Bifidobacterium pseudolongum* G1, *Bifidobacterium globosum* P11, *Bifidobacterium pseudolongum* P13 a *Streptococcus bovis* X4



Graf 6 Změna viskozity reakční směsi s 1% roztokem pektinu při pH = 5,6 u pektinolytických bakterií *Bifidobacterium globosum* G4, *Bifidobacterium pseudolongum* G1, *Bifidobacterium globosum* P11, *Bifidobacterium pseudolongum* P13 a *Streptococcus bovis* X4



5.4. Fermentace pektinu ve směsné kultuře mikroorganismů slepého střeva králíků

Výsledky pokusu jsou shrnuty v tab. . Ukazuje fermentační stechiometrii a produkci proteinu v kulturách obsahu slepého střeva králíků s pektinem, škrobem a xylanem.

Fermentace pektinu ve srovnání s dalšími substráty se vyznačuje vysokým podílem acetátu a nízkým zastoupením ostatních metabolitů vyjma methanu. Produkce methanu však byla ve srovnání s produkcí TMK nízká. Produkce proteinu i jeho výtěžek nebyly v kulturách s různými substráty statisticky významně rozdílné. Statisticky významně vyšší tvorba butyrátu než propionátu byla jen v kulturách se škrobem. Hodnoty recovery 2H byly bez výjimky nízké ve všech kulturách.

Nízké recovery metabolického vodíku ukazuje, že část TMK nevzniká cestou přes pyruvát, ale z $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ redukční acetogenezí. Význam tvorby methanu je v slepém střevu králíků malý. Skladba metabolitů, vznikajících ve směsné kultuře fermentací pektinu, se značně odlišuje od skladby metabolitů škrobu, méně již od metabolitů xylanu. Rozdíly, které existují mezi metabolity pektinu a škrobu ve směsných kulturách, odpovídají rozdílům, které byly pozorovány mezi fermentací pektinu a glukosy v čistých kulturách bakterií slepého střeva králíků.

Tab. 14 Produkce mikrobiálních metabolitů a proteinu v kulturách obsahu slepého střeva králíků. Jako substrát byl použit pektin, škrob a xylan.

	Pektin	Škrob	Xylan
Spotřebovaný substrát (mg/l)	5871 ^a (20)	5275 ^b (21)	5699 ^c (19)
Produkce TMK (mmol/l)	64,6 ^a (6,4)	57,5 ^a (1,8)	43,7 ^b (1,6)
Acetát (mol%)	78,0 ^a (1,7)	66,5 ^b (2,1)	75,0 ^a (2,4)
Propionát (mol%)	10,4 (1,3)	12,2 (1,0)	11,7 (1,6)
Butyrát (mol%)	10,3 ^a (0,9)	19,4 ^b (2,8)	11,9 ^a (0,9)
Valerát (mol%)	1,3 ^a (0,1)	1,9 ^b (0,2)	1,4 ^a (0,1)
Methan (mmol/l)	4,7 ^a (1,3)	3,3 ^{ab} (0,2)	2,8 ^b (0,2)
Protein (mg/l)	836 (128)	787 (130)	670 (94)
Výtěžek proteinu (mg/g)	142 (21)	149 (24)	118 (16)
2H recovery (%)	35,8 (1,3)	41,0 (3,7)	36,7 (2,3)

Průměry z čtyř kultur. Směrodatné odchylky jsou uvedeny v závorkách.

abc P < 0,05

ZÁVĚR

Zdravotní stav hospodářsky významných zvířat je z velké části určován skladbou potravy, která musí respektovat zvláštnosti trávicího traktu jednotlivých druhů. Vhodné složení krmných směsí je obzvlášť důležité u býložravých savců, neboť trávení rostlinné potravy se neobejde bez pomoci symbiotických mikroorganismů. Znalosti o mikrobiálním osídlení živočišného trávicího traktu a s tím souvisejících trávicích procesů jsou značně nevyrovnané. Velmi dobré jsou v případě bachořů přezvýkavců a zadních oddílů trávicího traktu prasat a potkanů. U ostatních zvířat jsou nedostatečné, což platí i pro králíky.

