Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Růst střevních bakterií na oligosacharidech z lupiny

Diplomová práce

Bc. Tereza Kodešová

Výživa a potraviny

Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.
Konzultant práce: Ing. Roman Švejstil

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Růst střevních bakterií na oligosacharidech z lupiny" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. dubna 2019 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za pečlivé a trpělivé vedení mé diplomové práce, a Ing. Romanovi Švejstilovi za pomoc v laboratoři a při vyhodnocování výsledků.

Růst střevních bakterií na oligosacharidech z lupiny

Souhrn

Díky nově vyšlechtěným „sladkým“ odrůdám lupiny, které neobsahují tolik antinutričních látek jako běžné odrůdy, ale zároveň obsahují vysoké procento bílkovin, se v současné době lupina začíná pěstovat a využívat k výživě hospodářských zvířat a lidí. Vzhledem k vysokému obsahu oligosacharidů rafinosové řady (RSO) by mohla lupina sloužit jako vhodný zdroj prebiotik. Hypotézou byl tedy předpoklad, že semena lupiny obsahují RSO, které budou podporovat růst probiotických bakterií. Cílem práce proto bylo stanovení oligosacharidů rafinózové řady v lupině a testování růstu střevních bakterií v přítomnosti těchto oligosacharidů. V první fázy bylo stanovováno množství RSO ve vybraných plodinách pomocí biochemického testu od Megazyme®. Ve druhé probíhala extrakce a izolace RSO ze tří odrůd lupiny bílé (Amiga, Dieta a Zulika). Ve třetí fázy byly na vyizolovaných RSO z lupin testován růst čistých kultur bifidobakterií. Ve čtvrté fázy byl prováděn krmný pokus na nosnicích, kdy bylo sledováno ovlivnění mikrobioty slepých střev. Pokusná zvířata byla rozdělena do 5 skupin a krmena různými krmnými směsmi, kdy byl nahrazován sójový extrahovaný šrot v různém poměru a různé podobě šrotem z lupiny. Následně byly pomocí plotnové metody zjišťovány rozdíly ve složení mikrobioty ve slepých střevech nosnic. Stanovovány byly celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterie, laktobacily, enterokoky a *Eschericha coli*. Výsledky ukázaly, že lupina RSO opravdu obsahuje, a to v největším množství (8,26 ± 0,14 g RSO/100 g lupinové mouky) v porovnáním s ostatními testovanými plodinami (sója: 6,96 ± 0,21 g RSO/100 g šrotu, řepka: 7,79 ± 0,14 g RSO/100 g šrotu, slunečnice: 1,73 ± 0,26 g RSO/100 g šrotu). RSO se podařilo z odrůd lupin vyizolovat v dostatečném množství pro provedení pokusu s čistými kulturami bifidobakterií, kdy bylo zjištěno, že RSO z lupiny stimulují růst některých kmenů bifidobakterií (hlavně *B. longum* ATCC15707). U krmného pokusu s nosnicemi nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) ve složení střevní mikrobioty v závislosti na krmné dávce. Nedošlo tedy k pozitivnímu, ale ani negativnímu ovlivnění složení střevní mikrobioty. Jelikož pokusné krmné směsi měly stejný prebiotický efekt jako komerční krmná směs N1 a zároveň byl u pokusu s čistými kulturami bifidobakterií potvrzen bifidogenní účinek, lze závěrem říci, že sóju v krmných směsích můžeme nahradit lupinou. Lupina by také mohla sloužit jako vhodný zdroj prebiotik pro člověka.

Klíčová slova: Lupina; prebiotika; oligosacharidy rafinózové řady; bifidobakterie; výživa

Growth of intestinal bacteria on lupine oligosaccharides

Summary

Lupina become more popular now days, because there are new sweet varieties of lupin, which haven´t such high level of antinutrients and have similar content of protein compared to traditional variets. Thanks to high content of soybean oligosaccharides (SOS), can lupine be used as a source of prebiotics. The hypothesis was that lupine seeds contain SOS with prebiotic efect. The aim of the study was to evaluate the presence of SOS in lupine and testing the growth of intestinal bacteria on these oligosaccharides. First, SOS were determined in selected crops using enzymatic test Megazyme®. SOS were extracted and isolated from three varieties of white lupin (Amiga, Dieta and Zulika). The growth of pure bifidobacterial strains was testing on SOS. Finaly, hens were fed with lupin and the composition of the caecal microbiota was evaluated by culturing. Animals were separated into 5 groups and fed with differents feed mixtures. In mixtures soybean extracted was replaced with different amount and different form of a lupine scrap. Total anaerobic bacteria, bifidobacteria, lactobacilli, enterococci and *Escherichia coli* were enumerated by selective agars. It demonstrated that lupin contains SOS in higher level (8,26 ± 0,14 g RSO/100 g lupin seeds) than other testing crops (soy: 6,96 ± 0,21 g RSO/100 g scrap, rape seeds: 1,79 ± 0,14 g RSO/100 g scrap, sunflower seeds: 1,73 ± 0,26 g RSO/100 g scrap). SOS from lupin were isolated in sufficient amount for further experiment with pure bifidobacteria. SOS from lupine stimulated the growth of some bifidobacteria (mainly *B. longum* ATCC15707). There were no significant differences ($P < 0.05$) in the composition of the intestinal microbiota depending on the feed mixtures in the hens feeding experiment. No negative impact was observed in the composition of the intestinal microbiota after the consumption of lupin. Lupin had the same prebiotic effect as soya. The bifidogenic effect was also confirmed in the experiment with pure bifidobacteria cultures. We can conclude, that soy in feed mixtures for hens could be replased with lupin. Lupin can be also used as good source of prebiotics for human.

Keywords: lupin, prebiotic, soybean oligosaccharides, bifidobacteria, nutrition

Obsah

1 Úvod **9**

2 Vědecká hypotéza a cíle práce **10**

3 Literární rešerše **11**

3.1 Trávicí trakt **11**

3.1.1 Trávicí trakt člověka 11

3.1.2 Trávicí trakt slepic 12

3.2 Mikrobiota trávicího traktu **13**

3.2.1 Střevní mikrobiota člověka 14

3.2.2 Střevní mikrobiota slepic 16

3.3 Probiotika **18**

3.4 Prebiotika **21**

3.5 Synbiotika **23**

3.6 Prebiotické oligosacharidy **24**

3.6.1 Fruktooligosacharidy (FOS) 24

3.6.2 Galaktooligosacharidy (GOS) 24

3.6.3 Xylooligosacharidy (XOS) 25

3.6.4 Oligosacharidy rafinózové řady (RSO) - Sójové oligosacharidy (SOS) 25

3.6.5 Isomaltooligosacharidy (IMO) 27

3.6.6 Laktulóza 27

3.6.7 Oligosacharidy mateřského mléka (OMM) 27

3.7 Prebiotické polysacharidy – inulin **28**

3.8 Zdroje prebiotických oligosacharidů **29**

3.8.1 Sója 29

3.8.2 Lupina 31

3.8.2.1 Lupina bílá a její odrůdy 31

3.8.2.2 Využití lupiny 33

4 Metodika **35**

4.1 Stanovení množství oligosacharidů rafinózové řady ve vybraných hospodářských plodinách **35**

4.2 Extrakce prebiotických oligosacharidů z mouky lupiny **35**

4.3 Kultivace bakterií na oligosacharidech vyextrahovaných z lupiny **35**

4.3.1 Kultivace vybraných bakterii na mikrotitrační destičce 36

4.3.2 Kultivace vybraných bakterii na Petriho miskách 37

4.4 Kultivace bakterií ze slepého střeva nosnic **38**

5 Výsledky **42**

5.1 Stanovení množství oligosacharidů rafinózové řady ve vybraných hospodářských plodinách **42**

5.2 Extrakce oligosacharidů rafinózové řady z mouky lupiny..... 42
5.3 Kultivace bakterií na oligosacharidech extrahovaných z lupiny..... 43
5.4 Kultivace bakterií ze slepého střeva nosnic..... 47

6 Diskuze..... 49

7 Závěr..... 56

8 Literatura..... 57

9 Samostatné přílohy I

1 Úvod

Zdraví a dobrá fyzická kondice je v dnešní době velmi diskutovaným tématem. Obzvláště dnes, kdy lidstvo ve vyspělých státech trpí četnými civilizačními nemocemi jako je obezita, vysoká hladina cholesterolu, vysoký krevní tlak, cukrovka, zácpa nebo karcinom tlustého střeva. Ke zdravé a vitální kondici člověka a obecně živočichů neodmyslitelně patří zdravý zažívací trakt, který umožňuje přijímat potřebné živiny a vylučovat z těla škodlivé látky.

Většina lidí ví o podstatě probiotik jako takových, ale už méně lidí je obeznámeno s důležitostí prebiotik, která probiotika vyživují a napomáhají tak k udržení rovnováhy střevní mikrobioty.

Zdrojem prebiotik jsou různé oligosacharidy a neškrobné polysacharidy, které můžeme nalézt např. v kořenech čekanky (inulin), semenech hrachu, sóji nebo lupiny. Problém u hrachu či sóji je vysoké procento antinutričních látek, které se v dnešních odrůdách lupiny vyskytují v menší míře nebo se nevyskytují vůbec. Lupina by tudíž mohla být vhodnějším zdrojem prebiotik.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Pro úpravu rovnováhy intestinální mikrobioty a podporu rozvoje bifidobakterií v trávicím traktu je doporučována konzumace prebiotik. Jako prebiotika jsou často používány oligosacharidy. Bylo prokázáno, že výrazný bifidogenní efekt mají oligosacharidy rafinózové řady, které jsou obsaženy zejména v luštěninách. Předpokládáme, že lupina obsahuje oligosacharidy rafinózové řady (RSO), které budou podporovat růst probiotických bakterií.

Cíle práce: Cílem diplomové práce bylo stanovení oligosacharidů rafinózové řady v lupině, izolace RSO a testování růstu střevních bakterií v přítomnosti těchto oligosacharidů v podmínách *in vitro*. Dalším cílem bylo zhodnotit vlivu náhrady sóji v krmné dávce lupinou na složení mikrobioty slepých střev nosnic.

3 Literární rešerše

3.1 Trávicí trakt

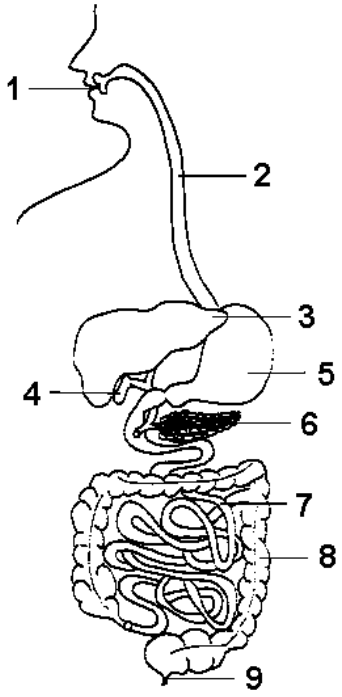
Trávicí trakt zajišťuje příjem a zpracování potravy tak, aby mohla být co nejlépe a nejefektivněji využívána. Proto je důležité, aby byl trávicí trakt zdravý a správně fungoval. Každý organismus má stavbu a fyziologii trávicího traktu odlišnou. Důvodem jsou odlišné stravovací návyky a způsob života organismu (Solař 2010).

3.1.1 Trávicí trakt člověka

Trávicí trakt člověka (Obr. 1.) začíná dutinou ústní (*cavitas oris*), pokračuje jícnem (*oesophygus*), žaludkem (*gaster*), tenkým střevem (*intestinum tenue*), tlustým střevem (*intestinum crassum*) a končí konečníkem (*rectum intestinum*). Všechny tyto části slouží k trávení, vstřebávání živin a vylučování nestrávených zbytků. Součástí trávicího traktu jsou i slinné žlázy (*glandula salivaria*), játra (*hepar*), žlučník (*venisa fallea*) a slinivka břišní (*pankreas*), které vytvářejí enzymy a žlučové kyseliny napomáhající k trávení potravy (Marieb & Mallat 2005).

Nejdůležitějšími funkcemi dutiny ústní jsou příjem potravy, mělnění potravy, vnímání chuti a smíchání potravy se slinami, které vylučují slinné žlázy. Díky přítomnosti trávicího enzymu α-amyláze ve slinách (ptyalin) slouží sliny k primárnímu štěpení sacharidů a zároveň se díky mucinu jídlo obalí a sousto se tak stává kompaktnější. Sousto se poté dostává přes hltan (*fauces*), hrtan (*pharynx*) a jícen do žaludku. V žaludku se sousto smíchá s žaludečním šťávami obsahujícími kyselinu chlorovodíkovou a pepsin, který slouží k trávení bílkovin. Trávenina dále putuje do tenkého střeva, které se rozděluje na 3 části: dvanáctník (*duodenum*), lačník (*jejunum*), kyčelník (*ileum*). Ve dvanáctníku se trávenina mísí s enzymy slinivky břišní a žlučí. Slinivka břišní tvoří trávicí enzymy trypsin, chymotrypsin, lipázy a α-amylázu, které slouží k trávení bílkovin, tuků a sacharidů. Játra vytváří žluč, která se hromadí ve žlučníku. Žluč slouží k rozdělení kapek tuku na malé kapénky, aby byl tuk lépe dostupný pro lipázy. Kyčelník ústí do tlustého střeva. Tlusté střevo je děleno na 5 částí: slepé střevo (*intestinum caecum*), vzestupný (*colon ascencens*), příčný (*colon transversum*), sestupný tračník (*colon descendens*) a esovitá klička (*colon sigmoideum*). Tlusté střevo slouží na rozdíl od střeva tenkého, které vstřebává živiny, hlavně ke vstřebání přebytečné vody ve stolici zpět do těla. Přes stěnu tlustého střeva se dokáží vstřebat i minerální látky a některé metabolity vzniklé činností střevní mikrobioty. V tlustém střevě také dochází vlivem střevní mikrobioty ke štěpení některých

nestrávených zbytků např. rozpustné vlákniny. Tlusté střevo je u člověka místo s nejintenzivnější mikrobiální činností (Marieb & Mallat 2005; Solař 2010).

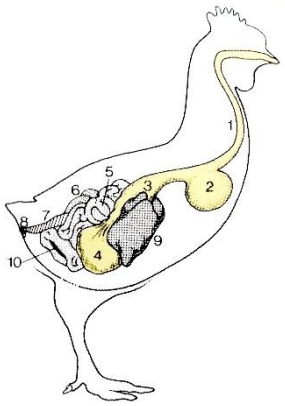


Obrázek 1: Trávicí soustava člověka: 1 ústa, 2 jícen, 3 játra, 4 žlučník, 5 žaludek, 6 slinivka břišní, 7 tenké střevo, 8 tlusté střevo, 9 konečník (http://www.materialy-do-skoly.cz/maturitni-otazky/biologie/travici-soustava-cloveka/)

3.1.2 Trávicí trakt slepic

Stavba trávicího traktu slepic (Obr. 2) se velmi podobá trávicímu traktu člověka, ale nalezneme zde několik odlišností. Trávicí trakt slepic na rozdíl od člověka začíná zobákem (*rostrum*), který slouží pouze k příjmu potravy. Jazyk drůbeže obsahuje pouze malý počet chuťových pohárků, tudíž si potravu vybírají pouze podle vzhledu (velikost, tvar, tvrdost a barva krmiva). Slepičí trakt se od lidského trávicího traktu také liší tím, že navíc obsahuje vole, vychlípeninu jícnu, které slouží k uchování a zvlhčení přijaté potravy, kde se potrava mísí se slinami a částečně se tráví. Ve voleti slepic dochází také k mikrobiálnímu štěpení živin vlivem bakterií, především laktobacilů a bifidobakterií, které se zde nacházejí (Smith 1965). Žaludek se rozděluje na dvě části. Ve žláznatém žaludku (*proventriculus, pars glandularis*) se potrava míchá s trávicími enzymy (pepsinem) a kyselinou chlorovodíkovou, a ve svalnaté části (*ventriculus, pars muscularis*) se potrava mělní. Svalnatý žaludek tak zastává funkci zubů. K lepšímu rozmělnění potravy je proto nutné, aby slepice polykaly drobné kaménky ve formě gritu, které pomáhají potravu rozmělnit. Trávicí trakt dále pokračuje střevem tenkým. Vývody slinivky břišní a žlučníku se na rozdíl od savců, u kterých vývody ústí téměř na začátku

dvanáctníku, napojují až ve vzdálenější části tenkého střeva. Tlusté střevo je v porovnání s tlustým střevem člověka kratší a obsahuje klky, díky kterým je schopné vstřebávat živiny. Vstřebávání živin je zde ovšem poloviční než u střeva tenkého. Slepice má také navíc dvě dlouhá slepá střeva, které jsou obsazena specifickou mikrobiotou. Zde probíhá mikrobiální trávení např. vlákniny, při kterém vznikají těkavé mastné kyseliny (kyseliny octová, máselná, propionová a některé vitamíny). Trávicí trakt končí kloakou (*cloaka*), což je společný vývod trávicí, vylučovací a pohlavní soustavy (Estermann 2013; Zelenka 2015).



Obrázek 2: Trávicí soustava slepic: 1 jícen, 2 vole, 3 žláznatý žaludek, 4 svalnatý žaludek, 5 tenké střevo, 8 kloaka, 9 játra, 10 slinivka břišní (Estermann 2013).

3.2 Mikrobiota trávicího traktu

Mikrobiota je pro trávicí trakt velmi důležitá. Slouží jako bariera proti patogenům, obsazuje potenciální vazebná místa na střevní výstelce, a tím zabraňuje k uchycení nežádoucích bakterií. Zároveň fermentuje zbytky nestrávené potravy a vytváří tak látky důležité pro organismus, které působí na prokrvení střevní mukózy, stimuluje imunitní střevní systém, redukuje průchod bakterií z trávicího traktu do těla a produkuje vitamíny (Zbořil et al. 2005).

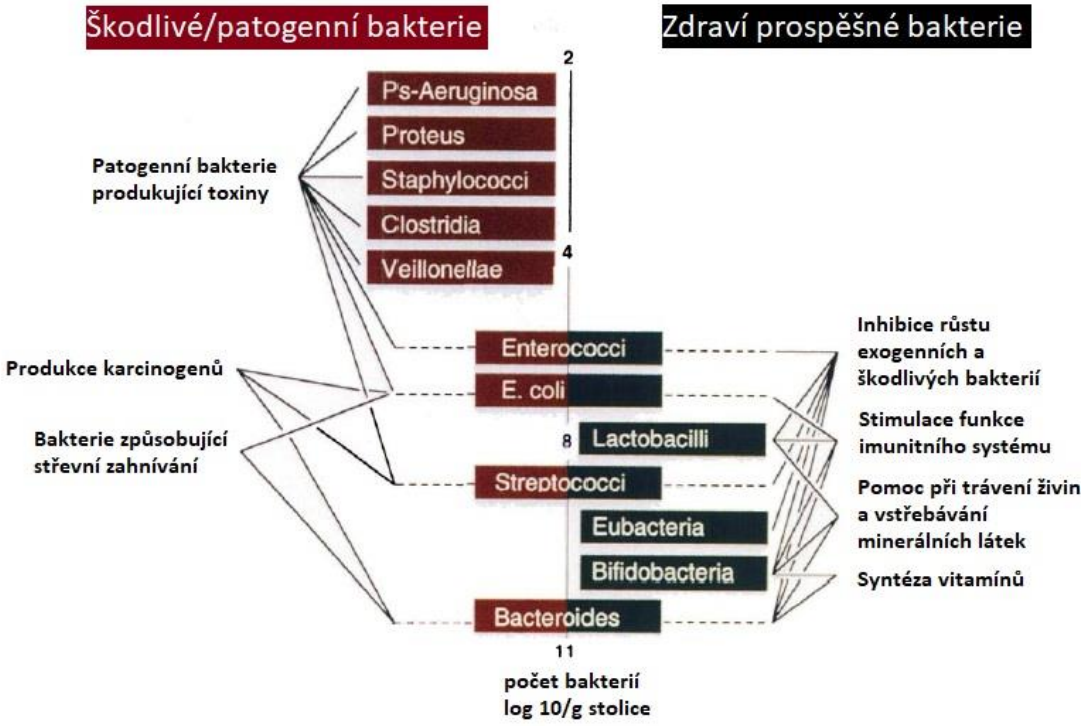
Z mikrobiologického hlediska je tlusté střevo obecně nejosídlenější část trávicího traktu (Macfarlane & Cummings 1991), viz Tabulka 1. Mikrobiota v tlustém střevě je velmi rozmanitá a můžeme zde nalézt více než 1000 druhů mikroorganismů. Skladba se mění dle stravovacích návyků hostitele. Její složení je tudíž hostitelsky specifické a mění se během života jedince (Ventura et al. 2009).

Tabulka 1: Přibližné počty bakterií (log KTJ*/g) v různých částech trávicího traktu různých živočišných druhů (Hill 1995; Torok et al. 2011; Zelenka 2015).

	Člověk	Potkan	Prase	Myš	Králík	Drůbež
Ústní dutina	**7-8**	**7-8**	**7-8**	**7-8**	**7-8**	**-**
Žaludek	**<3**	**7**	**6-7**	**7**	**4**	**-**
Lačník	**<3**	**7**	**8**	**7**	**4**	**9**
Kyčelník	**5**	**8**	**10**	**8**	**8**	**-**
Tlusté střevo	**11**	**11**	**11**	**11**	**11**	**11**

* KTJ = kolonie tvořící jednotky

Bakterie vyskytující se ve střevech se rozdělují na patogenní, podmíněně patogenní a zdraví prospěšné bakterie (Obr. 3) (Gibson & Roberfroid 1995).



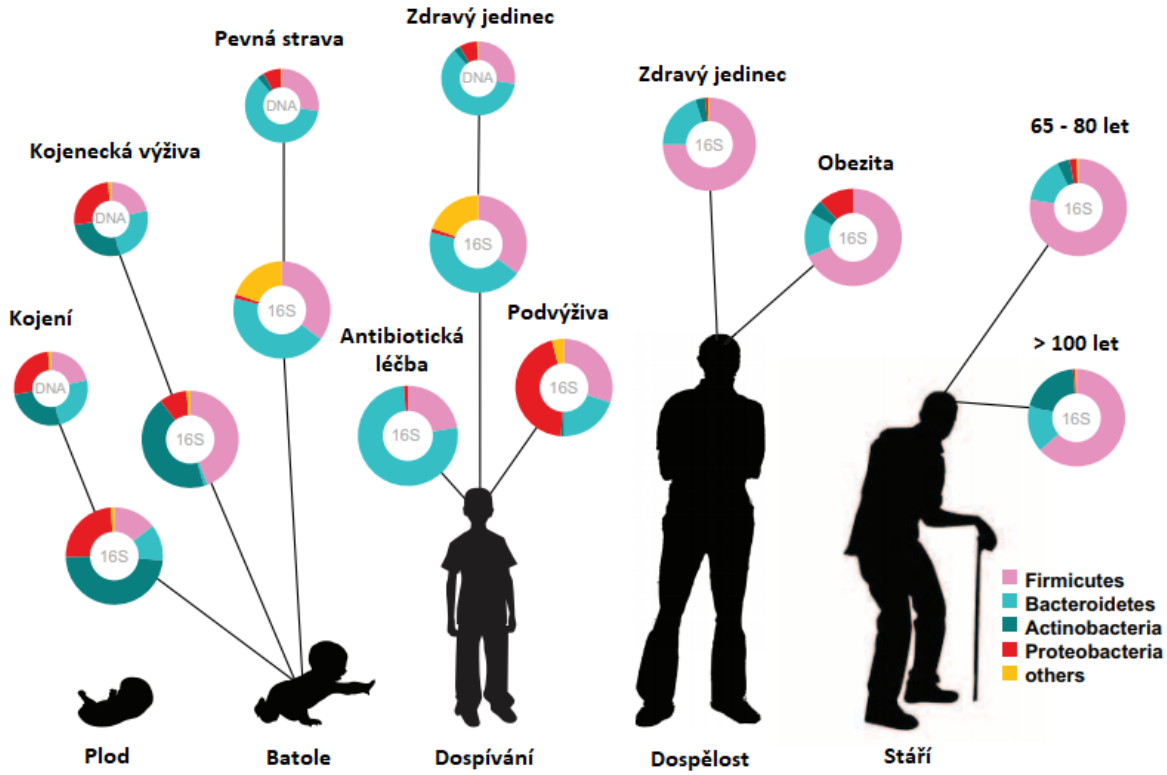
Obrázek 3: Přehled škodlivých/patogenních bakterií a zdraví prospěšných bakterií, jejich počtu v távicím traktu člověka a zdravotních účinků jednotlivých rodů bakterií (upraveno podle: Gibson & Roberfroid 1995).

3.2.1 Střevní mikrobiota člověka

V dnešní době je mikrobiota pokládána za samostatný „orgán“, který je součástí těla živočichů a ovlivňuje dokonce i chování jedince. Lidské tělo obsahuje cca 10^3 buněk a 10^4

mikroorganismů. Celková hmotnost těchto organismů je přibližně 1,4 kg. Složení střevní mikrobioty zdravého člověka je velmi specifické (Blaser 2015).

V dřívějších studiích bylo uváděno, že trávicí trakt plodu neobsahuje žádné mikroorganismy a že ke kolonizaci dochází až v momentě porodu, kdy jsou mikroorganismy z matky přeneseny na novorozeně (Solař 2010). Poslední studie však ukazují, že trávicí trakt plodu může být kolonizován už v děloze prostřednictvím plodové vody a placenty, které obsahují bakterie z kmene *Proteobacteria* (Collado et al. 2016; Perez-Muñoz et al. 2017). K masivní kolonizaci trávicího traktu dochází během porodu. Složení střevní mikrobioty pak závisí zejména na způsobu porodu. Děti porozené vaginálně mívají složení střevní mikrobioty jednodušší a dominují bifidobakterie, u dětí rozených císařským řezem je mikrobiota mnohem pestřejší. O dalším složení rozhoduje způsob výživy. Díky velké konzumaci mateřského mléka, které obsahuje vysoké množství specifických oligosacharidů, mají kojenci ve střevech jako dominantní skupinu bifidobakterie, které jsou těmito oligosacharidy podporovány (Woodsmansey 2007). Některé studie také uvádí, že mateřské mléko samotné obsahuje bakterie mléčného kvašení hlavně *Lactobacillus gasseri* a *Enterococcus faecium*. Otázkou je, zdali tyto bakterie nemají endogenní původ a do mléka se nedostávání jako kontaminanty z okolí kůže prsu (Martín et al. 2003; Collado et al. 2016). Pokud nejsou děti kojeny a jsou vyživovány mléčnými náhradami, složení střevní mikrobioty je oproti plně kojeným dětem daleko rozmanitější. Kolem druhého roku života se začíná složení mikrobioty podobat mikrobiotě dospělého jedince (Frühauf 2011). Dospělí mají na rozdíl od kojenců více bakterií patřících do kmenů *Bacteriodetes, Firmicutes a Proteobacteria* (Ventura et al. 2009). Složení střevní mikrobioty se během života člověka mění. Diverzita mikrobioty se začíná v seniorském věku člověka zmenšovat (Woodsmansey 2007). Senioři mají v trávicím traktu méně bakterií patřící do kmene *Bacteriodetes* a *Proteobacteria*, a více bakterií *Firmicutes* (Obr. 4) (Ottman et al. 2012).



Obrázek 4: Změna složení střevní mikrobioty u člověka během života (upraveno podle: Ottman et al. 2012).

Složení mikrobioty je také závislé na stravování jedince. Do lidského tlustého střeva se denně dostane cca 20 až 60 g sacharidů ve formě vlákniny nebo poly a oligosacharidů, 5 až 20 g proteinů (Macfarlane & Cummings 1991) a 3,5 g tuku (Priebe et al. 2002). Jelikož je sacharolytické štěpení pro bakterie energeticky výhodnější, jsou v první části tlustého střeva nejprve štěpeny nestrávené sacharidy (Van Loo 2004). V další části převažují spíše proteolytické bakterie (Macfarlane & Cummings 1991). Při štěpení sacharidů, vznikají mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), jako jsou např. kyselina octová, máselná či propionová, což vede ke snížení pH v tlustém střevu a ke zlepšení absorpce minerálních látek (Geigerová et al. 2014).

Složení lidské a drůbeží mikrobioty se díky odlišné stavbě trávicímu traktu, ale i rozdílným stravovacím návykům, liší.

3.2.2 Střevní mikrobiota slepic

Počet bakterií mikrobioty u slepic v trávicím traktu přesahuje též desetinásobek počtu buněk v těle. Mikrobiální osídlení střev nastává po vylíhnutí jedince. První den po vylíhnutí počet mikroorganismů v lačníku kuřat čítá 10^8 a ve slepých střevech 10^{10} bakterií v 1 g

tráveniny. Počet mikroorganismů v trávicím traktu kuřat se během prvních dní života zvyšuje. Už po třech dnech dosahuje počet bakterií v lačníku 10^9 a slepých střevech přesahuje hodnotu 10^{11} bakterií na 1 g tráveniny. Mikrobiota se také během života drůbeže mění. V lačníku se složení mikrobioty ustaluje během prvních 14 dnů a ve slepých střevech po 30 dnech života (Zelenka 2015).

Kuřata mají na rozdíl od dětí v trávicím traktu více laktobacilů. Dominantními druhy bakterii u dospělých slepic jsou kmeny rodu *Clostridium, Ruminococcus, Lactobacillus a Bacteroides* (Torok et al. 2011). Nejvíce bakterií se vyskytuje ve slepých střevech a výkalech drůbeže, kde dominují nesporulující anaerobní bakterie a anaerobní streptokoky. Nejméně osídlená část trávicího traktu je z důvodu velmi nízkého pH (pH 1-2) v oblasti žaludku (Tab. 2). Mezi patogenní mikroorganismy u kuřat patří zejména salmonely, koliformní bakterie (zejména rody *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia, Klebsiella* a *Escherichia*), kampylobaktery, *Clostridium perfingens,* mykobakterie a *Listeria*. Tyto mikroorganismy způsobují nemoci a mortalitu zvířat. Dokáží se také z trávicího traktu dostat do svaloviny či jiných orgánů a způsobit tak kontaminaci masa a vnitřností určených ke konzumaci člověkem (Skřivanová & Čermák 2017).

Tabulka 2: Počty nejčastějších mikroorganismů v trávicím traktu kuřat (upraveno podle: Smith 1965).

Bakteriální kmeny	**Počet mikroorganismů (Log10)**							
	Vole	**Svalnatý žaludek**	**Tenké střevo**				**Slepá střeva**	**Výkaly**
			1. část – dvanáctník před vyústěním slinivky břišní a žlučníku	2. část – dvanáctník po vyústěním slinivky břišní a žlučníku	3. část – lačník	4. část – kyčelník		
E. coli	1,7	-	2	1,7	1,7	2,7	5,6	6,1
Clostridium	-	-	-	-	-	-	9	2
Enterokoky	4	3,7	4	4	3,7	4,2	6,7	6,5
Laktobacily	8,7	7,3	8	8,2	8,2	8,6	8,7	8,5
Kvasinky	2,7	-	1,7	-	1,7	-	2	1,7
Nesporulující anaerobní bakterie	-	-	-	-	-	-	10	9
Anaerobní streptokoky	-	-	-	-	-	-	10	8,7

Produkty vznikající bakteriální fermentací sacharidů a dusíkatých látek ve slepých střevech zajišťují kuřatům 3-5 % a u dospělých jedinců 11 % celkové potřeby energie. Důležité je pro zdravý trávicí trakt drůbeže složení krmné dávky, jelikož osídlení mikrobioty střev je velmi snadno a relativně rychle ovlivnitelné (Zelenka 2015).

Složení střevní mikrobioty lze ovlivnit pomocí probiotik a prebiotik.

3.3 Probiotika

Slovo probiotikum pochází z řeckého slova „pro bios“ v překladu „pro život“ (Gismondo et al. 1999) a bylo poprvé použito Lilly a Stillwellem (1965).

Dle Světové zdravotnické organizace (World Health Organization – WHO) a Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization – FAO) jsou probiotika nepatogenní mikroorganismy, přirozeně se vyskytující v tlustém střevu, které díky své činnosti

napomáhají ke stabilitě střevní mikroflóry, mají blahodárné účinky na zdraví a napomáhají při prevenci a léčbě různých chorobných stavů (WHO 2001).

Fuller (1992) stanovil podmínky, které musí bakterie splňovat, aby mohly být jako probiotika využitelná. Musí být schopná růst ve velkém měřítku, měly by být při skladování životaschopné a stabilní, žít přirozeně ve střevním ekosystému a musí být prospěšný pro zdraví hostitele.

Jako příklad probiotik si můžeme uvést bakterie rodu *Lactobacillus, Bifidobakterium, Bacillus* nebo *Pediococcus*, které společně chrání organismus hostitele proti patogenním organismům a posilují jeho imunitu (Soccol et al. 2010). V tabulce 3 jsou uvedeny mikroorganismy, které jsou v této době za probiotika považována.

Tabulka 3: Mikroorganismy považované za probiotika (Frühauf 2011).

Lactobacilus	**Bifidobacterium**	**Ostatní**
Acidophillus	*Adolescentis*	*Bacillus cereus*
Amylovarus	*Bifidum*	*Enterococcus fecalis*
Casie	*Breve*	*Enterococcum faecium*
Crispatus	*Infantis*	*Escherichia coli*
Delbruckii	*Lactis*	*Lactococcus lacti*
Gallinarum	*Longum*	*Leuconostoc mesenterioides*
Gasseri		*Pediococcus acidilactici*
Johnsonii		*Propionibacterium freudenraichii*
Paracasei		*Sacharomyces boulardi*
Plantarum		*Sacharomyces cerevisiae*
Reuteri		*Sporolactibacillus inulinus*
Rhamnousus		*Streptococcus thermophillus*

Za nejčastějšími lidská probiotika jsou považovány biffidobakterie (*Bifidobacterium longum, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium adolescenti*) a laktobacily (*Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei* a *Lactobacillus rhamnosus*) (Vlková et al. 2004; Gibson et al. 2004).

Vztah mezi zdraví prospěšnými mikroorganismy v tlustém střev2 a patogeny je velmi úzký. Pokud se tato rovnováha naruší, spěje to rychle k rozmnožení patogenu a dále k následným problémům (Sarkar 2013).

Probiotika můžeme nalézt jak v mléčných výrobcích, jako jsou fermentované mléko, kefír nebo jogurt (Hosono 1992; Metchnikoff 2004), tak i ve výrobcích bezmléčných. Prodávají se také jako doplňky stravy v podobě kapslí a často jsou přidávána do kojeneckých výživ (Soccol et al. 2010).

Probiotika jsou pro zdraví organizmu velmi důležitá díky jejich schopnosti vytvářet antimikrobiální látky, které dokáží v tlustém střevě omezovat rozvoj patogenních organizmů a zabraňují k jejímu uchycení na stěnu tlustého střeva. Mezi další funkce probiotik patří ovlivnění hodnoty pH v tlustém střevě tak, aby měly samy vhodné podmínky pro množení a růst, čímž ovlivňují a redukují složení kolonizace střevní mikrobioty. Stimulují také fagocytózní děje a tvorbu imunitních protilátek. Souhrnem všech těchto vlastností tedy napomáhají proti zácpě, průjmům, zánětům a karcinomům tlustého střeva a posilují imunitu hostitele (Rada 2010).

Díky jejich schopnosti omezovat růst patogenů v trávicím traktu organismu se v posledních letech u hospodářských zvířat hledají probiotika jako náhrada za krmná antibiotika. Antibiotika v chovu hospodářských zvířat zajišťovala menší úmrtnost, větší konverzi krmiva a rychlejší růst zvířat. Nevýhodou používání antibiotik ve výkrmu zvířat je zvyšující se rezistence bakterií a rezidua antibiotik v mase (Rada & Marounek 2005). U drůbeže se jako probiotika nejčastěji využívají mikroorganismy rodu *Lactobacillus, Streptococcus, Bacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, Aspergillus, Candida,* a *Saccharomyces* (Lutful Kabir 2009). Za nejdůležitější probiotikum je u drůbeže považován *Lactobacillus johnsonii*, který eliminuje růst patogenu *Clostridium perfingens* způsobující nekrotickou enteritidu. Tato bakterie ve střevech vytváří toxiny, které poškozují střevní sliznici a drůbež tak následně nepřibývá na váze. Pokud je takto napadená drůbež konzumovaná člověkem může dojít i k intoxikaci konzumenta (Bezpečnostpotravin 2004). Rada & Švejstil (2016) zjistili, že jako probiotické bakterie lze potenciálně využít i netradiční bakterii *Clostridium butyricum* CBM 588, která pozitivně ovlivňuje prostřední v trávicím traktu drůbeže a zvyšuje tak jejich užitkovost.

Na internetových stránkách lze nalézt několik firem, které prodávají probiotické přípravky pro zvířata. Příkladem může být přípravek BioPlus určený pro prasata a drůbež, který je složen ze směsi sporotvorných *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* (Ježková 2012) nebo Biovitax-pro, který kombinuje probiotické bakterie *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus rhamnosus* společně s prebiotiky (inulin) (Hradský 2019).

3.4 Prebiotika

Prebiotika jsou nestravitelné látky, které jsou selektivně metabolizovány střevními bakteriemi a tím prospívají ke zdraví hostitele (Gibson et al. 2004). Jsou to většinou neškrobové polysacharidy (inulin) nebo oligosacharidy (Roberfroid et al. 2010).

Poprvé prebiotika popsali Gibson & Roberfroid (1995) jako oligosacharidy, které jsou rezistentní proti kyselosti žaludku, enzymům trávicího traktu a nejsou absorbovatelné v tenkém střevě. Tudíž jsou pro člověka nestravitelné. Tyto oligosacharidy jsou fermentovány v tlustém střevě pomocí střevních bakterií (i probiotických) na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA – short-chainfatty acid) a plyny (Van Loo et al. 1999).

Ideálně by prebiotika měla být fermentována selektivně, tzn. že různá prebiotika by měla být štěpena specifickými probiotiky (Roberfroid 2007).

V tabulce 4 jsou uvedeny podmínky, které musí sacharidy dodržet, aby mohly být v dnešní době považovány za prebiotika. Mají být pro člověka nestravitelné, selektivně fermentovatelné a mít pozitivní účinky na zdraví člověka. Selektivní fermentace musí být pozorována jak v *in vitro,* tak v *in vivo* prostředí (zvířecí trávicí trakt, lidský trávicí trakt) (Preter & Verbeke 2015).

Prebiotika můžeme nalézt v ovoci, zelenině, luštěninách či cereáliích. V dnešní době jsou již vyráběny i průmyslově (Bláha & Víšek 2011).

Tabulka 4: Prebiotický efekt oligosacharidů (upraveno podle: Preter & Verbeke 2015)

	Nestravitelný	**Selektivní fermentace**			**Prebiotika**
		in vitro	**zvířata**	**lidé**	
Laktulóza	+	+	+/-	+	Ano
Fruktooligosacharidy (FOS)	+	+	+	+	Ano
Galaktooligosacharidy (GOS)	+	+	+	+	Ano
Xylooligosacharidy (XOS)	+	+	+	+	Ano
Isomaltooligosacharidy (IMOS)	-	+	+	+/-	Ne
Arabinoxylanoligosacharidy (AXOS)	+	+	+	+	Ano
Inulin	+	+	+	+	Ano

(+) efekt byl prokázán v několika studiích, (+/-) k dispozici jsou jen omezená data, (-) nepotvrzená data

Prebiotika mají příznivé účinky na organismus. Hlavní funkcí prebiotik je to, že slouží jako zdroj uhlíku a energie pro probiotika. Uvolněnou energii probiotika následně využívají

ke stimulaci svého růstu a množení. Prebiotika mají také imunologické účinky, kdy dochází k aktivaci leukocytů v tlustém střevu, zvyšuje se počet buněk v Peyerových plátech, dochází k podpoře produkce bakteriocinů probiotickými bakteriemi proti patogenním bakteriím a v tenkém střevu se zvyšuje hladina IgA. Mezi další funkce patří posílení bariery střeva, acidifikace v tlustém střevu, podpora absorpce vody a sodíku a zlepšení dostupnosti vápníku a hořčíku (Bláha & Víšek 2011).

Výsledky studie Silk et al. (2009) ukazují, že prebiotika jako jsou galaktooligosacharidy mohou pomoci při zmírnění symptomů syndromu dráždivého tračníku (**I**rritable **B**owel **S**yndrome – IBS).