Úkolem výzkumu je objasnit procesy, které se v trávicím traktu odehrávají a poznatky prezentovat tak, aby mohly být uvedeny do praxe. Přispět k objasnění metabolismu pektinu u bakterií z trávicího traktu, jedné z významných složek potravy králíků, bylo i cílem předložené disertační práce. Hlavní výsledky lze stručně shrnout takto:

Kmen *Bifidobacterium pseudolongum* P6利用oval všechnu glukosu a téměř všechn pektin. Pektin je více oxidovaný substrát než glukosa a proto jeho metabolity byly méně redukované než metabolity glukosy. Fermentační stechiometrie při růstu na pektinu se změnila oproti růstu na glukose ve prospěch acetátu a sukcinátu, podobně jako u bachorových bakterií. Pektin byl u tohoto kmene degradován působením polygalakturonát hydrolasy, překvapivě však nebyla detekována aktivita polygalakturonát lyasy. Kmen *B. pseudolongum* P6 měl aktivitu KDPG aldolasy, tudíž uronové kyseliny jsou v buňce metabolizovány modifikovanou Entner-Doudoroffovou dráhou, zatímco 6-fosfoglukonát, metabolit utilizace glukosy v téže dráze, metabolizován nebyl. Konvenční Entner-Doudoroffova dráha degradace glukosy tedy u tohoto kmene neprobíhá. K metabolismu glukosy je tudíž využívána glykolysa.

Bacteroides caccae KWN利用oval všechnu glukosu a téměř všechn pektin. Kultura rostoucí na pektinu produkovala výrazně více acetátu a méně formiátu, laktátu, fumarátu a sukcinátu než kultura rostoucí na glukose. Pektin je u této bakterie degradován extracelulární hydrolasou, která štěpí polymer od konce (při pH = 5,6 vytvoří cca 56 mmol redukujících skupin za jednu minutu vztažených na 1g proteinu) a extracelulární lyasou s náhodným účinkem uvnitř řetězce (při pH = 7,5 vytvoří cca 30mmol redukujících skupin za jednu minutu vztažených na 1g proteinu). Intracelulární metabolismus D-galakturonátu probíhá modifikovanou Entner-Doudoroffovou metabolickou dráhou. Konvenční dráha Entner-Doudoroffova metabolismu glukosy u *Bacteroides caccae* KWN neprobíhá.

Kmeny *Bifidobacterium pseudolongum* P13, *Bifidobacterium pseudolongum* G1, *Bifidobacterium globosum* G4 a *Bifidobacterium globosum* P11 degradují pektin působením polygalakturonát hydrolasy, polygalakturonát lyasa nebyla detekována podobně jako u kmene *Bifidobacterium pseudolongum* P6 v předchozím pokusu. Toto sledování by bylo vhodné rozšířit, aby bylo možno dojít k obecnému závěru, že bifidobakterie (na rozdíl od řady dalších bakterií) lyasou nedisponují. U kmenů *B. pseudolongum* P13, *B. globosum* G4 a *B. pseudolongum* G1 je polygalakturonát hydrolasa typu *exo*, zatímco u kmene *Bifidobacterium globosum* P11 je typu *endo*.

Ve směsných kulturách mikroorganismů obsahu slepého střeva králíků se fermentace pektinu vyznačovala vysokým podílem acetátu a nízkým zastoupením ostatních metabolitů. Mezi metabolismu pektinu a škrobu ve směsných kulturách byly obdobné rozdíly jako mezi pektinem a glukosou v čistých kulturách bakterií slepého střeva králíků.