Pomocí prebiotik je možné zvýšit počet přirozeně se vyskytujících a pozitivně působících střevních bakterií. Prebiotika se dají tedy využít stejně jako probiotika ve výkrmu zvířat na posílení imunity místo antibiotik. Poznatky o prebioticích jsou podstatně mladší než o probioticích. Prebiotika jsou však v poslední době více zkoumaná. Důvodem zvýšeného zájmu o prebiotika je, že se jedná o chemické látky, a ne živé organizmy, tudíž jsou více odolná vůči vnějším vlivům, jsou přirozenou součástí potravy a jsou levnější. Probiotika jsou živé organismy citlivé na jakékoli fyzikálně-chemické změny. Prebiotika jsou odolnější a jejich chemická struktura se za správného skladování nemění (Preter & Verbeke 2015). Rada & Marounek (2005) uvádí, že příkladem prebiotických sacharidů, které můžou sloužit jako náhrada určitých antibiotik, jsou mannanoligosacharidy. Pozitivní výsledky byly také pozorovány při podávání fruktooligosacharidů do krmné dávky kuřat, které zapříčinily vyšší nárůst zdravý prospěšných bakterií a snížili tak počet patogenních bakterií v trávicím traktu drůbeže (Shang et al. 2018). Bifidogenní účinek byl pozorován i u galaktooligosacharidů a oligosacharidů rafinosové řady (Touhy et al. 2005; Mitsuoka 1992). Sevim et al. (2019) pozorovali větší růst kmenů přítomných v jogurt *Lactobacillus plantarum* ATCC10697, *Bifidobacterium animalis* ATCC27672 a *Bifidobacterium bifidum* ATCC35914 po přidání inulinu. Morgan et al. (2019) zjistili, že arabinoxylooligosacharidy (AXOS) mají potenciál být účinným prebiotikem ve střevě brojlerů kuřat.

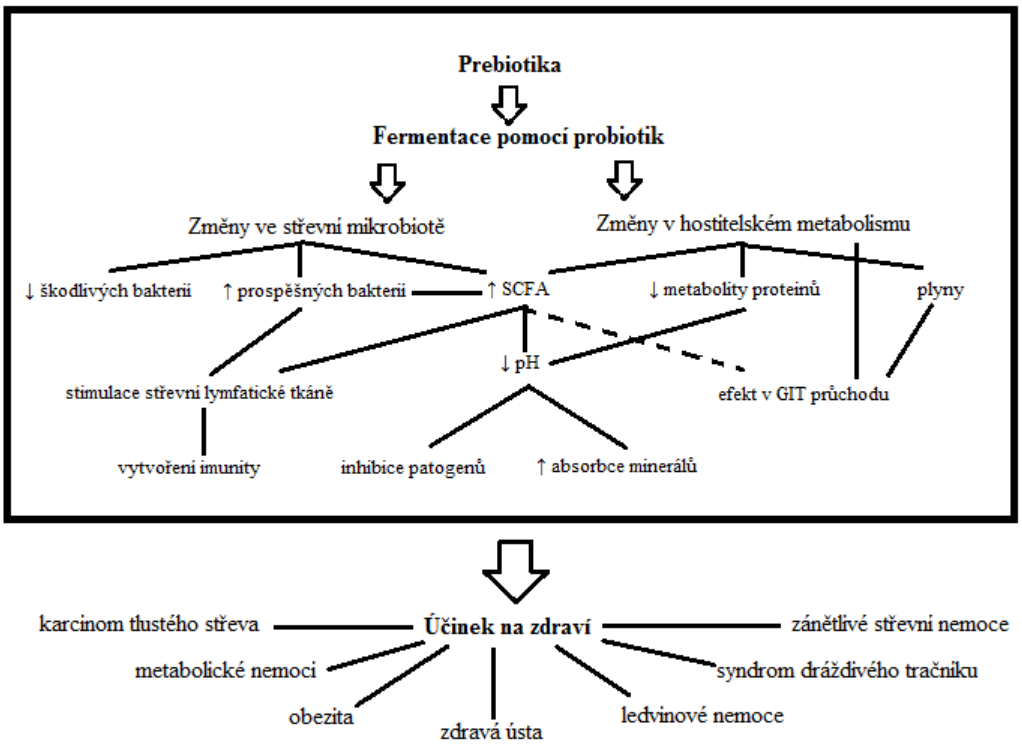
Rizikem při podávání samotných prebiotik je nedostatečný počet probiotických mikroorganismů a následná flatulence a průjmy. Další nevýhodou podávání samotných prebiotik do krmných dávek zvířat, je to, že nemusí selektivně působit jen na pozitivně působící bakterie, ale že mohou vyživovat i nežádoucí bakterie ve střevech. Proto je dobré podávat prebiotika společně s probiotiky tzv. synbiotika (Preter & Verbeke 2015).

3.5 Synbiotika

Synbiotika je kombinace probiotik a prebiotik (Tuohy et al. 2005). Prebiotika podporují funkci probiotik a společně tak napomáhají k udržení rovnováhy mikrobioty v gastrointestinálním traktu (GIT). Zároveň prebiotika probiotika vyživují (Kolida & Gibson 2011).

Výhodou synbiotik je zejména to, že prebiotika v kombinaci s probiotiky společně vytváří změny v metabolismu a střevní mikrobiotě hostitele. Snižují počet škodlivých bakterií a metabolitů proteinu a zvyšují SCFA a bakterie prospěšné pro hostitele. Tím se stimuluje funkce střevní lymfatické tkáně a podporuje imunitní systém jedince. Snižuje se pH ve střevech, což podporuje inhibici patogenů a zvyšuje absorpci minerálních látek pomocí tlustého střeva. Vedlejšími produkty jsou plyny, které vznikají při štěpení zbytků proteinu a oligosacharidů (Obr. 5).

Rios de Souza et al. (2015) uvádí, že synbiotika napomáhají proti střevní infekci, posilují imunitu, působí pozitivně proti obezitě a snižují riziko rakoviny tlustého střeva.



Obrázek 5: Přehled účinků synbiotik na lidský organismus (Preter & Verbeke 2015).

3.6 Prebiotické oligosacharidy

Oligosachacharidy jsou sacharidy, které se skládají z dvou až deseti molekul monosacharidu. Mezi prebiotické oligosacharidy řadíme fruktooligosacharidy (FOS), galaktooligosacharidy (GOS), xylooligosacharidy (XOS), isomaltooligosacharidy (IMO), oligosacharidy rafinózové řady (RSO), laktulózu a oligosacharidy mateřského mléka (OMM) (Charalampopoulos & Rastall 2012; Musilová & Rada 2015).

3.6.1 Fruktooligosacharidy (FOS)

Fruktooligosacharidy jsou krátké řetězce fruktózy (3 - 7 molekul), které jsou díky β-glykosidické vazbě, β(1, 2), pro člověka nestravitelné. V některých rostlinách se vyskytují přirozeně. Vyrábí se enzymatickou hydrolýzou inulinu (Roberfroid et al. 2010) nebo syntézou ze sacharózy pomocí fruktosylfuranosidázy (Rudolfová & Čurda 2005).

Fruktooligosacharidy se dělí na GF_n typ a F_n typ (G = glukosa, F = fruktosa a n = počet jednotek fruktosy). GF_n typ tedy představuje fruktooligosacharidy skládající se z molekul fruktózy zakončený molekulou galaktózy. F_n typ jsou fruktooligosacharidy složené pouze z molekul fruktózy (Bohačenko & Pinkrová 2014).

Pozitivní účinky na člověka jsou pozorovány při dávce 2 až 10 g fruktooligosacharidů na den (Rudolfová & Čurda 2005).

Fruktooligosacharidy působí proti průjmům a dají se koupit jako doplňky stravy při užívání antibiotik, kdy je střevní mikroflóra oslabena, např. Laktobacily COMPLEX a fruktooligosacharidy (Walmark a.s.).

3.6.2 Galaktooligosacharidy (GOS)

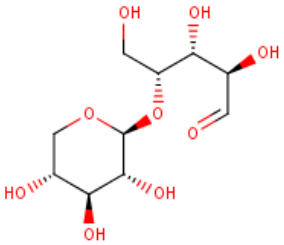
Galaktooligosacharidy (α-D-glukosa-(1-4)-β-D-galaktosa-$(1\text{-}6)_n$) se skládají z molekul glukózy a galaktózy. V řetězci bývá 2–5 jednotek galaktózy. Vyrábí se enzymatickou přeměnou z laktózy nebo laktulózy. Jsou živočišné povahy a můžeme je nalézt v lidském či kravském mléce (Tuohy et al. 2005).

Pokud jsou použity v potravinářství, jsou galaktooligosacharidy schopny zvýšit viskozitu a ovlivnit bod tuhnutí výrobku. Dále také zadržují vlhkost a snižují tak aktivitu vody, čímž výrazně omezují průběh nežádoucích mikrobiálních dějů, které mohou ve výrobku nastat (Rudolfová & Čurda 2005).

Galaktooligosacharidy se prodávají také jako doplňky stravy ve formě bílého prášku či tobolek např. GOS (rozpustná vláknina), GOS kapsle (nutri-exact.cz).

3.6.3 Xylooligosacharidy (XOS)

Xylooligosacharidy se skládají nejčastěji z 3 – 9 molekul xylózy spojené ß(1-4) glykosidickou vazbou (Broekaert et al. 2011) (Obr. 6). Vyskytují se v ovoci, zelenině, mléku či medu. Nejvyužívanějším xylooligosacharidem je xylobióza, což je disacharid používaný v potravinářství (Vazquez et al. 2000). Dle Rycroft et al. (2001) napomáhají xylooligosacharidy k růst bifidobakterií.

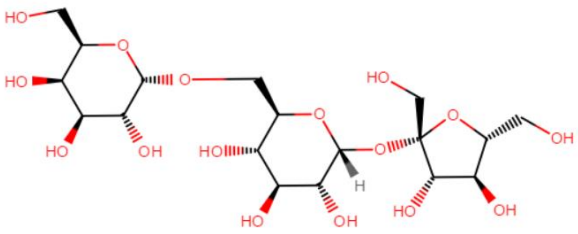


Obrázek 6: Strukturní vzorec xylobiózy (https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/xylobiose).

3.6.4 Oligosacharidy rafinózové řady (RSO) - Sójové oligosacharidy (SOS)

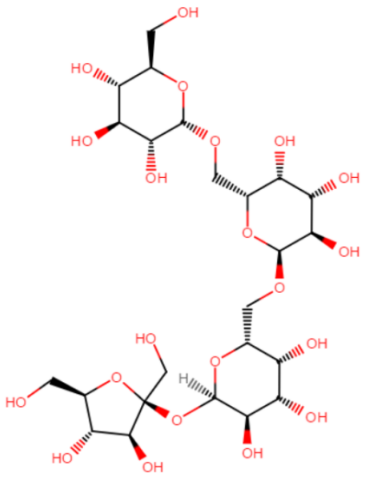
Nejvíce oligosacharidů rafinózové řady obsahují sójové boby, ve kterých může být až 150 g těchto oligosacharidů na 1 kg bobů (De Reu et al. 1997), ale jsou obsaženy i v dalších luštěninách. Nejčastějšími oligosacharidy rafinózové řady jsou rafinóza, stachyóza a verbaskóza (Mitsouka 1992). Hara et al. (1997) uvádí, že pro podporu růstu probiotických bakterií stačí denně sníst 1 až 2 g těchto oligosacharidů.

Rafinóza (Obr. 7) je trisacharid tvořený galaktózou, glukózou a fruktózou (α-D-galaktosa-(1-6)-α-D-glukosa-(1-2)-ß-D-fruktosa) (Mitsouka 1992).



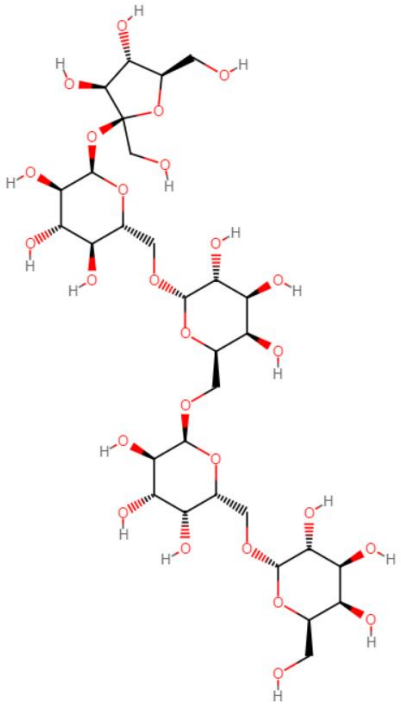
Obrázek 7: Strukturní vzorec rafinózy (https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/raffinose).

Stachyóza (Obr. 8) je tetrachacharid tvořený dvěmi galaktózami, glukózou a fruktózou (α-D-galaktosa-(1-6)-α-D-galaktosa-(1-6)-α- D-glukosa-(1-2)- ß -D-fruktosa) (Mitsouka, 1992).



Obrázek 8: Strukturní vzorec stachyózy (https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/stachyose).

Verbaskóza (Obr. 9) je pentasacharid tvořený třemi galaktózami, glukózou a fruktózou (α-D-galaktosa-(1-6)-α-D-galaktosa-(1-6)-α-D-galaktosa-(1-6)-α-D-glukosa-(1-2)-ß-D-fruktosa) (Mitsouka 1992).



Obrázek 9: Strukturní vzorec verbaskózy (https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/verbascose).

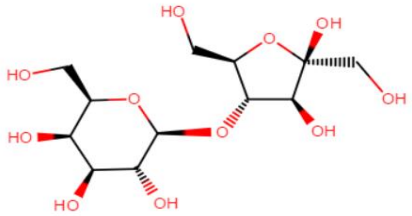
Dle výsledků Rios de Souza et al. (2015) byl po přidání oligosacharidů rafinózové řady v prostředí *in vitro* pozorován nárůst bakterií rodu *Lactobacilus* a *Bifidobacterium*, a pokles počtu bakterií *Escherichia coli* a rodu *Streptococcus*.

3.6.5 Isomaltooligosacharidy (IMO)

Isomaltooligosacharidy jsou sacharidy skládající se z 3 – 9 molekul glukózy, spojené α(1, 6) vazbou. V přírodě se vyskytují v sójových bobech či cukrové třtině. Mají bifidogenní účinky, ale některé studie je mezi prebiotika nezařazují, jelikož jsou částečně tráveny v tenkém střevě, viz Tabulka č. 2 (Goffin et al. 2001).

3.6.6 Laktulóza

Laktulóza (4-O-β-D-galaktopyranosyl-D-fruktosa) je disacharid (Obr. 10). Vzniká enzymatickou syntézou z laktózy a skládá se z molekul galaktózy a fruktózy (Panesar & Kumari 2011).



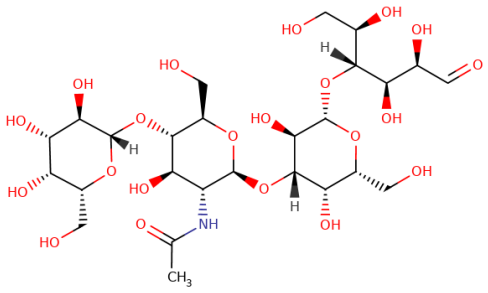
Obrázek 10: Strukturní vzorec laktulózy (https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/lactulose).

Laktulóza se přidává do léčivých přípravků proti zácpě, kde působí jako projímadlo např. Laktulóza Sandoz 670 mg/ml ve formě roztoku, který obsahuje 670 mg laktulózy na 1 ml roztoku. Tento přípravek se dá využít i při jaterních onemocnění (lekarna.cz).

3.6.7 Oligosacharidy mateřského mléka (OMM)

Oligosacharidy mateřského mléka jsou velmi specifické, různorodé a důležité prebiotické oligosacharidy nacházející se mléce. Nejznámějším a nejvíce zastoupeným oligosacharidem v mléce je laktóza (40-60 g/l) skládající se z D-glukózy a D-galaktózy. Jelikož jsme však schopni laktózu sami trávit, není mezi OMM řazena. Ostatní oligosacharidy už nejsou zastoupeny v takovém množství jako laktóza. V kolostru nejdeme OMM v rozmezí od 20 do 25 g/l, později však toto množství klesá až na 5-20 g/l. Základními složkami OMM jsou D-glukóza, D-galaktóza, L-fruktóza, N-acetylglukosamin, a kyselina sialová. Tyto oligosacharidy můžou

obsahovat až 15 monosacharidových jednotek. OMM lze rozdělit na zásadité a kyselé (Musilová & Rada 2015). Skupina těchto oligosacharidů je velmi početná. V mléce můžeme nalézt až 58 různých OMM a více jak 200 izomerů těchto oligosacharidů (Wu et al. 2010). Příkladem si můžeme uvést lacto-N-tetraózu (D-glucose, O-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-O-2-(acetylamino)-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl-(1-3)-O-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-) (Obr. 11) nebo lacto-N-fucopentaózu I (D-Glucose, O-6-deoxy-α-L-galactopyranosyl-(1-2)-O-β-D-galactopyranosyl-(1-3)-O-2-(acetylamino)-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl-(1-3)-O-β-D-galactopyranosyl-(1-4)-) (TOXNET 2017).

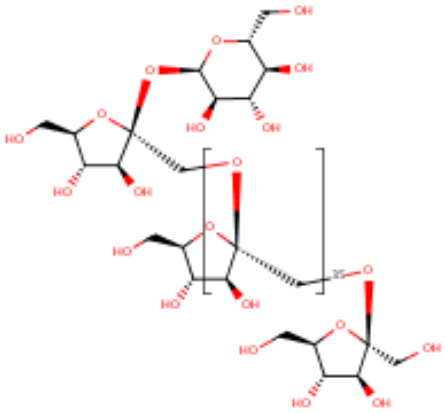


Obrázek 11: Strukturní vzorec lacto-N-tetraózy (https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/lacto-n-tetraose).

3.7 Prebiotické polysacharidy – inulin

Polysacharidy jsou sacharidy skládající se z více než 10 molekul monosacharidu. Mezi prebiotické polysacharidy řadíme inulin (Nováková 2012).

Inulin (Obr. 12) je neškrobový polysacharid, strukturou podobný fruktooligosacharidům. Skládá se z 10 – 60 molekul fruktózy (polyfruktózan) spojený vazbou β(1, 2) (Stewart et al. 2008). Ve vysušeném stavu to je bílý prášek, který nemá žádnou chuť ani vůni (Silvia 1996). Inulin patří mezi rezervní polysacharidy, tzn. že se při jeho odbourávání v rostlině uvolňuje potřebná energie (Nováková 2012). Lze ho tedy nalézt v kořenech čekanky (15-20 %), cibuli (1-5 %), česneku (4-12 %) nebo banánu (0,2 %). V dnešní době ho lze i nasyntetizovat ze sacharózy (Niness, 1999). Jeho sumární vzorec je $C_{6n}H_{10n+2}O_{5n+1}$ (Nováková 2012).



Obrázek 12: Strukturní vzorec inulinu (https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/structure/inulin).

V současné době se vyrábějí směsi na pečení chleba, které v sobě obsahují inulin např. Vital PREBIO. To slouží ke zvýšení obsahu prebiotické vlákniny ve stravě člověka (Nováková 2012). Aby mohl být produkt označen jako produkt inulinový, musí obsahovat více jak 3-6 g inulinu na 100 g výrobku (European Parliament 2006).

Inulin lze koupit ve formě sypkého přípravku v mnoha internetových obchodech (např. myprotein.cz).

3.8 Zdroje prebiotických oligosacharidů

V České republice se v poslední době řeší otázka pěstování rostlinných proteinových krmiv pro hospodářská zvířata. Jako proteinové krmivo rostlinného původu označujeme obecně luskoviny (Suchý et al. 2016). Tyto plodiny mají nejen vysoký obsah proteinu, ale i vysoké procento prebiotických oligosacharidů (Homolka & Kudrna 2007).

Suchý et al. (2016) zkoumal rozdíly mezi množstvím proteinu obsažených v luskovinách, a to konkrétně u hrachu, sóji, řepky, lupiny a bobu. Dle výsledků bylo nejvíce proteinů obsaženo v sóji a lupině.

3.8.1 Sója

Sója (*Glycine*) se řadí do čeledi bobovitých a stejně jako u lupiny je známo mnoho odrůd např. Bohemians, Brunensis či Korus. Rostliny bývají 20 až 150 cm vysoké (Obr.13). Květy jsou bílé až fialové, motýlkovitého tvaru, utvářející květenství ve tvaru hroznu (Minkevič & Borkovskij 1953). Semena jsou kulatá, uložená v lusku (Obr. 14). Barva je žlutá, zelená, hnědá až černá. Mívají nahořklou chuť (Polák 1955). Sójový extrahovaný šrot a sójová moučka bývá

používána ke krmným účelům u drůbeže a prasat, díky vysokému obsahu dusíkatých látek (36,6-50,4 %), zejména lysinu, tryptofanu, isoleucinu, valinu a treoninu. Sójová semena obsahují ale také mnoho antinutričních látek, jako je např. antitrypsin, který zabraňuje štěpení bílkovin v tenkém střevě (Larbier & Leclercq 1994).

Obrázek 13: Sója luštinatá (celá rostlina) (https://www.shutterstock.com/cs/search/soybean+flower).

Obrázek 14: Semena sóji luštinaté (https://cit.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/soja.htm).

Semena sóji obsahují mimo jiné i poměrně vysoké procento tuků (13.4-26,4 %) a prebiotických oligosacharidů, jako je stachyóza (1,7-3,7 %) nebo rafinóza (0,5-1,8 %) (Honig & Rackis 1979; Lee & Choung 2011).

Dle García-Ruiz et. al. (2006) byl pozorován negativní vliv na zdravotní stav králíků při zkrmu extrahovaného sójového šrotu.

3.8.2 Lupina

Lupina (*Lupinus*) neboli vlčí bob se řadí do čeledi bobovitých a patří k rostlinám pocházejících od Středozemního moře (Štranc et al. 2008). Je známo přes 300 druhů lupiny (Kohajdová et al. 2011). Mezi nejvýznamnější druhy v Evropě patří lupina bílá (*Lupinus albus*), lupina žlutá (*Lupinus luteus*), lupina úzkolistá (*Lupinus angustifolius*) a lupina proměnlivá, zvaná též andská (*Lupinus mutabilis Sweet*) (Hýbl et al. 2011).

Semena lupiny obsahují vysoký obsah dusíkatých látek, lipidů, neškrobových polysacharidů a oligosacharidů, zejména oligosacharidů rafinosové řady (Volek 2009). Dříve se lupina z důvodu její nahořklé chuti pěstovala pouze pro krmné účely hospodářských zvířat (Arnoldi et al. 2011). V dnešní době jsou pěstovány „sladké“ odrůdy, které mají obsah hořkých a antinutričních látek nízký. Tudíž jsou vhodné i pro spotřebu člověkem (Aniszewski et al. 2001).

Volek (2009) pozoroval rozdíly mezi brojlerovými králíky krmenými sójovým šrotem, slunečnicovým šrotem a semeny lupiny bílé odrůdou Amiga. Bylo zjištěno, že u králíků krmenými lupinou, se nevyskytovaly trávicí potíže tak často jako u ostatních. To mohlo být způsobeno vysokým obsahem prebiotických oligosacharidů v semenech lupiny, které podporují růst bakterií mléčného kvašení a tím zvyšují i koncentraci kyseliny mléčné ve střevech.

Suchý et al. (2016) zjistil, že se lupiny odlišného druhu, ale i odrůdy, ve výživových hodnotách liší. Ukázalo se, že z pohledu množství a kvality proteinu obsaženého v rostlině je k pěstování a ke zkrmu nejvhodnější lupina bílá. Konkrétně to byla odrůda Zulika, která měla narozdíl od dalších zkoumaných odrůd (Amiga, Dieta) velice dobrý výnos i výživovou hodnotu.

3.8.2.1 Lupina bílá a její odrůdy

Lupina bílá (*Lupinus albus*) je 75 až 100 cm vysoká rostlina s vegetační dobou trvající 130 až 180 dní. Obvykle kvete bíle nebo modrobíle (Obr. 15). Semena jsou velká, zploštělá a hranatá, uložena v lusku (Obr. 16). Barva je žlutobílá. Semena bývají používány při výrobě mouky, ze které se pak mohou vyrábět špagety nebo pečivo (Hýbl et al. 2011). Semena obecně obsahují vysoké procento dusíkatých látek (40 %), lipidů (12 %), hlavně nenasycených mastných kyselin, a vlákniny, která zlepšuje střevní peristaltiku a snižuje hodnotu cholesterolu v krvi. Mouka ze semen lupiny má nízký obsah škrobu a zpomaluje stárnutí pečiva (Homolka & Kudrna 2007).

Mimo jiné se dá lupina využít k obohacování půdy, díky její schopnosti vázat do půdy vzdušný dusík, pomocí hlízkových bakterií (Hýbl et al. 2011).

V České republice se pěstuje mnoho druhů Lupiny bílé, jako příklad si můžeme uvést odrůdy Amiga, Butan, Dieta, Oležka a Wat (Homolka & Kudrna 2007).

Obrázek 15: Lupina bílá (celá rostlina)
(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/68/5202.jpg).

Obrázek 16: Semena lupiny bílé
(http://www.freegluten.cz/lupina-lustenina-na-vzestupu).

Amiga se řadí mezi sladké odrůdy lupiny. Je to tedy středně raná odrůda s nízkým obsahem antinutričních a alkaloidních látek. Rostliny jsou vysoce odolné proti poléhání. Květy jsou modrobílé. Semenná zralost se pohybuje okolo 136 dní. Obsah dusíkatých látek v sušině semen je 37,5 %. Obsah lipidů je 14 %. V České republice byla tato odrůda registrována v roce 2004. Udržovatelem této odrůdy je Florimond Desprez z Francie (Vrabec 2008).

Zulika je poloraná odrůda řadící se také mezi sladké odrůdy. Květy jsou modrobílé. V České republice byla tato odrůda registrovaná v roce 2007. Udržovatelem této odrůdy je OSEVA PRO s.r.o. (Mezlík 2008).

Odolnost rostlin odrůdy Dieta proti poléhání je průměrná. Obsah dusíkatých látek v sušině semene je 39,6 % a lipidu je 12,5 % (Vrabec 2008). Dieta je vysoká, velkolistá a velkozrnná rostlina. Udržovatelem této odrůdy je Lyle Morrison & Partners z Velké Británie.

3.8.2.2 Využití lupiny

Lupina má mnoho možností využití. Lupina se dá pěstovat jako okrasná rostlina, kdy se na internetu dají koupit jednotlivá semena různých odrůd lupiny (osiva-semena.cz). Lupina se dá využít v rybářství jako návnada, kdy se prodávají semena lupiny naložené ve sladkém nálevu (arybarstvi.cz). Semena lupiny se nakládají do oleje a poté se konzumují. Tento výrobek je volně dostupný na internetu pod názvem Tremocos do olival (portugalshop.cz). Na trhu lze sehnat i výživový doplněk ve formě proteinu extrahovaného z lupiny např. Bio Vegan Lupina protein 200 g PURYA! (elixir.cz) či lupinové kávy (bioobchod.cz). Lupina se dá také využít v kosmetice např. šampón podporující růst vlasů (yves-rocher.cz). V poslední době se semena hojně používají k výrobě mouky, která se následně přidává do průmyslově vyráběných produktů, a to jak do pečiva, špaget, sušenek, cukroví, chlebů či masných výrobků (Homolka & Kudrna 2007). Smith et al. (2006) prováděli studii zabývající se vlivem konzumace vlákniny ze semen lupiny bílé (*Lupinus albus*) na střevní mikrobiotu člověka. Experimentu se zúčastnilo 18 mužů ve věku od 24 do 64 let. První polovina respondentů konzumovala po dobu 28 dní doplňky stravy z vlákniny semene lupiny úzkolisté (*Lupinus angustifolius*) a druhá sloužila jako skupina kontrolní. Hodnocení střevní mikrobioty bylo prováděno pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) ze stolice respondentů. U jedinců konzumující potravní doplněk z lupiny byl pozorován nárůst bifidobakterií a pokles klostridií což bylo vyhodnoceno jako pozitivní vliv na složení střevní mikrobioty. Na celkové počty anaerobních bakterií, laktobacily, kmeny rodu *Eubacterium, Bacteroides* a *Prevotella* neměla konzumace vlákniny z lupiny vliv.

V posledních letech se také uvažuje o využití lupiny ve výkrmu zvířat jako náhrada za sóju. Je to zejména z toho důvodu, že se jedná o plodinu bohatou na proteiny a prebiotické oligosacharidy, kterou lze v našich podmínkách velmi dobře pěstovat a nebylo by pak nutné využívat sóju, která pochází z velké části z dovozu. Hodnotit vliv lupiny na chov a výkrm zvířat lze dvěma způsoby. V prvním případě se posuzuje vliv lupiny na přírůstky, konverzi krmiva a celkového složení jatečně upraveného těla zvířat. Gugołek et al. (2018) zkoumali změny výkrmnosti u králíků mezi skupiny krmené krmnou dávkou s příměsí sójového šrotu nebo krmnou dávkou s příměsí řepkového šrotu, lupiny bílé a hrachu. Výsledky ukázaly, že změna krmné dávky nemá na růst králíku vliv. Závěrem bylo, že jelikož nemá lupina na výkrmnost králíků negativní vliv, může se šrot ze sóji v případě králíku nahradit směsí šrotu z řepky, lupiny

a hrachu. Při porovnávání jatečných těl králíků, který prováděli Volek et al. (2018), bylo zjištěno, že skupina krmena lupinou vykazovala lepší konverzi krmiva než skupina krmena sójou. Ke stejným závěrům došel i Tefera et al. (2017), který uvádí, že přidáváním lupiny bílé (*Lupinus albus*) do krmiva ovcí plemene Washera, lze výnosnost jatečných těl přežvýkavců zvýšit. Green et al. (2016) naopak popisuje defekty narozených telat (např. rozštěpy páteře mláďat) samic Holštýnského skotu, které byly krmené krmnou dávkou s příměsí lupiny (*Lupinus leucophyllus*). Důvodem udává v lupině přítomné alkaloidy. Plemena skotu Angus, byly vůči těmto alkaloidům odolnější. Proto je nutné vždy uvážit, jakou odrůdou lupiny je vhodné krmnou dávku nastavovat a jakým zvířatům a v jakém množství bude lupina zvířatům podávána. Olkowski (2018) prováděl pokus na zjištění ovlivnění růstu a složení jatečného těla brojlerů kuřat krmených semeny lupiny žluté náhradou za sójovou moučku. Jedinci krmeni lupinou v prvních třech týdnech života vykazovali snížený příjem potravy a zpomalený růst. Brojleři krmení lupinou žlutou obecně vykazovali větší droby a vetší podíl intramuskulárního tuku. Profil mastných kyselin byl lepší než u kuřat krmených sójovou moučkou. Podíl bílkovin ve svalovině byl nižší. Náhradu lupinové moučky za sójovou moučku doporučuje až u brojlerů starších tří týdnů.

V druhém případě se hodnotí vliv lupiny na složení mikrobioty zvířat, a tak i na zdravotní stav jedince. Bartkiene et al. 2013 dělali pokus na krysách, kdy byl prokázán příznivý vliv na složení střevní mikrobioty po konzumaci krmné dávky s příměsí lupiny. Touto problematikou se také zabývali Geigerová et al. (2017), kdy zkoumali růst bakterií ve voleti a slepých střevech brojlerových kuřat a kachen v závislosti na podání různých krmných dávek, kdy se příměs sójového extrahovaného šrotu nahrazovala buď z poloviny nebo úplně šrotem z lupiny. Výsledky ukázaly pozitivní vliv na růst laktobacilů u kuřat a na růst laktobacilů společně s bifidobakteriemi u kachen. Rubio et al. (1998), který sledoval růst laktobacilů a *Escherichia coli* v trávicím traktu kuřat brojlerů po podání krmiva obsahující lupinu úzkolistou (*Lupinus angustifolius*), zjistil zvýšený růst laktobacilů. Při pokusu Zdunczyk et al. (2014) na nosnicích, kdy byl sójový šrot nahrazován z 10 % a 20 % lupinou, byl zjištěn prebiotický efekt lupiny na střevní mikrobiotu. Změna složení střevní mikrobioty byla také pozorována u prasat (Kasprowicz-Potocka et al. 2017). Existuje však i studie, která po podávání lupiny do krmných dávek prasat změnu mikrobioty nepotvrdila (Zaworska et al. 2017). Jensen et al. 2013 zjistili, že se složení střevní mikrobioty po podávání krmné dávky s příměsí lupiny po prvním týdnu lišil. Počty bifidobakterií ve slepém střevě vzrostly a počty *Campylobacter* spp., které jsou hlavní příčinou vzniku infekcí, se významně snížily.

4 Metodika

Metodika se rozděluje na 4 fáze. V první fázi bylo stanoveno množství celkových oligosacharidů rafinózové řady (RSO) v různých plodinách. Cílem bylo zjistit, zdali plodiny obsahují srovnatelné nebo rozdílné množství těchto oligosacharidů. Dalším krokem bylo tyto oligosacharidy izolovat a otestovat na nich, jak moc stimulují růstu bifidobakterií, které patří mezi důležité probiotické bakterie. V poslední fázi byl proveden krmný pokus, kdy bylo zkoumáno, jak nahrazení sóji za lupinu v krmné dávce pro nosnice ovlivní složení střevní mikrobioty.

4.1 Stanovení množství oligosacharidů rafinózové řady ve vybraných hospodářských plodinách

Stanovovaní RSO probíhalo u hospodářsky významných plodin, které se nejčastěji využívají pro výrobu proteinových krmiv pro hospodářská zvířata tzn. řepka, slunečnice, sója a lupina. Stanovení se provádělo pomocí biochemického testu od Megazyme®. Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí Statgraphics Centurion XV analýzou rozptylu ANOVA s použitím Scheffého metody.

4.2 Extrakce prebiotických oligosacharidů z mouky lupiny

Pro extrakci oligosacharidů rafinózové řady (RSO) byly vybrány 3 nejvíce pěstované odrůdy lupiny bíle v ČR (Amiga, Zulika a Dieta) a pomocí metody podle Ekvalla et al. (2007) byly RSO z jednotlivých odrůd vyextrahovány a pomocí gelové permeační chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě následně izolovány (Ward et al. 2006). Pomocí metody podle Bradforda (1976) byly jednotlivé frakce zkontrolovány, zda neobsahují zbytky proteinu. Požadované frakce byly kvantitativně převedeny do lyofilizační baňky a následně lyofilizovány a uschovány pro použití v kultivačním pokusu s čistými kmeny bifidobakterií.

4.3 Kultivace bakterií na oligosacharidech vyextrahovaných z lupiny

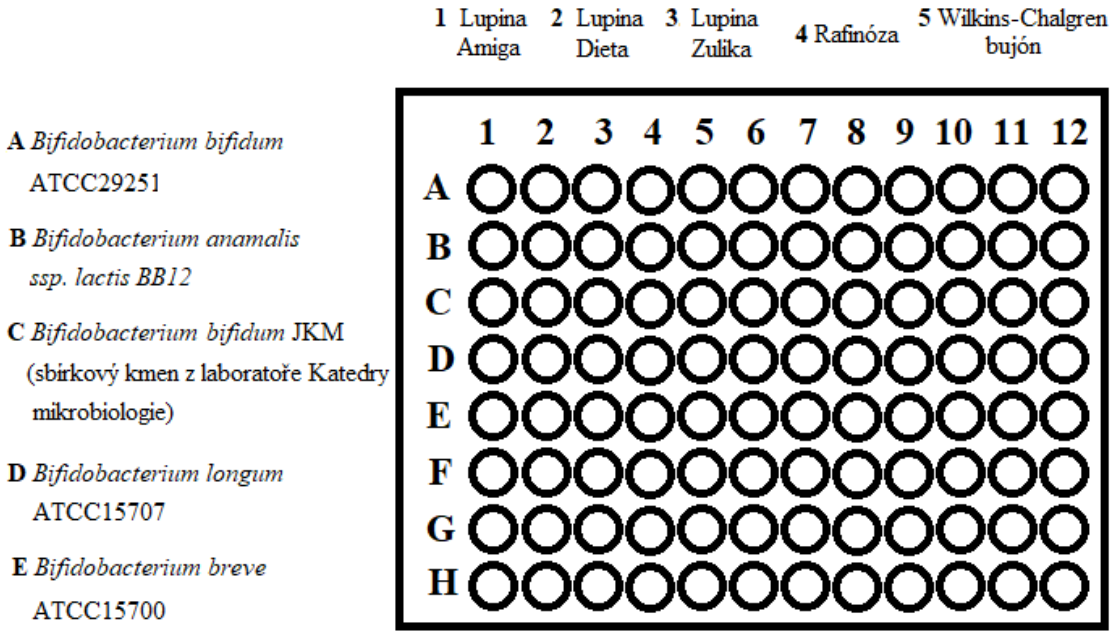
Cílem kultivace bakterií na oligosacharidech vyextrahovaných z lupiny bylo prokázání růstu bifidobakterií různého původu na těchto oligosacharidech jako jediném zdroji uhlíku. Kultivace vybraných druhů bakterií (Tab. 5) byla prováděna na mikrotitrační destičce a následně byl jejich počet stanoven rovněž kultivačně na Petriho miskách.

Tabulka 5: Vybrané druhy bakterií na kultivaci na RSO.

Bakterie	Původ
Bifidobacterium bifidum ATCC29251	Stolice kojence
Bifidobacterium animalis ssp. *lactis* BB12	Kysaný mléčný výrobek
Bifidobacterum bifidum JKM (sbírkový kmen z laboratoře Katedry mikrobiologie)	Stolice kojence
Bifidobacterium longum ATCC15707	Stolice dospělého
Bifidobacterium breve ATCC15700	Střevo kojence

4.3.1 Kultivace vybraných bakterii na mikrotitrační destičce

Aby bylo možné posoudit růst vybraných bakterií na izolovaných oligosacharidech, bylo nutné je kultivovat v živném médiu, kde izolované RSO sloužili jako jediný zdroj uhlíku. Pro tento účel byl vybrán růst na mikrotitrační destičce. Nejprve bylo připraveno růstové médium bez sacharidů obsahující trypton (5 g/l), Nutrient broth (5 g/l), kvasničný extrakt (2,5 g/l), Tween 80 (0,5 ml/l) a cystein (0,25 g/l), do kterého byly přidány námi izolované oligosacharidy z jednotlivých odrůd lupiny bílé (1 g RSO/l růstového média) nebo čistá rafinóza (1 g rafinózy/l růstového média). Rafinóza byla vybrána jako jediný zdroj uhlíku, jelikož je z oligosacharidů rafinózové řady v lupině zastoupena v relativně velkém množství. Roztok byl poté přefiltrován membránovým filtrem Whatman® s póry o velikosti 0,20 μm, tak aby bylo dosaženo jeho sterility. Připraven byl také Wilkins-Chalgren bujón (Oxoid) s přídavkem sojového peptonu (5 g/l), který je svým složením ideální pro kultivaci bifidobakterií. Byly připraveny i narostlé kmeny jednotlivých bifidobakterií. Bakterie byly kultivovány ve Wilkins-Chalgren bujónu za anaerobního prostředí 24 hodin při teplotě 37 ºC. Abychom odstranili kultivační médium od požadovaných bakterií, bylo nutné odebrat 1 ml dobře narostlé kultury a ten následně odstředit. Supernatant byl slit a pelet byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru, tak aby byla konečná koncentrace bakterií 10^5 KTJ/ml. Na stanovení koncentrace bakterií byla použita McFarland zákalová stupnice. Podle schématu (Obr. 17) bylo do každé jamky vloženo 90 μl připraveného růstového média a 10 μl připravené suspenze bifidobakterií. Konečná koncentrace bifidobakterií v mikrotitrační jamce byla tedy 10^4 KTJ/ml. Takto připravená destička byla 24 hodin anaerobně kultivována při 37 ºC. Pro tvorbu anaerobního prostředí (s obsahem CO_2) byl využit kit AnaerogenPlus od firmy Oxoid.

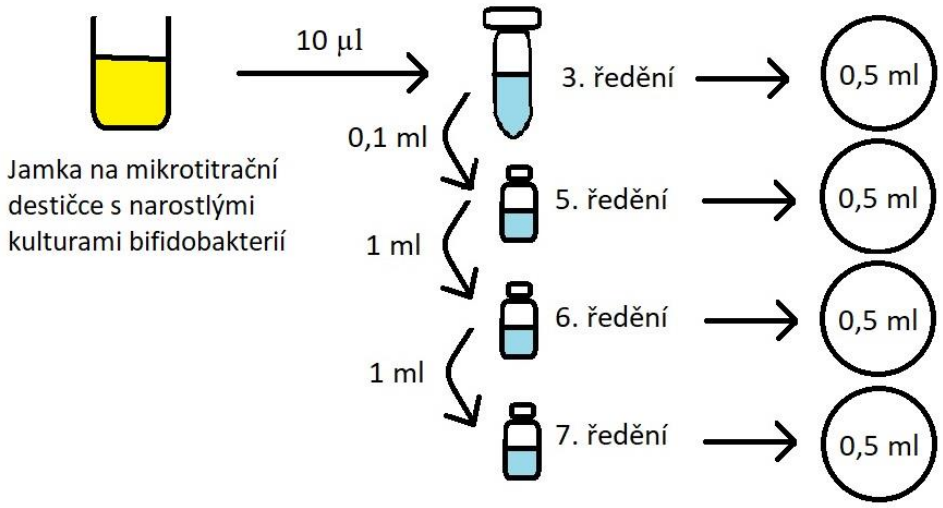


Obrázek 17: Rozložení médií a kultur na mikrotitrační destičce.