7. LITERATURA

- Abecia, L., Fondevila, M., Balcells, J., Edwards, J.E., Newbold, J.C., McEwan, N.R. (2005): Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters* 244, 111-115
- Aymard, C., Mouquet, C. (2001): An empirical kinetic expression for modeling the viscosimetric data of enzymatic pectin degradation and measurement of enzyme activity. *Food Biotechnology* 15(2), 69-78
- Baciu, I.E., Joerdening, H.J. (2004) Kinetics of galacturonic acid release from sugar-beet pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 34, 505-512
- Bennegadi, N., Gidenne, T., Licois, D., (2001): Impact of fibre deficiency and sanitary status on non-specific enteropathy of growing rabbits. *Animal Research* 50, 401-103
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54, 484-489
- Bjoernhagen, G. (1972): Separation and delay contents in the rabbit colon. *Swedish Journal of Agricultural Research* 2, 125-136
- Bellier, R., Gidenne, T., Collin, M. (1995): In vivo study of circadian variations of the caecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Science* 73, 128-135
- Bjergegaard, Ch., Sorensen, H., Sorensen, S. (1997): Dietary fibres-important parts of high quality food and feeds. *Jounal of Animal and Feed Sciences* 6, 145-161
- Carabaño, R., Piquer, J. (1998): The digestive tract of the rabbit. In: *The Nutrition of the Rabbit*, pp 1-38, ed. de Blas, C., Wiseman, J., CABI Publishing, Wallingford
- Carabaño, R., García, J., De Blas, J.C. (2001) : Effect of fibre source on ileal apparent digestibility of non - starch polysaccharides in rabbits. *Animal Science* 72, 343-350
- Collins, C.H., Lyne, P.M., Grance, J.M. (1995): In: *Collins and Lyne s Microbiological Methods*, pp. 102-120, Butterworth-Heinemann Ltd., Great Britain
- Collmer, A., Ried, J.L., Mount, M.S. (1988): Assay methods of pectic enzymes. In: *Methods in Enzymology*, vol. 161, ed. Wood, W.A., Kellogg, S.T., Academic Press, San Diego
- Conway, T. (1992): The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiology Reviews* 103, 1-28

- Crociani, F., Alessandrini, A., Mucci, M.M., Biavati, B. (1994): Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *International Journal of Food Microbiology* 24, 199-210
- Cortez, S., Brandenburger, H., Greuel, E., Sundrun, A. (1992): Investigation of the relationships between feed and health-status and the intestinal flora of rabbits. *Tierarztliche Umschau* 47, 544-549
- Demeyer, D.I. (1991): Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. In: *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*, pp 217-237, ed. Jouany, J.-P., INRA, Paris
- De Rosaz, P.A., Roseli, J., Díaz, J.V., deLucco, D.F., Carabaño, R., Barelga, M., Barbé, J., Sacco, M., Badiola, I. (2002): The RFLP, a method to analyse the biodiversity of the gut microbiota in rabbits. *Multifaceted research in rabbits: a model to develop a healthy and safe production in respect with animal welfare*. COST Action 848, Milan, Italy. 28.2.-2.3., pp 24-31
- Dušková, D., Marounek, M. (2001): Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*
- Emaldi, O., Crociani, F., Mattenzi, D. (1979): A note of the total viable counts and selective enumeration of anaerobic bacteria in the caecal content, soft and hard faeces of rabbit. *Journal of Applied Bacteriology* 46, 169-172
- Forsythe, S.J., Parker, D.S. (1985): Nitrogen metabolism by the microbial flora of the rabbit caecum. *Journal of Applied Bacteriology* 58, 363-369
- Gouet, P., Fonty, G. (1979): Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 19 (3A), 553-566
- Garcia, J., Gidenne, T., Falcao-Cunha, L., de Blas, C. (2002): Identification of the main factors that influence caecal fermentation traits in growing rabbits. *Animal Research* 51, 165-173
- Garcia, J., Carabaño, R., Pérez-Alba, L., de Blas, J.C. (2000): Effect of fiber source on caecal fermentation and nitrogen recycled through caecotrophy in rabbits. *Journal of Animal Science* 78, 638-646
- Gidenne, T. (2003): Fibres in rabbit feeding for digestible troubles prevention: respective role of low-digested and digestive fibre. *Livestock Production Science* 81, 105-117
- Gidenne, T. (1996): Nutritional and ontogenetic factors affecting rabbit caeco-colic digestive physiology. *Proceedings of the 6th World Rabbit Congres*, Vol 1: pp. 13-28