Po kultivaci bylo změřeno pH v jednotlivých jamkách pomocí testovacích pH papírků pH-Fix a byl stanoven počet narostlých bakterií kultivačně na Petriho miskách.

4.3.2 Kultivace vybraných bakterii na Petriho miskách

Počet bakterií v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky byl stanoven kultivačně pomocí plotnové metody na Petriho miskách. Abychom mohly stanovit co nejpřesnější počet vybraných bifidobakterií, bylo nutné vzorky naředit decimální ředící řadou až do koncentrace 10^{-7}. Z jednotlivých jamek proto bylo odebráno pomocí injekčních stříkaček 10 µl narostlé kultury a vloženo do vialek s 10 ml růstového média Wilkins-Chalgren bujónu, čímž vzniklo 3.ředění (10^{-3}). Z tohoto ředění bylo odebráno 0,1 ml roztoku a vložen do další vialky s 10 ml Wilkins-Chalgren bujónem (5. ředění). Šesté a sedmé ředění bylo prováděno odběrem 1 ml předchozího ředění a vloženo do vialky s 9 ml Wilkins-Chalgren bujónu. Naředěné vzorky byly následně naneseny po 0,5 ml na Petriho misky a přelity Wilkins-Chalgren anaerobe agarem (Oxoid) se sójovým peptonem (5 g/l) a s přídavkem mupirocinu (0,1 mg/ml) a kyseliny octové (1 ml/l). Byly prováděny 3 opakování. Kultivace probíhala opět za anaerobního prostředí pomocí kitu AnaerogenPlus (Oxoid) 24 hodin při teplotě 37 ºC (Obr. 18).



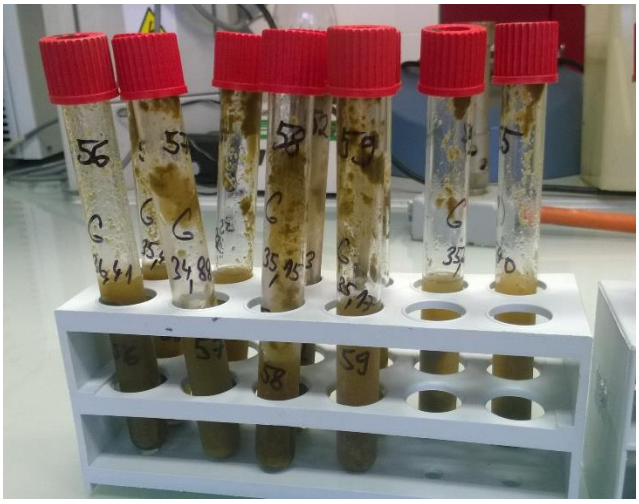
Obrázek 18: Schéma ředění a nanášení vzorků na Petriho misky (0,5 ml zalit Wilkins-Chalgren agarem).

Po kultivaci byly kolonie spočítány a výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí Statgraphics Centurion XV analýzou rozptylu ANOVA s použitím Scheffého metody. Korelace mezi pH a počtem bakterií byla vyhodnocena pomocí MS Office Microsoft Excel.

4.4 Kultivace bakterií ze slepého střeva nosnic

Po kultivaci čistých kmenů bifidobakterií na extrahovaných oligosacharidech z lupiny byl proveden krmný pokus na nosnicích. Drůbež byla rozdělena do pěti skupin po 6 jedincích a po dobu 2 měsíců krmena pěti různými krmnými dávkami s rozdílným složením. První skupina byla krmena kontrolní komerční krmnou směsí pro nosnice (N1 – ZZN Pelhřimov) na bázi pšenice a kukuřice s příměsí sójového extrahovaného šrotu. U dalších skupin byl sójový extrahovaný šrot nahrazován šrotem z lupiny. Druhá krmná dávka obsahovala 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z celých semen lupiny (CL_{50}). U třetí krmné skupiny byl sójový extrahovaný šrot kompletně nahrazen šrotem z celých semen lupiny (CL_{100}). Sójový extrahovaný šrot u čtvrté pokusné skupiny byl nahrazen z 50 % šrotem z odslupkovaných semen lupiny (OL_{50}). Pátá skupina byla krmena krmnou směsí, kde byl extrahovaný sójový šrot úplně nahrazen šrotem z odslupkovaných semen z lupiny (OL_{100}). Chemické složení jednotlivých krmiv bylo stanovováno ve Státním veterinárním ústavu je uvedeno v tabulkách P1, P2, P3 a P4 v Příloze.

Po ukončení experimentu byly pokusné nosnice zabity. Dále byl z každého jedince odebrán 1 g obsahu slepých střev a vložen do označené zkumavky s 9 ml růstového média (Wilkins-Chalgren bujón), čímž bylo vytvořeno 1. ředění (10^{-1}) (Obr. 19).

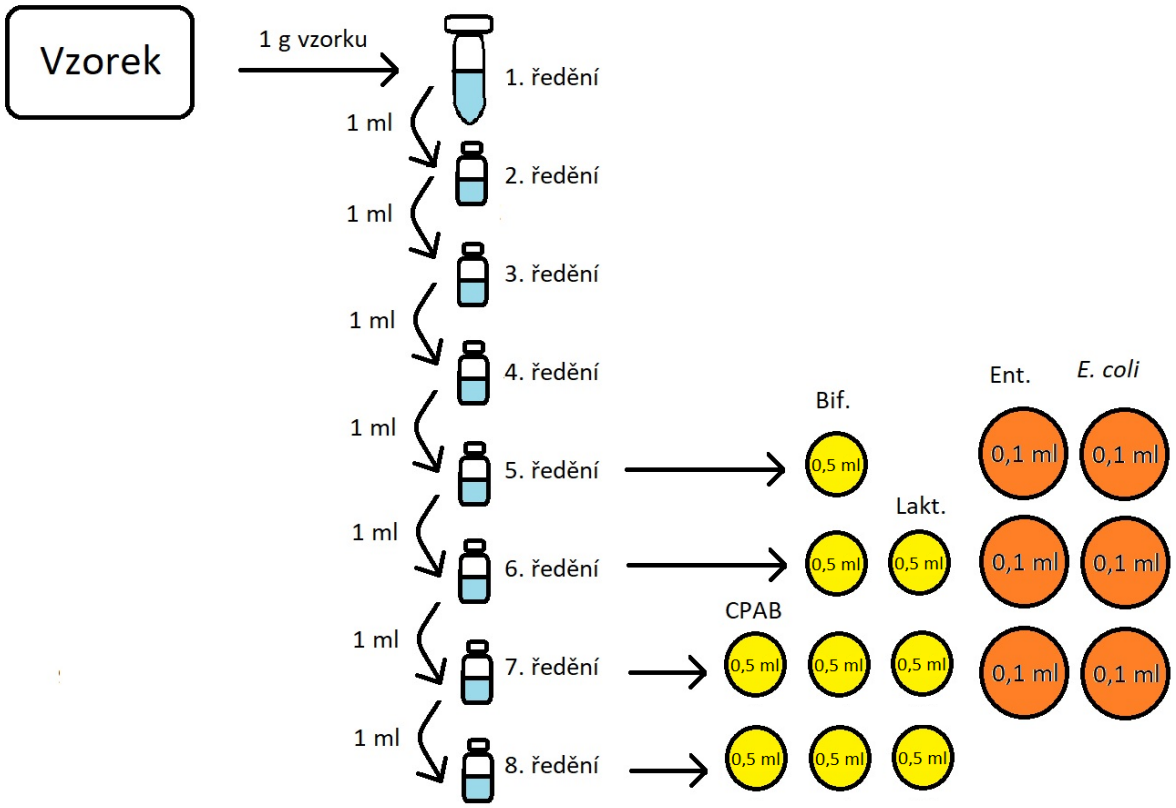


Obrázek 19: Vzorky slepých střev ve Wilkins-Chalgren bujónu.

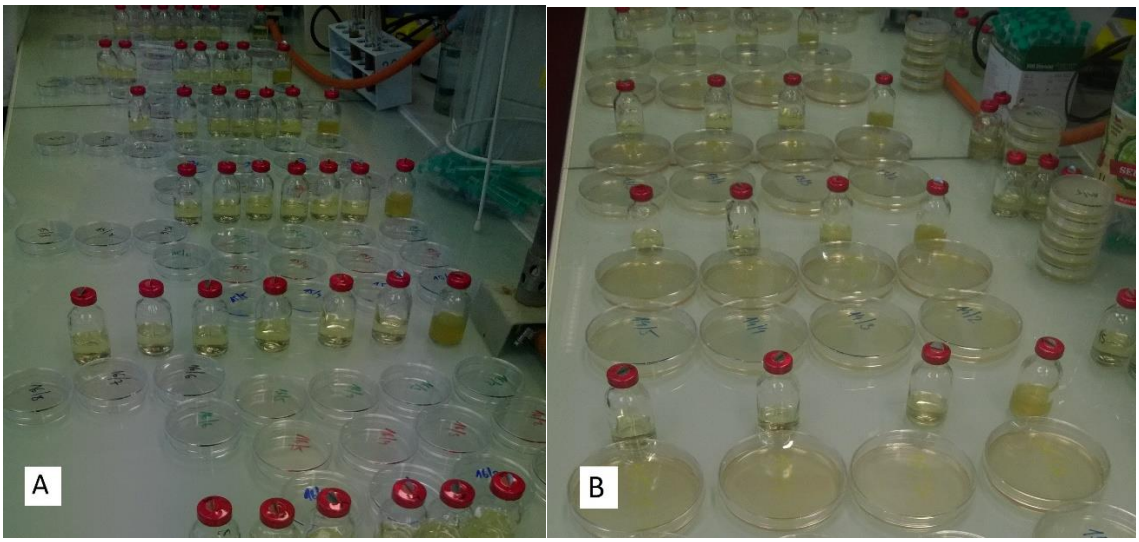
Pro mikrobiologický rozbor obsahu slepých střev nosnic byla použita plotnová metoda. Stanovovány byly celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterie, laktobacily, enterokoky a *Escherichia coli*. Všechny vzorky byly podle desítkové ředící řady zředěny až do 8. ředění (10^{-8}) tzn. že byl 1 ml již naředěného vzorku 1. ředění (10^{-1}) anaerobně a asepticky přenesen pomocí injekční stříkačky do vialky s 9 ml Wilkins-Chalgren bujónu (Oxoid), čímž vzniklo 2. ředění (10^{-2}). Ostatní ředění probíhala stejně až do požadovaného konečného poměru ($1/10^{8}$ g/ml). Wilkins-Chalgren bujóny, které byly použity na ředící řady, byly připravené metodou roll-tube, kdy se vytvořilo anaerobní prostředí prostřednictvím probublávání bujónu oxidem uhličitým.

Takto připravené vzorky byly naneseny pomocí injekčních stříkaček na Petriho misky a následně zality selektivními půdami. Celkové počty anaerobních mikroorganismů byly stanovovány ze 7. a 8. ředění, kdy byl vždy odebrán 0,5 ml z požadovaného ředění a nanesen na označenou Petriho misku. Vzorky byly ihned zality Wilkins-Chalgren anaerobe agarem se sójovým peptonem, vloženy do anaerostatu společně s vyvíječem anaerobní atmosféry (Anaerogen, Oxoid) a anaerobně kultivovány 48 hodin při 37 ºC. Bifidobakterie byly kultivovány z 5. až 8. ředění. Na plotnu byl nanášen 0,5 ml zředěného vzorku, který byl zalit modifikovaným Wilkins-Chalgren anaerobe agarem se sójovým peptonem (5 g/l) a s přídavkem mupirocinu (0,1 mg/ml) a kyseliny octové (1 ml/l), který podporuje růst bifidobakterií a inhibuje růst bakterií mléčného kvašení. Kultivace probíhala také v anaerobním prostředí za

pomocí Anaerogen od firmy Oxoid. Laktobacily byly kultivovány ze 6. až 8. ředění v mikroaerofilním prostředí, kdy byla použita metoda dvojitého přelití. Půl ml vzorku byl přelit Rogosa agarem (Oxoid) s přídavkem kyseliny octové (1,32 ml/l), nechal se zatuhnout a následně byl zalit další vrstvou téhož agaru. Kultivace laktobacilů probíhala 48 hodin při 37 ºC. Enterokoky a *Escherichia coli* byly stanovovány z 5. až 7. ředění, kdy byl objem 0,1 ml rozetřen na agar. Kultivace probíhala aerobně při teplotě 37 ºC, u enterokoků 48 hodin na Slanetz-Bartley agaru (Oxoid) a u *Escherichia coli* 24 hodin na TBX agaru (Oxoid) (Obr. 20; Obr. 21).



Obrázek 20: Schéma ředění a nanášení vzorků na Petriho misky (CPAB: celkové počty anaerobních bakterií, Bif.: bifidobakterie, Lakt.: laktobacily, Ent.: enterokoky, *E. coli*: *Escherichia coli*; žlutá: 0,5 ml zalit živným médiem, oranžová: 0,1 ml rozetřen na živné médium).



Obrázek 21: Ředění a kultivace vybraných mikroorganismů z trávicího traktu drůbeže na Petriho miskách (A: kultivace celkového počtu anaerobních bakterií, bifidobakterií a laktobacilů, B: kultivace enterokoků a *Escherichia coli*).

Po vyjmutí vzorků z termostatů byly kolonie narostlých bakterií na jednotlivých půdách spočítány a násobeny 2x (na misky bylo aplikováno 0,5 vzorku). Celkové množství bakterií ve vzorku bylo počítáno podle vztahu:

$$P = [(P1 + P2)/11]*F \text{ (KTJ/ml)}$$

P1, P2 – počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počitatelných plotnách

F – převrácená hodnota vyššího ředění

KTJ – kolonie tvořící jednotky.

Výsledky jsou vyjádřeny jako kolonie tvořící jednotky v 1 ml vzorku. Spočtené výsledky kultivace bakterií ze slepého střeva drůbeže byly zpracovány do tabulky a následně statisticky vyhodnoceny pomocí Statgraphics Centurion XV analýzou rozptylu ANOVA s použitím Scheffého metody.

5 Výsledky

5.1 Stanovení množství oligosacharidů rafinózové řady ve vybraných hospodářských plodinách

Stanovení množství RSO v řepce, slunečnici, sóji a lupině ukázalo, že nejvíce RSO obsahovala lupina (8,26 ± 0,14 g RSO/100 g lupinové mouky), následovala sója (6,96 ± 0,21 g RSO/100 g extrahovaného sójového šrotu) a dále extrahovaný šrot z řepky (1,79 ± 0,14 g RSO/100 g šrotu) a slunečnice (1,73 ± 0,26 g RSO/100 g šrotu). Mezi výsledky byly nalezeny statisticky významné rozdíly (P <0,05). Statisticky významné rozdíly (P <0,05) v množství RSO nebyly zaznamenány pouze mezi řepkovým a slunečnicovým extrahovaným šrotem (Tab. 6).

Tabulka 6: Zjištěné množství přítomných oligosacharidů rafinózové řady (RSO) ve vybraných plodinách.

	RSO	
	g/100 g	**SD***
Lupina – Zulika (mouka)	8,26^{A}	0,14
Sója (extrahovaný šrot)	6,96^{B}	0,21
Řepka (extrahovaný šrot)	1,79^{C}	0,14
Slunečnice (extrahovaný šrot)	1,73^{C}	0,26

*SD: směrodatná odchylka

^{A,B,C} statistický významný rozdíl (P <0,05)

5.2 Extrakce oligosacharidů rafinózové řady z mouky lupiny

RSO se ze semen lupiny odrůd Amiga, Dieta i Zulika podařilo izolovat. Efektivnost izolace u odrůdy Zulika byla cca 21 %. Největší množství RSO bylo izolováno z odrůdy Amiga (Tab. 7). Bylo izolováno dostatečné množství, tak aby bylo možné provést kultivaci čistých kultur na RSO jako jediném zdroji uhlíku.

Tabulka 7: Množství vyizolovaných oligosacharidů rafinózové řady (RSO) z jednotlivých odrůd lupiny.

Odrůda lupiny	RSO g/100 g mouky
Zulika	1,74
Amiga	2,84
Dieta	1,38

5.3 Kultivace bakterií na oligosacharidech extrahovaných z lupiny

Kultivace vybraných bifidobakterií ukázala, že oligosacharidy z lupiny dokáží stimulovat růst většiny testovaných bifidobakterií (Tab. 8).

Tabulka 8: Růst vybraných druhů bifidobakterií (log KTJ/ml ± směrodatná odchylka) na jednotlivých živných médiích s izolovanými oligosacharidy rafinózové řady z lupin, rafinózy a Wilkins-Chalgren bujónu s přídavkem sójového peptonu (n = 3).

	Živná média				
Bakteriální kmeny	**Lupina Amiga**	**Lupina Dieta**	**Lupina Zulika**	**Rafinóza**	**Wilkins-Chalgren bujón**
B. bifidum ATCC29251	$<3^{Aa}$	$<3^{Aa}$	$<3^{Aa}$	$<3^{Aa}$	$5,12 \pm 0,17^{Ab}$
B. animalis ssp. *lactis* BB12	$8,13 \pm 0,05^{Cc}$	$6,21 \pm 0,16^{Ca}$	$6,06 \pm 0,06^{Da}$	$7,59 \pm 0,09^{Cb}$	$9,44 \pm 0,09^{Cd}$
B. bifidum JKM	$5,71 \pm 0,05^{Bc}$	$5,35 \pm 0,24^{Bb}$	$4,99 \pm 0,14^{Ca}$	$5,57 \pm 0,17^{Bbc}$	$8,63 \pm 0,26^{Bd}$
B. longum ATCC15707	$9,26 \pm 0,1^{Ec}$	$9,14 \pm 0,02^{Ec}$	$4,84 \pm 0,16^{Ca}$	$8,85 \pm 0,08^{Db}$	$9,41 \pm 0,02^{Cd}$
B. breve ATCC15700	$8,36 \pm 0,08^{Dc}$	$7,55 \pm 0,08^{Db}$	$4,25 \pm 0,05^{Ba}$	$9,57 \pm 0,10^{Ed}$	$9,56 \pm 0,07^{Cd}$

$^{A, B, C, D, E}$ statisticky významný rozdíl ve sloupcích ($P < 0,05$)

$^{a, b, c, d}$ statisticky významný rozdíl v řádcích ($P < 0,05$)

Růst bifidobakterií se u jednotlivých kmenů, ale i živných mediích s obsahem RSO z různých odrůd lupiny výrazně lišil. Kmen *Bifidobacterium bifidum* ATCC29251 na živných médiích nerostl. Mírný růst byl zaznamenán pouze u Wilkins-Chalgren bujónu, kdy se počet bakterií zvýšil pouze o 1 řád. Obecně nejlépe rostly bifidobakterie na Wilkins-Chalgren bujónu s přídavkem sójového peptonu (dále jen Wilkins-Chalgren bujónu) a nejméně na oligosacharidech z odrůdy Zulika.

Statisticky byly vyhodnocovány rozdíly mezi růstem různých kmenů bifidobakterií na jednotlivých živných médiích (ve sloupcích) a mezi růstem jednotlivých bifidobakterií na různých živných mediích (v řádcích).

Na oligosacharidech izolovaných z odrůdy Amiga nejvíce rostl kmen *Bifidobacterium longum* ATCC15707 (9,26 ± 0,10 log KTJ/ml. Druhým nejpočetnějším kmenem byl *Bifidobacterium breve* ATCC15700 (8,36 ± 0,08 log KTJ/ml). Zaznamenán byl růst i u *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 (8,13 ± 0,05 log JKM/ml). Nejmenší růst byl zaznamenán u *Bifidobacterim bifidum* JKM (5,71 ± 0,05 log KTJ/ml). Růst *Bifidobacterium bifidum* ATCC29251 byl pod mezí detekce (<3 log KTJ/ml). Mezi všemi kmeny byly zaznamenány statisticky významné rozdíly (P <0,05). Na RSO izolovaných z lupiny odrůdy Dieta také nejvíce rostl kmen *Bifidobacterium longum* ATCC15707 (9,14 ± 0,02 log KTJ/ml), následoval *Bifidobacterium breve* ATCC15700 (7,55 ± 0,08 log KTJ/ml), *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 (6,21 ± 0,16 log KTJ/ml) a *Bifidobacterim bifidum* JKM (5,35 ± 0,24 log KTJ/ml). *Bifidobacterium bifidum* ATCC29251 opět rostl pod mezí detekce (<3 log KTJ/ml). Mezi všemi kmeny byly nalezeny statisticky významné rozdíly (P <0,05). Na oligosacharidech izolovaných z odrůdy Zulika bifidobakterie moc nerostly. Největší růst byl zaznamenán u *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 (6,06 ± 0,06 log KTJ/ml). U růstu *Bifidobacterim bifidum* JKM (4,99 ± 0,14 log KTJ/ml) a *Bifidobacterium longum* ATCC15707 (4,84 ± 0,16 log KTJ/ml) nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl (P <0,05). Nejméně rostl *Bifidobacterium breve* ATCC15700 (4,25 ± 0,05 log KTJ/ml). *Bifidobacterium bifidum* ATCC29251 rostl pod mezí detekce (<3 log KTJ/ml). Mezi výsledky byly nalezeny statisticky významné rozdíly (P <0,05). Na skupině obsahující živné médium s rafinózou rostl nejlépe kmen *Bifidobacterium breve* ATCC15700 (9,57 ± 0,10 log KTJ/ml). Druhou nejpočetnější skupinou byl *Bifidobacterium longum* ATCC15707 (8,85 ± 0,08 log KTJ/ml). Následoval *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 (7,59 ± 0,09 log KTJ/ml). Nejmenší růst byl zaznamenán opět u *Bifidobacterim bifidum* JKM (5,57 ± 0,17 log KTJ/ml). *Bifidobacterium bifidum* ATCC29251 byl zaznamenán pod mezí detekce (<3 log KTJ/ml). Mezi růsty byly zaznamenány statisticky významné rozdíly (P <0,05). Na komerčním živém médiu Wilkins-

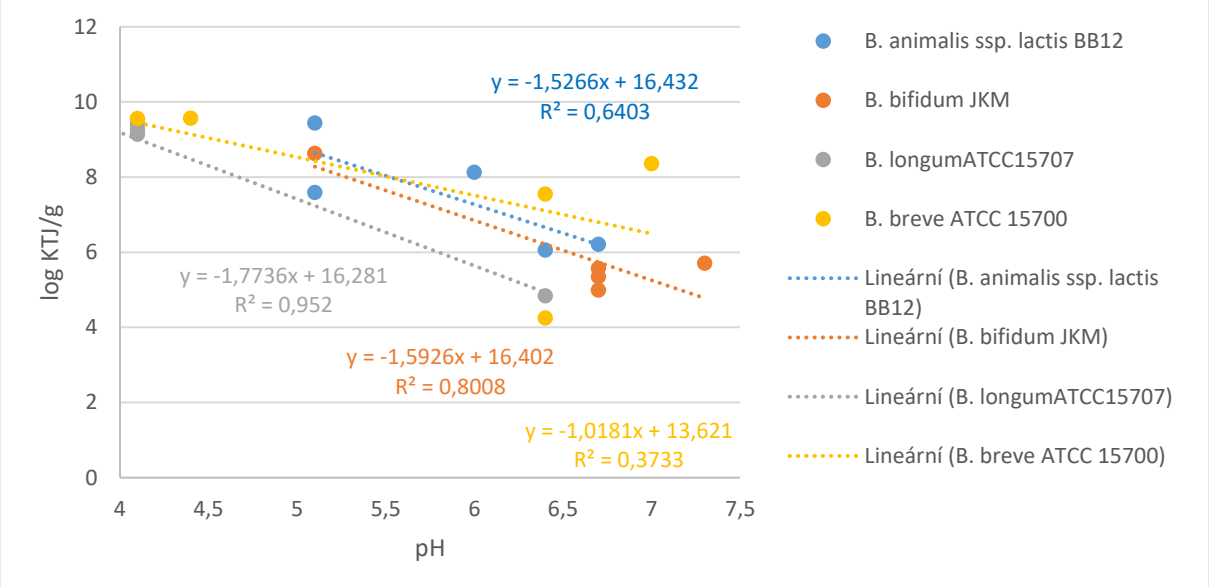
Chalgren bujónu byl největší růst zaznamenán u kmenů *Bifidobacterium breve* ATCC15700 (9,56 ± 0,07 log KTJ/ml), *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 (9,44 ± 0,09 log KTJ/ml) a.*Bifidobacterium longum* 9,41 ± 0,02 log KTJ/ml). Mezi těmito hodnotami nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl (P <0,05). Vysoký růst byl zaznamenán také u *Bifidobacterim bifidum* JKM (8,63 ± 0,26 log KTJ/ml). Nejméně na tomto živném médiu rostl kmen *Bifidobacterium bifidum* ATCC29251 (5,12 ± 0,17 log KTJ/ml). Mezi výsledky růstu bakterií na Wilkins-Chalgren bujónu byly nalezeny statisticky významné rozdíly (P <0,05).

Kmen *Bifidobacterium bifidum* ATCC29251 nejlépe rostl na Wilkins-Chalgren bujónu (5,12 ± 0,17 log KTJ/ml). U ostatních živných médiích byl růst zaznamenán pod mezí detekce (<3 log KTJ/ml). Mezi růstem *Bifidobacterium bifidum* ATCC29251 na živných médiích na bázi oligosacharidů a Wilkins-Chalgren bujónu byl statisticky významný rozdíl (P <0,05). *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 nejlépe rostl na Wilkins-Chalgren bujónu (9,44 ± 0,09 log KTJ/ml). Z médií, které obsahovaly živné médium na bázi oligosacharidů rostl nejlépe na oligosacharidech izolovaných z odrůdy lupiny Amiga (8,13 ± 0,05 log KTJ/ml) a dále na rafinóze (7,59 ± 0,09 log KTJ/ml). U růstu *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 rostoucí na oligosacharidech z odrůd lupiny Dieta (6,21 ± 0,16 log KTJ/ml) a Zulika (6,06 ± 0,06 log KTJ/ml), kde byl zaznamenán nejmenší růst vybrané bifidobakterie, nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl (P <0,05). Mezi výsledky jednotlivých živných médií byly u růstu *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB12 zaznamenány statisticky významné rozdíly (P <0,05). *Bifidobacterium bifidum* JKM nejlépe rostl také na Wilkins-Chalgren bujónu (8,63 ± 0,26 log KTJ/ml). O něco méně rostla vybraná bifidobakterie na ostatních živných médiích na bázi oligosacharidů rafinózové řady. Nejlépe rostla na oligosacharidech izolovaných z odrůdy Amiga (5,71 ± 0,05 log KTJ/ml), dále rafinóze (5,57 ± 0,17 log KTJ/ml) a oligosacharidech z odrůdy Dieta 5,35 ± 0,24 log KTJ/ml). Mezi výsledky Amiga/rafinóza a rafinóza/Dieta nebyl nalezen statisticky významný rozdíl (P <0,05). Nejmenší počet KTJ byl zaznamenán u oligosacharidech z odrůdy Zulika (4,99 ± 0,14 log KTJ/ml). Mezi růstem *Bifidobacterium bifidum* JKM v závislosti na živných médiích byly zaznamenány statisticky významné rozdíly (P <0,05). *Bifidobacterium longum* ATCC15707 nejvíce rostl ve Wilkins-Chalgren bujónu (9,41 ± 0,02 log KTJ/ml). Srovnatelný byl růst na oligosacharidech extrahovaných z odrůdy lupiny Amiga (9,26 ± 0,10 log KTJ/ml) a Dieta (9,14 ± 0,02 log KTJ/ml). Zde nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl (P <0,05). Růst na rafinóze byl také vcelku velký (8,85 ± 0,08 log KTJ/ml). Nejméně rostl kmen *Bifidobacterium longum* ATCC15707 na oligosacharidech z lupiny Zulika. Poslední růst posuzovaný na živných médií byl u *Bifidobacterium breve* ATCC15700, kdy byly největší počty zaznamenány u rafinózy (9,57 ±

0,10 log KTJ/ml) a Wilkins-Chalgren bujónu (9,56 ± 0,07 log KTJ/ml). Mezi těmito skupinami nebyl žádný statisticky významný rozdíl (P <0,05). Z médií s oligosacharidy extrahovaných z lupin nejlépe rostlo *Bifidobacterium breve* ATCC15700 na oligosacharidech izolovaných z odrůdy Amiga (8,36 ± 0,08 log KTJ/ml), Dieta (7,55 ± 0,08 log KTJ/ml) a nejméně na RSO z odrůdy Zulika (4,25 ± 0,05 log KTJ/ml). Mezi hodnotami byl statisticky významný rozdíl (P <0,05).

Tabulka 9: Hodnoty pH při kultivaci bakterií na oligosacharidech rafinózové řady (RSO) izolovaných z jednotlivých odrůd lupiny, rafinóze a Wilkins-Chalgren bujónu s přídavkem sójového peptonu.

Bakteriální kmeny	**Živná média**				
	Lupina Amiga	**Lupina Dieta**	**Lupina Zulika**	**Rafinóza**	**Wilkins-Chalgren bujón**
B. bifidum ATCC29251	7,7	7,3	6,7	7,0	6
B. animalis ssp. *lactis* BB12	6,0	6,7	6,4	5,1	5,1
B. bifidum JKM	7,3	6,7	6,7	6,7	5,1
B. longum ATCC15707	4,1	4,1	6,4	3,8	4,1
B. breve ATCC15700	7,0	6,4	6,4	4,4	4,1



Obrázek 22: Závislost změny pH prostředí na růstu vybraných bakterií (*B. animalis* ssp. *lactis* BB12, *B. bifidum* JKM, *B. longum* ATCC15707 a *B. breve* ATCC15700) v živných mediích.

Hodnoty pH korelovaly s růstem bifidobakterií. Čím větší byl růst bifidobakterií, tím nižší bylo pH (Tab.9; Obr.22).

5.4 Kultivace bakterií ze slepého střeva nosnic

U výsledků kultivace bakterií ze slepého střeva jednotlivých skupin drůbeže byly zaznamenány pouze velmi malé rozdíly. Nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl (P <0,05) mezi složením střevní mikrobioty nosnic v závislosti na složení jednotlivých krmných dávek (Tab.10).

Tabulka 10: Počty bakterií ve slepých střevech nosnic v závislosti na požívaném krmivu (log KJT/g obsahu slepých střev ± směrodatná odchylka, n = 6).

Krmná směs	**Celkové počty anaerobních bakterií**	**Bifidobakterie**	**Laktobacily**	**Enterokoky**	***E. coli***
KKS	10,16 ± 0,35	9,76 ± 0,52	9,16 ± 0,56	<4	7,42 ± 0,65
CL_{50}	9,97 ± 0,22	9,30 ± 0,22	8,80 ± 0,27	<4	7,15 ± 1,05
CL_{100}	10,22 ± 0,24	9,81 ± 0,34	8,87 ± 0,64	<4	7,09 ± 1,21
OL_{50}	10,10 ± 0,19	9,74 ± 0,33	9,12 ± 0,29	<4	7,91 ± 0,88
OL_{100}	10,14 ± 0,28	9,61 ± 0,42	9,14 ± 0,29	<4	7,64 ± 0,48

KKS: komerční krmná směs pro nosnice N1 (ZZN Pelhřimov), CL_{50}: krmná dávka obsahující 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z celých semen lupiny, CL_{100}: krmná dávka bez sójového extrahovaného šrotu nahrazená šrotem z celých semen lupiny, OL_{50}: krmná dávka obsahující 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z odslupkovaných semen lupiny, OL_{100}: krmná dávka bez sójového extrahovaného šrotu nahrazená šrotem z odslupkovaných semen lupiny

Celkové počty bakterií se u všech sledovaných skupin pohybovaly kolem 10 log KTJ/ g. Ze sledovaných skupin byly nejpočetnější bifidobakterie. Nejvyšší počty bifidobakterií byly zaznamenány u skupiny krmené krmnou směsí CL_{100} (9,81± 0,34 log KTJ/g), nejnižší pak u skupiny krmené CL_{50} (9,30 ± 0,22 log KTJ/g). Druhou nejpočetnější skupinou byly bakterie rodu *Lactobacilus*. Hodnoty se pohybovaly okolo 9 log KTJ/g. Největší počet laktobacilů byl zjištěn u komerční krmné směsi N1 (9,16 ± 0,56 log KTJ/g) a nejmenší nárůst bakterií byl u skupiny krmené CL_{50} (8,80 ± 0,27 log KTJ/g). Počty kmene *Enterococus* sp. se pohybovaly

pod detekční hladinou experimentu (<4 log KTJ/g). Počty *Escherichia coli* se pohybovaly kolem hodnoty 7,5 log KTJ/g. Nejvíce *Escherichia coli* rostly v trávicích traktech nosnic u skupiny krmené OL_{50} (7,91 ± 0,88 log KTJ/g) a nejméně u skupiny krmené CL_{100} (7,09 ± 1,21 log KTJ/g).

6 Diskuze

Mikroorganismy jsou nedílnou součástí trávicího traktu živočichů. Složení mikrobioty se neustále mění a lze ho ovlivnit pomocí stravovacích návyků hostitele. Nejvíce lze složení ovlivnit podáváním probiotik a prebiotik. Lupina je považovaná za dobrý zdroj prebiotických oligosacharidu rafinózové řady (RSO), jelikož jich obsahuje více než jiné krmné plodiny nebo plodiny využívané pro výživu lidí. Tento předpoklad byl potvrzen při našem stanovování RSO u řepky, slunečnice, sóji a lupiny. Bylo zjištěno, že lupina bílá odrůda Zulika obsahuje 8,26 ± 0,14 g RSO na 100 g mouky tzn. 9,2 g RSO na 100 g sušiny. Ke stejným závěrům došel i Muizquiz et al. (1999), který zjišťoval množství oligosacharidů rafinózové řady ve dvouch odlišných odrůd lupiny bílé (*Lupinus albus* cv. Bardo, *Lupinus albus* cv.Bac), sóji (*Glycine max* cv. Nawiko), hrachu (*Pisum sativum* cv. Kastor), fazoli *Phaseolus vulgaris* cv. Saxa) a bobu (*Vicia fava* cv. Nadwicelanski). Nejvíce oligosacharidů rafinózové řady bylo zjištěno v odrůdách lupiny (*L. albus* cv. Bardo – 8,48 g RSO/100 g sušiny, *L. albus* cv. Bac – 8,24 g RSO/100 g sušiny) a hrachu (*Pisum sativum* cv. Kastor – 8,43 g RSO/100 g sušiny). K podobným výsledkům došel i Martieney-Villaluenga et al. (2005), který stanovoval množství RSO u třinácti španělských odrůd lupiny, z toho u šesti odrůd lupiny bílé, pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC – high performance liquid chromatography). Nejvíce oligosacharidů rafinózové řady byly zjištěny u odrůd lupiny žluté (*Lupinus luteus*), které v průměru obsahovaly 10,95 g RSO/100 g sušiny. Všechny lupiny odrůdy bílé obsahovaly přibližně 8 g RSO/100 g sušiny. Výjimkou byly odrůdy *Lupinus albus* cv. LO-3848 (6,07 g RSO/100 g sušiny) a *Lupinus albus* LO-3855, která obsahovala pouze 5,46 g RSO/100 g sušiny. Výsledky odrůd lupiny úzkolisté se v porovnání s odrůdami lupiny bílé významně nelišily. Námi zjištěné množství oligosacharidů v odrůdě lupiny bílé Zulika bylo ve srovnání s výsledky jiných autorů větší. Tyto rozdíly však nejsou nijak závratné a lze konstatovat, že množství obsahu oligosacharidů rafinózové řadě, záleží také na odrůdě plodiny. Shodné hodnoty byly zjištěné také u sóji, která podle Muizquiz et al. (1999) obsahuje 6,5 g RSO/100 g sušiny. Wongputtisin et al. (2015) uvádí, že odrůda sóji Chiang Mai60 obsahuje až 15,33 g RSO/100 g sušiny, což je 2krát více než bylo zaznamenáno námi.

Z výsledků tedy vyplývá, že lupina obsahuje více oligosacharidů rafinózové řady než ostatní vybrané plodiny. Při extrakci těchto oligosacharidů se však z 8,26 g RSO/100 g mouky vyizolovalo pouze 1,74 g RSO. Výtěžnost této metody je tedy 21 %. Nižší výtěžnost mohla být způsobena velkým množství nežádoucích sacharidů (sacharóza a galaktóza) v některých frakcích, které musely být z procesu získávání odstraněny. Malá výtěžnost mohla být také

způsobena nízkou efektivností zvolené metody. Účinnější metodu uvádí (Martínez-Villaluenga et al. 2004), kdy byla extrakce RSO prováděna přes křemelinu a dřevěné uhlí. Účinnost této metody byla 99,4 %.

Mezi nejdůležitější skupiny probiotických bakterií patří kmeny rodu *Bifidobacterium*. Proto byly pro kultivaci čistých bakterií na izolovaných oligosacharidech z lupiny vybrány zástupci bifidobakterií různého původu (*B. bifidum, B. animalis, B. longum* a *B. breve*). Při kultivaci bifidobakterií na oligosacharidech extrahovaných z lupiny byla hypotéza stimulace růstu bakterií na oligosacharidech z lupiny potvrzena u většiny testovaných kmenů. Největší růst kolonií byl však zaznamenán na Wilkins-Chalgren bujónu s přídavkem sojového peptonu. To bylo způsobeno ideálním složením živného média, které je sestavené tak, aby v něm mikroorganismy rostly co nejlépe. Nejmenší růst na oligosacharidech z odrůd lupin byl zaznamenán na odrůdě Zulika. To mohlo být způsobené rozdílným zastoupením jednotlivých izolovaných oligosacharidů v odrůdách. Obecně nejméně na živných médiích rostl kmen *Bifidobacterium bifidum* ATCC29251, který na Wilkins-Chalgren bujónu rostl jen velmi málo a na oligosacharidech z lupiny nerostl vůbec. To mohlo být způsobeno tím, že tento kmen bifidobakterií není schopný tyto oligosacharidy jako zdroj uhlíku a energie využívat. Dále mohlo dojít k ovlivnění životaschopnosti kmene při manipulaci, kdy mohl do média proniknout kyslík. Bifidobakterie jsou striktně anaerobní, ale některé kmeny jsou schopny kyslík do jisté míry tolerovat. *B. bifidum* ATCC29251 může patřit ke kmenům vysoce citlivým na kyslík.

Na mediích složených na bázi oligosacharidů rafinózové řady rostly bifidobakterie nejlépe na oligosacharidech extrahovaných z odrůdy lupiny Amiga. Tento růst byl významně lepší než na rafinóze. Růst na rafinóze byl srovnatelný s růstem na oligosacharidech z odrůdy Dieta. Z výsledků vyplývá, že kmen *Bifidobacterium longum* ATCC15707 extrahován ze stolice dospělého jedince je lépe přizpůsoben ke štěpení RSO než ostatní bifidobakterie, které byly izolované z trávicího traktu kojence nebo kysaného mléčného výrobku. Důvodem může být přirozený příjem RSO dospělého jedince na rozdíl od kojence, který přijímá spíše oligosacharidy mateřského mléka (OMM). Rozdílnost počtů narostlých bakteriálních kolonií mezi živnými médii z oligosacharidů izolovaných z lupin mohla být způsobená odlišným poměrem rafinózy a stachyózy v izolovaných oligosacharidech z jednotlivých odrůd lupin. Jelikož na živném médiu složeného z oligosacharidů z lupiny Dieta rostly přibližné stejné počty bakterií jako na živném médiu s rafinózou, je velmi pravděpodobné, že izolované oligosacharidy z odrůdy lupiny Dieta mohla obsahovat velké množství rafinózy.

Gullón et al. (2015) zkoumal růst celkového počtu anaerobních bakterií, bifidobakterií, laktobacilů společně s enterokoky, *Prevotela, Atopobium, Clostridium* a *Roseburia intestinalis*

na vzorcích z lupiny bílé (*Lupinus albus*) a bobu obecném (*Vicia faba*) (Tab. P5 Příloha). Hodnocen byl růst bakterií v závislosti na fermentaci různých uhlíkatých zdrojů v podmínkách *in vitro*. Růstové médium obsahovalo jako jediný zdroj uhlíku lupinu, bob nebo fruktooligosacharidy (FOS). Počáteční koncentrace narostlých kultur bakterií byla 10^7 KTJ/ml. Počet bakterií byl určen po 0, 7 a 24 hodinách kultivace pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Fermentace byla sledována také pomocí změny hodnot pH a tvorbou mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) a laktátu. Lupina, bob i fruktooligosacharidy (FOS) stimulovaly růst všech zkoumaných bakterií. U těchto skupin se také změnila i hodnota pH. Zvýšily se i hodnoty SCFA. Nejvíce byla ve vzorcích po fermentaci obsažena kyselina octová, propionová a máselná.