- Gidenne, T. (1997): Caeco-colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors and related disturbances. *Livestock Production Science* 51, 73-88
- Gidenne, T., Lebas, F. (2002): Role of dietary fibre in rabbit nutrition and in digestive troubles prevention. *2nd Rabbit Congress of the America*, Habana, Cuba, 19.6.-22.6., pp. 47-59
- 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 rabbit. *British Journal of Nutrition* 67, 133-146
- Gidenne T., Bellier R. (2002): Use of digestible fibre in replacement to available carbohydrates-Effect on digestion, rate of passage and caecal fermentation pattern during the growth of the rabbit. *Livestock Production Science* 63, 141-152
- Gidenne T., Jehl, U., Lapanouse, A., Segura, U. (2004): 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
- 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 intake level. *Animal Feed Science and Technology* 99, 107-118
- Gidenne, T., Carabano, C., Garcia, J., de Blas, C. (1998): Fibre digestion.In: *The Nutrition of the Rabbit*, pp 69-144, ed. de Blas, C., Wiseman, J., CABI Publishing, Wallingford
- Griffiths, M., Davies, D. (1963): The role of soft pellets in the production of lactic acid in the rabbit stomach. *Journal of Nutrition* 80, 171-180
- Harrigan, W.F., McCance, M.E.(1966): *Laboratory Methods in Microbiology*. Academic Press, London and New York
- Heinrichová, K., Wojciechowicz, M., Ziolecki,A. (1985): An exo-D-galacturonase of *Butyrivibrio fibrisolvens* from the bovine rumen. *The Journal of General Microbiology* 131, 2053-2058
- Herbert, D., Phipps, P.J. and Strange, R.E. (1971): Chemical analyses of microbial cells. In: *Methods in Microbiology*, Vol. 5B, pp 209-344, ed. Norris, J.R. and Ribbons, D.W., Academic Press, London
- Hexenberg, S., Hexenberg, E., Williamsen, N. (1994): A study on lipid metabolism in heart and liver of cholesterol-and pectin-fed rats. *Journal of Nutrition* 71, 181-192

- Hopwood, D.E., Pethick, D.W., Hampson, D.J. (2002): Increasing the viscosity of the intestinal contents stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Brachyspira piloricoli* in weaner pigs. *British Journal of Nutrition* 88, 523-532
- Hugovieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., Reverchon, S. (1996): Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Microbiology* 50, 213-257
- Cheeke, P.R., Patton, N.M. (1980): Carbohydrate - overload of the hindgut. A probable cause of enteritis. *Journal of Applied Rabbit Research* 3, 20-23
- Jilge, B., Meyer, H. (1975): Coprophagy - dependent changes of the anaerobic bacterial flora in stomach and small intestine of the rabbit. *L. Versuchsttier* Bd. 17, 308-314
- Johnson, J.L., Moore, W.E.C. and Moore, L.V.H. (1986): *Bacteroides caccae* sp. nov., *Bacteroides merdae* sp. nov. and *Bacteroides stercoris* sp. nov. isolated from human faeces. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36, 499-501
- Judd, R.A., Truswell, A.S. (1985): The hypocholesterolemic effect of pectin in rats. *British Journal of Nutrition* 53, 409-425
- Kohnová, Z., Kohn, R. (1981): Funkční a fyziologické vlastnosti pektinu ve výživě. *Chemické listy* 75, 1051-1058
- König, H.E., Sautet, J., Liebig, H.G. (2002): Trávicí ústrojí. In: *Anatomie domácích savců*, pp 15-79, ed. König, H.E, Liebig, H.G., Typoset, Bratislava
- Kopečný, J., Hodrová, B. (1995): Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. *Letters in Applied Microbiology* 20, 312-316
- Kovachevich, R., Wood, W.A. (1955): Carbohydrate metabolism by *Pseudomonas fluorescens*. IV. Purification and properties of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase. *Journal of Biological Chemistry* 213, 745-756
- Leng, R.A. (1970): Formation and production of volatile fatty acids in the rumen. In: *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*, pp 406-481, ed. Phillipson, A.T., Oriel Press ,Newcastle upon Tyne
- Lever, M. (1977): Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): effect of bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry* 81, 21-27
- Mackie, R.I. and White, B.A.: *Gastrointestinal Microbiology*, vol 1, International Thomson Publishing 1997, New York
- Marounek, M., Dušková, D. (1999): Metabolism of pectin in rumen bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola*. *Letters in Applied Microbiology* 29, 429-433