V porovnání s našimi výsledky byl nárůst bifidobakterií zvýšen pouze o jeden řád (10^7 KTJ/g → 10^8 KTJ/ml). U našich výsledků byl počet bifidobakterií nejvíce zvýšen u *B. longum* ATCC15707 rostoucí na oligosacharidech z odrůd lupiny Amiga a Dieta, a to až o 5 řádů (10^4 KTJ/g → 10^9 KTJ/ml). Nejmenší růst byl zaznamenán u bifidobakterií rostoucí na oligosacharidech z odrůdy lupiny Zulika, kde se počty bifidobakterií téměř neměnily nebo se změnily pouze o 1 (*B. bifidum* JKM) nebo 2 řády (*B. animalis ssp. lactic* BB12). Konečné počty bifidobakterií rostoucích na lupině u Gullón et al. (2015) byly však s našimi výsledky srovnatelné. Nižší nárůst bifidobakterií na lupině u Gullón et al. (2015) mohlo být způsobené příliš vysokou koncentrací bakterií na začátku kultivace, jelikož růst bakterií nepřesahoval u žádné skupiny koncentraci 10^9 KTJ/ml. U obou experimentů byl zaznamenán růst bakterií na lupině, což potvrzuje hypotézu stimulace růstu bakterií pomocí lupiny.

Když bylo zjištěno, že lupina obsahuje prebiotické oligosacharidy rafinózové řady a že mají tyto oligosacharidy bifidogenní efekt, byl proveden krmný pokus na nosnicích. Nosnice byly rozděleny do 5 skupin po 6 jedincích. Tyto skupiny byly krmeny různými krmnými směsmi, kdy bylo principem nahrazování příměsi sójového extrahovaného šrotu v různém poměru a různé podobě za lupinový šrot (KKS: komerční krmná směs pro nosnice N1, ZZN Pelhřimov, CL_{50}: krmná dávka obsahující 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z celých semen lupiny, CL_{100}: krmná dávka bez sójového extrahovaného šrotu nahrazená šrotem z celých semen lupiny, OL_{50}: krmná dávka obsahující 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z odslupkovaných semen lupiny, OL_{100}: krmná dávka bez sójového extrahovaného šrotu nahrazená šrotem z odslupkovaných semen lupiny). Po uplynutí 2 měsíců krmného pokusu byly nosnice zabity a byl proveden mikrobiologický rozbor slepých střev pomocí plotnové metody. Stanovován byl celkový počet anaerobních bakterií, bifidobakterií,

enterokoků a *Escherichia coli*. Výsledky neukázaly žádné statistiky významné rozdíly (P <0,05) mezi růstem bakterií v trávicích traktech nosnic. Krmná směs N1 obsahuje díky sóje také prebiotické oligosacharidy. Sója sice obsahuje RSO v menší míře než lupina, ale toto množství mohlo být pro správné složení mikrobioty dostačující. Tudíž další navýšení těchto prebiotických oligosacharidů mohlo být zbytečné, a proto se žádný efekt na složení mikrobioty ve slepých střevech nosnic neprojevil. Náhrada lupiny v jakékoliv podobě, která byla použita v experimentu diplomové práce, žádným způsobem negativně neovlivňovala složení mikrobioty slepých střev nosnic a měla stejný prebiotický efekt jako komerční krmná směs N1.

Zdunczyk et al. (2014) prováděli také krmný pokus na nosnicích. Nosnice byly po dobu 24 týdnů krmeny krmnou dávkou se sójou, s 10 % nebo 20 % příměsí lupiny modré. V této studii byl jednoznačně potvrzen prebiotický efekt (Tab. P6 Příloha). Počet bakterií ve slepých střevech nosnic se u skupin statisticky významně lišily (P <0,05). U skupin krmené lupinou byl zjištěn vyšší celkový počet anaerobních bakterií než u kontrolní skupiny krmené sójou. Skupiny krmené lupinou měli také zvýšené počty zdravý prospěšných bakterií (laktobacily, enterokoky a bifidobakterie). U těchto skupin byly také významně sníženy počty potenciálně patogenních bakterií (*Escherichia coli, Bacteroides* sp. a *Prevotella* sp.). Složení krmné dávky nemělo vliv na počty bakterií čledi Clostridiaceae. Hodnota pH byla u skupiny krmené s 20 % lupiny nejnižší. V porovnání s našimi výsledky byly celkové počty anaerobních bakterií u pokusu Zdunczyk et al. (2014) stále o jeden řád nižší (10^9 KTJ/g) než u našich výsledků (10^{10} KTJ/g). Stejně tomu bylo i u bifidobakterií a laktobacilů. Počty *Escherichia coli* byly u krmné dávky se sójou o jeden řád vyšší (10^8 KTJ/g) než u našich krmiv (10^7 KTJ/g), ale o jeden řád nižší u krmiv s příměsí 10 % a 20 % lupiny (10^6 KTJ/g). Vzhledem k vyššímu celkovému počtu anaerobních bakterií, bifidobakterií a laktobacilů ve slepých střevech nosnic u našich výsledků, lze konstatovat, že složení krmných dávek bylo s ohledem na obsah probiotických bakterií celkově lepší u našich krmných směsí než u Zdunczyk et al. (2014).

Podobnou problematikou se zabývali Geigerová et al. (2017), kdy zkoumali růst bakterií ve voleti a slepých střevech brojlerových kuřat, a kachen, po podání krmné dávky s rozdílným složením (L_0: krmná dávka s příměsí sójové mouky, L_{50}: krmná dávka s příměsí složené z 50 % sójové mouky a 50 % lupinové mouky, L_{100}: krmná dávka s příměsí lupinové mouky) (Tab. P7 Příloha). V porovnání s našimi výsledky, byly počty bakterií v trávicím traktu brojlerových kuřat i kachen menší. Jelikož je brojler mladší než dospělá nosnice, nemusí mít ještě plně vyvinutou střevní mikrobiotu a počty bakterií jsou tak v trávicím traktu menší. Složení střevní mikrobioty se u kachen i slepic liší, jelikož je to jiný živočišný druh. Slepice mají ve slepých střevech vyšší počet bifidobakterií a laktobacilů. Ve studii Geigerová et al. (2017) byl na rozdíl

od našich výsledků prokázán statisticky významný rozdíl (P <0,05) v růstu laktobacilů ve slepých střevech brojlerových kuřat krmené krmnou směsí L_{100} v porovnání s ostatními krmnými směsmi (L_0, L_{50}). To mohlo být způsobené nedostatečnou příměsí sóji v krmné dávce (L_0) pro brojlery a tím i nedostatečným množstvím RSO v krmivu. Tím, že byla sója zcela nahrazena lupinou, množství RSO se zvýšilo a byl prokázán prebiotický efekt.

U kachen byl pozorován statisticky významný rozdíl (P <0,05) u dvou rodů bakterií. Počet bifidobakterií a laktobacilů ve slepých střevech zvířat krmené krmnou směsí obsahující lupinovou moukou byl vyšší než u krmné dávky obsahující pouze sójovou mouku. Lze tedy konstatovat, že lupina je jako zdroj prebiotických oligosacharidů vhodnější pro kachny než kuřata.

Rubio et al. (1998) sledoval růst laktobacilů a *Escherichia coli* v trávicím traktu kuřat brojlerů ve věku 3 a 4 týdnů po podání krmiva obsahující lupinu úzkolistou (*Lupinus angustifolius*) (Tab. P8 Příloha). Počty bakterií ve slepém střevě kuřat byly u laktobacilů i *Escherichia coli* nižší u našich výsledků. Podávání krmné dávky s lupinou nemělo, jako u našich výsledků, na růst *Escherichia coli* statisticky významný vliv (P <0,05). Statisticky významný rozdíl (P <0,05) byl ale pozorován u růstu laktobacilů při podání krmné dávky s obsahem lupiny a kontrolní skupinou (krmná dávka s příměsí sóji). Počet laktobacilů po konzumaci krmné dávky s lupinou v trávicím traktu brojlerů vzrostl.

Prokázáním prebiotických účinků u kuřat brojlerů ve studii Geigerová et al. (2017) a Rubio et al. (1998) mohlo být také způsobeno tím, že brojleři nemusí mít ještě plně vyvinutou a ustálenou mikrobiotu, tuďíž je lépe ovlivnitelná než mikrobiota u již dospělých nosnic.

Existují studie prováděné také na prasatech. Kasprowicz-Potocka et al. (2017) pozorovali růst střevních bakterií v kyčelníku a slepém střevě prasat po podání krmné dávky s příměsí sóji (L_0), směsi sóji s lupinou (L_{50}) a samotné lupiny (L_{100}). Statisticky významný rozdíl (P <0,05) byl pozorován u růstu celkového počtu anaerobních bakterií a enterobakterií v kyčelníku prasat. Nejvíce anaerobních bakterií se vyskytovalo u skupiny krmené dávkou s příměsí samotné lupiny (L_{100}). Enterokokům se nejméně dařilo u skupin krmené krmnou dávkou s příměsí sóji (L_0). Ve slepém střevu prasat byl statisticky významný rozdíl (P <0,05) pozorován pouze u růstu kvasinek a plísní. Prasata krmené krmnou dávkou se sójou (L_0) měla ve slepých střevech mnohem více kvasinek a plísní než prasata krmená ostatními krmnými směsi (L_{50} a L_{100}). Lze tedy říci, že příměsí lupiny do krmiva lze u prasat ovlivnit složení střevní mikrobioty.

Zaworska et al. (2017) zkoumala vliv fermentace lupiny na osídlení střevní mikrobioty v kyčelníku prasat. Fermentace lupiny vedla ke zvýšení stravitelnosti lupiny, množství surového proteinu, jednotlivých aminokyselin, vlákniny, tuku a popelovin. Došlo ke snížení

dusíkatých látek a oligosacharidů rafinózové řady. Tato změna ovšem neměla významný vliv na složení střevní mikrobioty u pokusných skupin prasat. Neprojevil se ani statisticky významný rozdíl v osídlení střevní mikrobioty mezi skupinami krmené sójou a lupinou.

Jensen et al. (2013) posuzovali, zdali zahrnutí sušeného kořene čekanky nebo semen lupiny modré (zdroj prebiotik) do krmiva prasat ovlivní jejich střevní mikrobiotu. Výkrm byl prováděn na 48 prasatech po dobu 1 nebo 2 týdnů před porážkou. Analýza složení střevní mikrobioty byla stanovována pomocí metody PCR. Sledovány byly počty bifidobakterií a termofilní *Campylobacter* spp. (hlavně *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*). Změny složení střevní mikrobioty byl u prasat krmených lupinou zaznamenán už po prvním týdnu, kdy se počty bifidobakterií ve slepém střevu značně zvýšily a počty *Campylobacter* spp. se významně snížily.

V experimentech zabývající se výkrmem prasat lupinou a následným stanovením složení jejich střevní mikrobioty, byly zjišťovány jiné kmeny bakterií a mikroorganismů než u slepic. Nejčastěji se u slepic stanovovaly celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterie, laktobacily a *Escherichia coli*. U prasat se stanovovaly celkové počty anaerobních bakterií, bakterie mléčného kvašení, enterobakterie a kvasinky a plísně. Nejčastěji byly pokusy na prasatech zaměřeny spíše na 3. část tenkého střeva (kyčelník). Prasata měla ve slepém střevě nižší celkový počet anaerobních bakterií než slepice. U počtu bakterií ve slepém střevě u prasat nebyly, až na počty kvasinek a plísní, prokázány statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$). Důvodem rozdílného složení střevní mikrobioty u prasat a slepic, je jiná stavba trávicího traktu zvířete a zároveň odlišné složení krmiva.

Ve studii zabývající se růstem bakterií v trávicím traktu krys byly stanovovány stejné kmeny bakterií jako u našeho experimentu (celkové počty anaerobních bakterií, bifidobakterie, laktobacily, enterokoky a *Escherichia coli*). Po podávání různých krmných dávek se počty bakterií ve slepých střevech u jednotlivých skupin, se na rozdíl od našich výsledků, značně lišily (Bartkiene et al. 2013). Skupiny byly krmeny krmnou dávkou se sójou, lněným semínkem, lupinou žlutou a lupinou bílou. Skupiny krmené odrůdami lupin vykazovaly větší počty celkových anaerobních bakterií, laktobacilů a bifidobakterií. Nejvyšší počty bakterie *Escherchia coli* byly pozorovány u krmné dávky se sójou. Nejpříznivější vliv na složení střevní mikrobioty u krys vykazovala skupina krmená lupinou žlutou.

Hodnoty počtu laktobacilů a bifidobakterií u krys krmené lupinou byly shodné s našimi výsledky (10^9 KTJ/g). U krys byl sledován celkově vyšší počet enterokoků (10^4 KTJ/g obsahu slepých střev krys; $<10^4$ KTJ/g obsahu slepých střev nosnicc) a nižší počet celkového počtu anaerobních bakterií (10^9 KTJ/g – obsahu slepých střev krys; 10^{10} KTJ/g – obsahu slepých střev

nosnic) a *Eschericha coli* (10^1 KTJ/g – obsahu slepých střev krys; 10^7 KTJ/g – obsahu slepých střev nosnic).

Uvedené výsledky na zvířatech není vždy možné mezi sebou porovnávat, protože se jednalo o rozdílné živočišné druhy s rozdílnou fyziologií trávicího traktu a přirozenými rozdíly ve složení mikrobioty trávicího traktu. Jednotlivé výzkumné týmy se také zaměřovaly na odlišné mikrobiální skupiny a k získání svých výsledků použily různé metody. Z popsaných výsledků však jednoznačně vyplývá, že lupina má podobný prebiotický efekt jako sója. Sója tedy může být v krmivech nahrazována lupinou. Dá se předpokládat, že podobně tomu bude i ve výživě lidí.

7 Závěr

- Bylo potvrzeno, že lupina obsahuje oligosacharidy rafinózové řady. Množství RSO v semenech je rozdílný u různých plodin i odrůd, ale i přes mírné odchylky bylo potvrzeno, že lupina obsahuje v semenech největší podíl RSO.
- Tyto oligosacharidy se podařilo ze semen extrahovat v podobě bílého prášku. Zvolená extrakce nebyla příliš účinná (21 %), ale bylo získáno dostatečné množství oligosacharidů pro další testování.
- Pokus s čistými kmeny bifidobakterií potvrdil předpoklad růstu těchto probiotických bakterií na izolovaných oligosacharidech rafinózové řady z lupiny.
- Krmný pokus u nosnic neprokázal změnu ve složení střevní mikrobioty v závislosti na obsahu lupiny v krmivu. S ohledem na prebiotický účinek, lze lupinu doporučit jako náhradu za sóju v krmné dávce pro nosnice.

8 Literatura

Aniszewski T, Ciesiolka D, Gulewicz K. 2001.Equilibriumbetween basic nitrogen compounds in lupine seeds with differentiated alkaloid content. Phytochemistry **57** (1): 43-50.

Arybarstvi, specialista na rybářské návnady. Vlčí bob lupina v nálevu Cukk Lupin 225 g. Available from http://www.arybarstvi.cz/vlci-bob-lupina-v-nalevu-cukk-lupin-225-g-6466.html (accessed December 2017).

Arnoldi A, Boschin G, Resta D, Scigliuolo G, Sirtori E. 2011. Thenutraceutical propertiesof lupin seed: focus on proteins and peptides. In: Abstractsofthe 13th International lupin konference. Lupin crops – anopportunity for today, a promise for the future. Poznań, Poland, pp. 169.

Bartkiene E, Juodeikiene G, Vidmantiene D, Zdunczyk Z, Zdunczyk P, Juskiewicz J, Cizeikiene D, Matusevicius P. 2013. Influence of diets to Wistar rats supplemented with soya, flaxseed and lupine products treated by lactofermentation to improve their gut health. International Journal of Food Sciences and Nutrition **64**(6): 730-739.

Bezpecnostpotravin. 2004. Informační centrum bezpečnosti potravin. Probiotika jako léčivo pro drůbež. Available from https://www.bezpecnostpotravin.cz/probiotika-jako-lecivo-pro-drubez.aspx (accessed February 2019).

Bioobchod. Přírodní produkty. Lupinové kafe pražené mleté BIO 250g. Available from http://www.bioobchod.cz/kava-lupinova-prazena-mleta-bio-250g (accessed December 2017).

Bláha V, Víšek J. 2011. Význam prebiotik v potravě. Practikus **8**: 25-28.

Blaser MJ. 2015. Mizející mikroby. Jak nadměrné užívání antibiotik vyvolává epidemie moderní doby. Slovart s.r.o.. ISBN: 978-80-7391-228-4.

Bohačenko I, Pinkrová J. 2014. Stanovení obsahu fruktanů metodou HPLC s refraktometrickou detekcí. Listy cukrovarské a řepařské **1**: 28-32.

Broekaert WF, Courtin CM, Verbeke K, Van de Wiele T, Verstaete W, Delcour JA. 2011. Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans, arabinoxylan-aligosaccharides, and xylooligosaccharides. Crit. Rev. Food Sci. Nutr **51**: 178-194.

Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical biochemistry **72**: 248-254.

Charalampopoulos D, Rastall R. 2012. Prebiotics in foods. Curr. Opin. Biotechnol. **23**: 187-191.

Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. 2016. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. Scientific reports 6: 1-13.

De Reu JC, Linssen VAJM, Rombouats FM, Nout MJR. 1997. Consistency polysaccharidase activites and non-starch polysaccharides content of soya beans during tempe fermentation. J. Sci. Food Agric. **73**: 357-363.

Ekvall J, Stegmark R, Nyman M. 2007. Optimization of extraction methods for determination of the raffinose family oligosaccharides in leguminous vine peas (Pisum Sativum L.) and effects of blanching. Journal Food Comp. And Anal **20**: 13-18.

Elixir. Váš elixír zdraví a krásy. PURYA! Bio Vegan Lupina protein 200 g. Available from https://hwww.elixi.cz/purya-bio-vegan-lupina-protein-200-g-p46228/. (accessed December 2017).

Estermann MT. 2013. Začínáme s chovem slepic, hus a kachen. Víkend s.r.o. ISBN 978-80-7433-060-5.

European Parliament. 2006. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European parliament and of the council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. OJEU: 9-25.

WHO. 2001. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. World Health Organization. Available from http://who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf. (accessed December 2017).

Frühauf P. 2011. Mikrobiota v období mezi 6. a 24. měsícem. Pediatr pro praxi, **12** (3): 214-216.

Fuller R. 1992 Probiotics. The Scientific Basis. Chapman & Hall, London, U. K.

García-Ruiz AI, García-Palomares J, García-Rebollar P, Chamorro S, Carabaño R, de Blas J. C. 2006. Effectof protein source and enzyme supplementation on ileal protein digestibility and fattening performance in rabbits. Span. J. Agric. **4**: 297-303.

Geigerová M, Vlková E, Skřivanová E, Bunešová V. 2014. Odlišnost v mikrobiotě trávicího traktu různých druhů savců a možnosti jeho ovlivnění. Veterinářství **7**: 522-526.

Geigerová M, Švejstil R, Skřivanová E, Straková E, Suchý P. 2017. Effect of dietary lupin (Lupinus albus) on the gastrointestinal microbiota composition in broiler chickens and ducks. Czech J. Anim. Sci. **62**: 369–376.

Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. **125** (6): 1401-1412.

Gibson GR, Probert HM, Loo, JV, Rastall RA, Roberfroid MB. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Reviews. **17**(2):259-275.

Gismondo MR, Drago L, Lombardi A. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora, int. J. Antimicrob. Agents **12**: 287-292

Goffin D, Delzenne N, Blecker C, Hanon E, Deroanne C, Paquot M. 2011. Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the European and American market? The status of knowledge on these prebiotics. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **21**: 394-409.

Green BT, Panter KE, Lee ST, Welch KD, Pfister JA, Gardner DR, Stegelmeier BL, Davis TZ. 2016. Differences between Angus and Holstein cattle in the Lupinus Leucophylus induced inhibition of fetal acticity, Toxicon **106**: 1-6.

Gugołek A, Juskiewicz J, Kowalska D, Zwolinski C. 2018. Physiological responses of rabbits fed with diets containing rapeseed meal, white lupine and pea seeds as soybean meal substitutes. Ciencia Agrotecnologie **42**(3): 297-306.

Gullón P, Gullón B, Tavaria F, Vasconcelos M, Gomes AM. 2015. In vitro fermentation of lupin seeds (Lupinus albus) and broad beans (Vicia faba): dynamic modulation of the intestinal microbiota and metabolomic output. Food & Function **6**(10): 3316–3322.