- Marounek, M., Fievez, V., Mbanzamihigo, L., Demeyer, D., Maertens, L. (1999): Age and incubation time effects on in vitro caecal fermentation pattern in rabbits before and after weaning. *Archives of Animal Nutrition* 52, 195-201
- Marounek, M., Vovk, S.J., Skřivanova, V. (1995): Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *British Journal of Nutrition* 73, 463-469
- Marounek, M., Březina, P., Baran, M. (1997): Fermentation of carbohydrates and yield of microbial protein in mixed cultures of rabbit caecal microorganisms. *Archives of Animal Nutrition* 53, 241-252
- Marounek, M., Vovk, S.J., Benda, V. (1997): Fermentation patterns in rabbit caecal cultures supplied with plant polysaccharides and lactate. *Acta Veterinaria Brno* 67, 9-13
- Marty, J., Vernay, M. (1984): Absorption and metabolism of the volatile fatty acids in the hindgut of the rabbit. *British Journal of Nutrition* 51, 265-277
- Marvan, F. (1992): Trávicí soustava. In: *Morfologie hospodářských zvířat*, pp 125-159
, Marvan, F. (ed.), Zemědělské nakladatelství Brázda, Praha
- McCarthy, R.E., Kotarski, S.F., Salyers, A.A. (1985): Location and characteristics of enzymes involved in the breakdown of polygalacturonic acid by *Bacteroides thetaiota-micron*. *Journal of Bacteriology* 161, 493-499
- McDonough, M.A., Kadirvelraj, R., Harris, P., Poulsen, J.-Ch., N., Larsen, S. (2004): Rhamnogalacturonan lyase reveals a unique three-domain modular structure for polysaccharide lyase family 4. *FEBS Letters* 565, 188-194
- Meloche, H.O., Wood, W.A. (1966): 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate. In: *Methods in Enzymology*, vol 9, pp 51-53, ed. Colowick, S.P. and Kaplan, N., Academic Press, New York
- Molgaard, A. (2003): Rhamnogalacturonan acetyl esterase, a member of the SGNH-hydrolase family. In: *Advances in Pectin and Pectinase Research*, pp 299-315, ed. Voragen, F., Schols, H., Visser, R., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Olano-Martin, E., Gibson, G.R., Rastall, R.A. (2002): Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* 93, 505-511
- Oomen, R., Vincken, J.P., Bush, M.S. (2003): Towards unraveling the biological significance of the individual components of pectic hairy regions in plants. In: *Advances in Pectin and Pectinase Research*, pp 15-35, ed. Voragen, F., Schols, H., Visser, R., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

- Paster, B.J., Canale-Parola, E. (1985): *Treponema saccharophilum* sp. nov., a large pectinolytic spirochete from bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 212-219
- Phillipson A.T (1970.: *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*, Oriel Press, Newcastle upon Tyne
- Pellinen, T., Ahlfors, H., Blot, N., Condemine, G. (2003): Topology of the *Erwinia chrysanthemi* oligogalacturonate porin KdgM. *Biochemical Journal* 372, 329-334
- Pickard, D.W., Stevens, C.E. (1972): Digesta flow through the rabbit large intestine. *American Journal of Physiology* 222, 1161-1166
- Perez, J.-M., Gidenne, T., Bouvarel, I., Arveux, P., Bourdillon, A., Briens, Ch., Le Naur, J., Messager, B., Mirabito, L. (2000): Replacement of digestible fibre by starch in the diet of the growing rabbit. II. Effects on performance and mortality by diarrhoea. *Annales de Zootechnie* 49, 369-377
- Rombouts, J.M., Pilnick, W. (1980): Pectic enzymes. In: *Microbial Enzymes and Bioconversions*, vol. 5, pp 227-282, ed. Rose, A.H., Academic Press, London
- Roubalová, M. (2003): Chov králíků v České republice po roce 1989. Nové směry v chovu brojlerových králíků. VII. Celostátní seminář ČZU v Praze
- Sirotek, K., Slováková, L., Kopečný, J., Marounek, M. (2004): Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bacteroides caccae* KWN. *Letters in Applied Microbiology* 37, 327-332
- Sirotek, K., Marounek, M., Rada, V., Benda, V. (2001): Isolation and characterisation of rabbit caecal pectinolytic bacteria. *Folia Microbiologica* 46, 79-82
- Sleat, R., Mah, P.A. (1984): Quantitative method for colorimetric determination of formate in fermentation media. *Applied Environmental Microbiology* 47, 884-885
- Scardovi, V., Trovatelli, L.D. (1965): The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Annali di Microbiology ed Enzymology* 15, 19-29
- Skřivanová, V., Čopíková, J., Sinica, A., Marounek, M. (1996): Effect of a rabbit diet with sugar-beet pulp on gains, digestibility of nutrients and quality of rabbit meat. *Scientia Agriculturae Bohemica* 27, 221-227
- Slováková, L., Dušková, D., Marounek, M. (2002): Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*. *Letters in Applied Microbiology* 35, 126-130
- Thakur, B.R., Slugh, R.K., Handa, A.K. (1997): Chemistry and uses of pectin-A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37, 47-73

- Thibault, J.F., Ralet, M.C. (2003): Physico-chemical properties of pectins in the cell walls and after extraction, in: *Advances in Pectin and Pectinase Research*, pp 91-107, ed. Voragen, F., Schols, H., Visser, R., Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands
- Touster, O. (1969): Aldonic and uronic acids. In: *Comprehensive Biochemistry*, vol. 17, pp 219-240, ed. Florkin, M., Stoltz, E.H., Elsevier Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands
- Tsujita, T., Sumiyoshi, M., Han, L.K., Fujiwara, T., Tsujita, J., Okuda, H. (2003): Inhibition of lipase activities by citrus pectin. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 49, 340-345
- Van Dijken, J.P., Quayle, J.R. (1977): Fructose metabolism in four *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology* 114, 281-286
- Van Rijssen, M., Smidt, M.P., Van Kouwen, G., Hansen, T.A. (1992): Involvement of an intracellular oligogalacturonate hydrolase in metabolism of pectin by *Clostridium thermosaccharolyticum*. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 837-842
- Van Soest, P.J. (1983): *Nutritional Ecology of the Ruminant*, ed. Orvallis (Ore): O&B Books
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. (1991): Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597
- Vincken, J.P. (2003): Pectin - the hairy thing. In: *Advances in Pectin and Pectinase Research*, pp 47-61, ed. Voragen, F., Schols, H., Visser, R., Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands
- Vidal, S., Doco, T., Williams, P., Pelletier, P. (2000): Structural characterisation of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II.: evidence for the backbone location of the acetic acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydrate Research* 326, 227-294
- Volek, Z., Marounek, M., Skřivanová, V. (2005): Replacing starch by pectin and inulin in diet of early-weaned rabbits: effect on performance, health and nutrient digestibility. *Journal of Animal and Feed Science* 14, 327-337
- Willats, W.G.T., McCartney, L., Knox, J.P. (2003): Pectin cell biology: complexity in context, In: *Advances in Pectin and Pectinase Research*, pp 147-159, ed. Voragen, F., Schols, H., Visser, R., Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands
- Wood, W.A. (1971): Assay of enzymes representative of metabolic pathways. In: *Methods in Microbiology*, vol. 6A, pp 411-424, ed. Norris, J.R. and Ribbons, D.W., Academic Press, London

- Wojciechowicz, M., Ziolecki, A. (1984): A note on the pectinolytic enzymes of *Streptococcus bovis*. *Journal of Applied Bacteriology* 56, 515-518
- Wojciechowicz, M. (1972): Comparison of action of *Bacteroides ruminicola* polygalacturonic lyase and pectinase. *Acta Microbiologica Polonica*, Ser. A, IV (XXI): 189-196
- Wojciechowicz, M., Heinrichova, K., Ziolecki, A. (1980): A polygalacturonate lyase produced by *Lachnospira multiparus* isolated from the bovine rumen. *Journal of General Microbiology* 117, 193-199
- Wojciechowicz, M., Heinrichova, K., Ziolecki, A. (1982): An exopectate lyase of *Butyrivibrio fibrisolvens* from the bovine rumen. *Journal of General Microbiology* , 2661-2665