Hara T, Ikeda N, Hatsumi K, Watabe J, Lino H, Mitsuoka T. 1997. Effects of small amount ingestion of soybean oligosacharides on bowel habits and fecal flora of volunteers. Jap. J. Nutr. **55**: 79-84.

Hernández-Hernández O, Marín-Manzano MC, Rubio LA, Moreno FJ. Sanz ML, Clemente A. 2012. Monomer and linkage type of galacto-oligosaccharides affect their rezistnce to ileal digestion and prebiotic properties in rats. J. Nutr. **142**: 1232-1239.

Hill MJ. 1995. The normal gut bacterial flora. In: Role of Gut Bacteria in Human Toxicology and Pharmacology, Hil, M. J. (ed.), Taylor and Francis, London: 5-30.

Homolka P, Kudrna V. 2007. Uplatnění lupiny ve výživě přežvýkavců. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha: 44.

Honig DH, Rackis JJ. 1979. Determination of the total pepsin pancreatin idigestible content (dietary fiber) of soybean products, wheat bran and corn bran. J. Agric. Food Chem. **27**: 1262-1266.

Hosono A. 1992. Fermented Milk in the Orient. In: Functions of Fermented Milk: Challenges for the Health Sciences, Y. Nagasawa, A. Hosono (Eds.) ElsevierApplied Science, London, UK: 61-78.

Hradský M. 2019. Hradsky-sunk, Biovitax-pro – 200g probiotika do vody, nebo na krmivo. Available from https://www.hradsky-sunk.cz/ochrana-prevence/biovax-pro-prirodni-probiotikum-200g (accessed January 2019).

Hýbl M, Ondřej M, Seidenglanz M, Vaculík A. 2011. Metodika pěstování lupiny bílé, žluté a úzkolisté. Certifikovaná metodika. Asociace pěstitelů a zpracovatelů luskovin, ISBN: 978-80-87360-02-6, pp. 36.

Jensen AN, Hansen LL, Baggesen DL, Mølbak L. 2013. Effects of feeding finisher pigs with chicory or lupine feed for one week or two weeks before slaughter with respect to levels of Bifidobacteria and Campylobacter. Animal **7**(1): 66-74.

Ježková. 2012. Jedinečná probiotika. Náš chov. Available from https://www.naschov.cz/jedinecna-probiotika/ (accessed January 2019).

Kasprowicz-Potocka M, Zaworska A, Kaczmarek S, Hejdysz M, Mikuła R, Rutkowski A. 2017. The effect of Lupinus albus seeds on digestibility, performance and gastrointestinal tract indices in pigs. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition **101** (5): 216-224.

Kohajdová Z, Karovičová J, Schmidt Š. 2011. Lupin composition and possible in bakery. A review. Czech Journal Food Science, **29** (3): 203-211.

Kolida S, Gibson GR. 2011. Synbiotics in healt and disease. Annu Rev Food Sci Technol **2**: 373-393.

Larbier M, Leclercq B. 1994. Nutrition and feeding of poultry. Nottingham University press, Loughborough, Leicestershire: 305.

Lee JH, Choung MG. 2011. Comparison of nutritional components in soybean varieties with different geographical origins. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, **54**: 254-263.

Lekarna. První internetova lékárna v ČR. Laktulosa sandoz 670 mg/ml 1x500ml/335gm IIA Roztok. Available from https://www.lekarna.cz/laktulosa-sandoz-670mg-ml-1x500ml-335gm-iia-roztok/ (accessed December 2017).

Lilly DM, Stillwell RH. 1965. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms, Science **147**: 747-748.

Lutful Kabir SM. 2009. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. International Journal of Molecular Sciences. Molecular Diversity Preservation International **10** (8): 3531–3546.

Macfarlane GT, Cummings JH. 1991. Thecolonicflora, fermentation and largebowel digestive function. In: The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease (Phillips, S. F., Pemberton, J. H. & Shorter, R. G., eds.). Raven Press, New York, NY: 51-92.

Marieb EN, Malat J. 2005. Anatomie lidského těla. CP Books, a.s. Brno, ISBN 80-251-0066-9.

Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodriguez M. 2003. Human milk is source of lactic acid bacteria for the infant gut. J Pediatr **143**: 754-758.

Martínez-Villaluenga C, Frias J, Gulewicz K, Vidal-Valverde C. 2004. Improved method to obtain pure alpha-galactosides from lupin seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry **52** (23): 6920-6922.

Martínez-Villaluenga C, Frías J, Vidal-Valverde C. 2005. Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. Food Chemistry **91**: 645-649.

Metchnikoff, II. 2004. The Prolongationof Life: Optimistic Studies, Springer Publishing Company, New York, NY, USA.

Mezlík T. 2008 Přehled registrovaných odrůd sóji, lupiny a bobu. Úroda **12**: 50-53.

Minkevič IA, Borkovskij VJ. 1953. Olejniny. (Překlad z ruského originálu Masličnyje kultury, Selchozgiz Moskva 1952). Vydání první. Praha: SZN, pp. 394.

Mitsuoka T. 1992. The human gastrointestinal tract. In: B. J. B. Wood (Ed.): The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Elsevier Appl. Sci., London: 69-114.

Morgan NK, Kerqin C, Wallace A, Wu S, Choct M. 2019. Effect of arabinoxylo-oligosaccharides and arabinoxylans on net energy and nutrient ulitization in brojlers. Animal nutrition **5**(1): 56-62.

Musilová Š, Rada V. 2015. Vliv oligosacharidů mateřského mléka na střevní mikrobiotu člověka. Pediatrie pro praxy **16**(1): 17-19.

Muzquiz M, Burbano C, Pedrosa MM, Folkman W, Gulewicz K. 1999. Lupins as a potential source of raffinose family oligosaccharides Preparative metod for their isolation and purification. Indus. Crops and Prod. **19**: 183-188.

Myprotein. Fuel your ambition. Inulin. Available from https://www.myprotein.cz/sports-nutrition/inulin/10530732.html (accessed December 2017).

Niness KR. 1999. Inulin and oligofructose: what are they? J. Nutr. **129**: 1402-1406.

Nováková E. 2012. Balastní látky a prebiotika v pekařské výrobě. Potravinářská revue 2/2012: 13-15.

Nutri-extract. Špiškové sportovní suplementy. GOS rozpustná vláknina. Available from https://www.nutri-extract.cz/produkt/47/gos-rozpustna-vlaknina/ (accessed December 2017).

Olkowski B. 2018. Feeding high lupine based diets for broiler chickens: Effect of soybean meal substitution with yellow lupine meal at various time points of growth cycle. Livestock Science 218: 114-118.

Osiva-semena. Lupina. Available from http://www.osiva-semena.cz/search.php?orderby=position&orderway=desc&search_query=lupina&submit_search=Hledat. (accessed December 2017).

Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C. 2012. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology **2** (104): 1-11.

Panesar PSA. Kumari, S. 2011. Lactulose: Production, purification and potential applications. Biotechnol. Advan **29**: 940-948.

Polák J. 1955. Strukoviny. Vydání první. Bratislava: SVPL, p. 216.

Portugal shop. Tremocos do olival, luštěnina, 350 g. Available from http://www.portugalshop.cz/tremocos/tremocos-do-olival-lustenina-350-g (accessed December 2017).

Perez-Muñoz ME, Arrieta M, Ramer-Tait AE, Walter J. 2017 A critical assessment of the „sterile womb“ and „in utero colonization“ hypotheses: implications for resarch on the pioneer infant microbe. Microbiome 5(48): 1-19.

Preter DV, Verbeke K. 2015. Functional aspects of probiotics and the impact on human health. Probiotics and Prebiotics: Current Research and Future Trends. Norfolk, UK: Caister Academic Press, ISBN-10: 1910190098, 13-26.

Priebe MG, Vonk RJ, Sun X, He T, Harmsen HJ. Welling GW. 2002. The physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with pre and probiotics. Eur. J. Nutr. **41**: 12-10.

Rada V, Marounek A. 2005. Probiotika a prebiotika ve výživě zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha: 1-42.

Rada V. 2010. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. Interní medicína pro praxi **12**(2): 92-97.

Rada V, Švejstil R. 2016. Netradiční probiotikum na bázi bakterií rodu Clostridium a jeho využití ve výživě kuřecích brojlerů. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha: 1-32.

Rios de Souza V, Menezes CC, Cunha LR, Pereira PAP, Pinto UM. 2015. Prebiotics: Technological aspects and human health. Probiotics and Prebiotics: Current Research and Future Trends. Norfolk, UK: Caister Academic Press, ISBN-10: 1910190098: 275-288.

Roberfroid M. 2007. Prebiotics: The Concept Revisited. J. Nutr. **37**: 830-837.

Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, Mccartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. Br. J. Nutr. **104**:1-63.

Rubio LA, Brenes A, Setien I, De La Asuncion G, Duran N, Cutuli MT. 1998 Lactobacilli counts in crop, ileum and caecum of growing broiler chickens fed on practical diets containing whole or dehulled sweet lupin (Lupinus angustifolius) seed meal. British Poultry Science **39** (3): 354-359.

Rudolfová J, Čurda L. 2005. Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. Chemické listy **99**: 168-174.

Rycroft CE, Jones RM, Gibson GRA, Rastall RA. 2001. A comparative *in vitro* avaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. J. Appl. Microbiol **91**: 878-887.

Sarkar S. 2013. Potentialofprobiotics as pharmaceutical agent: a review. BFJ **115**: 1658-1687.

Sevim S, Topal GC, Tengilimoglu-Metin MM, Sancak B, Kizil M. 2019. Effects of inulin and lactic acid bacteria strains on aflatoxin M1 detoxification in yoghurt. Food control **100**: 235-239.

Silk DB, Dvis A, Vulevic J, Trotzis G, Gibson GR. 2009. Clinical trial: theeffectsof a trans-galactooligosacharideprebiotic on faecalmicrobiota and symptoms in irritablebowel syndrome. Aliment. Pharmacol. Ther. **29**: 508-518.

Silvia RF. 1996. Use of inulin as a natural texture modifier. Cereal Foods World **41**: 792-794.

Shang Y, Kumar S, Thippareddi H, Kim WK. 2018. Effect od fietary fructooligosaccharie (FOS) supplementation on ileal microbiota in brojler chickens. Poultry Science 97(10): 1-13.

Skřivanová E, Čermák L. 2017. Hygienické aspekty pastevního chovu drůbeže (Gallus gallus f. domestica. Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i.: 1-32.

Smith HW. 1965. The developmennt of the flora of the elimentary tract in chickens. Poultry Sci. **43**: 13-61.

Smith SC, Choy R, Johnson SK, Hall RS, Wildeboer-Veloo ACM, Welling GW. 2006. Lupin kernel fiber consuption modifies fecal microbiota in healthy men as determined by rRNA gene fluorescent in situ hybridization. European Journal of Nutrition **45**(6): 335-341.

Soccol CR, de SouzaVandenberghe LP, Spier MR, Medeiros ABP, Yamaguishi CT, de DeaLindner J, Pandey A, Thomaz-Soccol V. 2010. Thepotentialofprobiotics: A review. Food Technol. Biotechnol. **48** (4): 413-434.

Solař S. 2010. Prebiotika a probatika v klinické praxi. Medicína pro praxi **7**(1): 14-18.

Stewart ML, Timm DA, Slavin JL. 2008. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an *in vitro* fermentation system. Nutr. Res. **28**: 329-334.

Suchý P, Straková E, Herzig I. 2016. Možnosti využití lupiny bílé ve výživě zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha: 1-43.

Štranc P, Štranc J, Štranc D. 2008 Nové poznatky o pěstování lupiny v ČR (1. část). Úroda **3**: 72-74.

Tefera G, Tegegne F, Mekuriaw Y, Melaku S, Tsunekawa A. 2017. Effects of different forms of white lupin (Lupinus albus) grain supplementation of feed intake, digestibility, growth performance and carcass characteristics of Washera sheep fed Rhodes grass (Chleris gayana) hay-based diets. Tropical animal health and production **47**(8): 1581-1590.

Torok VA, Hughes RJ, Mikkelsen LL, Perez-Maldonado R, Balding K, Macalpine R, Percy, N J, Ophel-Keller K. 2011. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. Applied and Environmental Microbiology. **9**: 5868–5878.

TOXNET. 2017. U. S. National Library of Medicine. Available from https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/ (accessed December 2017).

Tuohy KM, Rouzaud GCM, Bruck WM, Gibson GR. 2005. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics – assessment of efficacy. Curr. Pharm. Des. **11**: 75-90.

Van Loo J, Cummings J, Delzenne N. 1999. Functional food propertiesof non-digestibleoligosaccharides: a consensus report fromthe ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). Br J Nutr. **81**: 121-132.

Van Loo J. 2004. The specificity of the interaction with intestinal bacterial fermentation by prebiotics determines their physiological efficacy. Nutr. Res. Rev. **17**: 89-98.

Vazquez MJ, Alonso JL, Dominguez H, Parajo JC. 2002. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. Trends food Sci Technol **11**: 387-393.

Ventura M, Turroni F, Canchaya C, Vaughan EE, O'Toole PW, van Sinderen D. 2009. Microbial diversity in the human intestine and novel insights from metagenomics. Font. Biosci. **14**: 3214-3221.

Vlková E, Rada V, Trojanová I. (2004). Enumeration, isolation and identification of bifidobacteria from dairy products. Acta Agric. Slovenica **84**: 31-36.

Vrabec M. 2008. Charakteristika a metodika pěstování lupin na základě výsledků výzkumu a šlechtění ve světě, s přihlédnutím k podmínkám v ČR. Available from http://selgen.cz/sprava/wp-content/uploads/2012/01/2008_01_25_metodika_lupina.pdf (accessed December 2017).

Volek Z. 2009. Využití lupiny bílé (Lupinusalbus, odrůdaAmiga) ve výkrmu brojlerových králíků. Certifikovaná metodika. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., ISBN: 978-80-7403-033-8: 1-16.

Volek Z, Bureš D, Uhlířová L. 2018. Effect of dietary dehulled white lupine seed supplmentation on the growth, carcass traits and chaémical and sensory meat quality parameters of growing-fattening rabbits. Meet science **141**: 50-56

Walmark a.s. Klub zdraví. Laktobacily COMPLEX s fruktooligosacharidy. Available from https://www.klubzdravi.cz/produkty/laktobacily-complex-s-fruktooligosacharidy_2871.aspx (accessed December 2017).

Ward RE, Niñonuevo M, Mills DA, Lebrilla CB, German JB. 2006. In Vitro Fermentation of Breast Milk Oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. Appl. Environ. Microbiol **72** (6): 4497-4499.

Woodsmansey EJ. 2007. Intestinal bacteria and ageing. J. Appl. Microbiol.**102**: 1178-1186.

Wongputtisin P, Ramaj R, Unpaprom Y, Kawaree R, Pongtrakul N. 2015. Raffinose family oligosaccharides in seed of *Glycine max* cv. Chiang Mai60 and potential source of prebiotic substances. Inter. J. of Food Science and Technol. **50**: 1750-1756.

Wu S, Tao N, German JB, Grimm R, Lebrilla CB. 2010. Development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides. J Proteome Res **9**: 4138-4151.

Yves Rocher. Créatur de la cosmetique végétela. Šampon podporující růst vlasů. Available from https://www.yves-rocher.cz/sampon_podporujici_rust_vlasu (accessed December 2017).

Zaworska A, Frankiewicz A, Kasprowicz-Patocka M. 2017. The influence of narow-leafed lupin seed fermentation on their chemical composition and ileal digestibility and microbiota in growing pigs. Archives of snimal nutrition **71** (4): 285-296.

Zbořil V, Prokopová L, Hertlová M. 2005. Mikroflóra trávicího traktu klinické souvislosti. Praha. Grada publishing, a.s. ISBN 80-247-0584-2.

Zelenka J. 2015. Základy výživy drůbeže. Společnost mladých agrárníku České republiky. Praha: 1-38.

Zdunczyka Z, Jankowski J, Rutkowski A, Sosnowska E, Drazbo A, Zdunczyka P, Juskiewicz J. 2014. The composition and enzymatic activity of gut microbiota in laying hens fed diets supplemented with blue lupine seeds. Animal Feed Science and Technology **191**: 57–66.

9 Samostatné přílohy

Tabulka P1: Základní chemický rozbor krmiv (g/kg krmiva)

Chemický rozbor krmiv			KKS	LC50	LC100	LO50	LO100
Voda		g/kg	112,2	110,4	110,5	113,4	109,3
Sušina – stanovení vlhkosti		g/kg	887,9	889,6	889,5	886,6	890,7
Dusíkaté látky (NL)		g/kg	144,7	158,4	193,5	162,1	167,5
Stanovení tuku	**Ether**	g/kg	x	x	x	x	x
	Petrolether	g/kg	17,5	29,4	45,8	31,4	41,3
Číslo kyselosti tuku (ČKT)		mg KOH/g tuku	45,3	31,7	15,3	21,8	19,4
Tuk po hydrolýze		g/kg	x	x	x	x	x
Vláknina		g/kg	18,7	19,0	24,6	26,2	49,8
Acidodetergentní vláknina (ADF)		g/kg	34,3	43,1	52,0	64,5	97,7
Neutrálnědetergentní vláknina (NDF)		g/kg	133,0	93,5	210,2	278,1	237,9
Acidodetergentní lignin (ADL)		g/kg	10,7	22,0	24,9	27,8	28,2
Bezdusíkaté látky výtažkové (BNLV)		g/kg	617,3	589,5	571,3	604,5	571,6
Škrob		g/kg	495,0	425,0	430,5	465,2	411,5
Organická hmota		g/kg	798,2	796,3	835,2	824,2	830,2
Popel		g/kg	89,7	93,3	54,3	62,4	60,5
Fosfor (P) – fotometricky		g/kg	3,8	3,2	3,4	3,0	3,5
Spalné teplo (BE) – kalorimetricky		MJ/kg	15,3	15,3	16,8	16,1	16,1
NaCl		g/kg	2,51	3,53	1,75	1,87	1,81
pH		×	6,2	6,0	5,9	6,1	5,9
	N	g/kg	22,3	24,6	30,7	26,1	26,4
Elementární	**C**	g/kg	416,8	416,7	442,0	434,0	433,3
analýza	**H**	g/kg	61,3	61,6	63,5	63,2	59,1
	S	g/kg	2,0	2,1	2,2	2,1	2,0

KKS: komerční krmná směs pro nosnice N1 (ZZN Pelhřimov), CL_{50}: krmná dávka obsahující 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z celých semen lupiny, CL_{100}: krmná dávka bez sójového extrahovaného šrotu nahrazená šrotem z celých semen lupiny, OL_{50}: krmná dávka obsahující 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z odslupkovaných semen lupiny, OL_{100}: krmná dávka bez sójového extrahovaného šrotu nahrazená šrotem z odslupkovaných semen lupiny

Tabulka P2: Chemický rozbor aminokyselinv v jednotlivých krmivech (g/kg krmiva).

Aminokyseliny			*KKS*	*CL50*	*CL100*	*OL50*	*OL100*
ASPARAGOVÁ	***Asp***	g/kg	11,1	12,3	16,3	13,4	13,2
THREONIN	***Thr***	g/kg	4,4	4,9	6,1	5,6	5,0
SERIN	***Ser***	g/kg	6,3	7,0	8,8	7,8	7,6
GLUTAMOVÁ	***Glu***	g/kg	31,4	34,1	43,5	37,8	37,3
PROLIN	***Pro***	g/kg	12,7	12,0	13,5	12,2	12,1
GLYCIN	***Gly***	g/kg	5,4	6,1	6,7	6,6	6,2
ALANIN	***Ala***	g/kg	5,8	5,9	6,4	6,1	5,5
VALIN	***Val***	g/kg	3,6	5,0	5,2	5,8	4,4
METHIONIN	***Met***	g/kg	1,6	2,6	1,6	0,9	1,1
ISOLEUCIN	***Ile***	g/kg	5,6	4,7	7,1	5,7	4,9
LEUCIN	***Leu***	g/kg	10,2	9,1	13,0	10,2	10,7
TYROSIN	***Tyr***	g/kg	2,9	3,5	4,1	4,7	4,4
FENYLALANIN	***Phe***	g/kg	5,1	4,9	5,2	5,7	4,0
HISTIDIN	***His***	g/kg	3,2	3,2	3,7	3,7	3,1
LYSIN	***Lys***	g/kg	6,9	8,1	8,7	7,9	7,5
ARGININ	***Arg***	g/kg	8,4	12,8	19,5	12,1	13,6

KKS: komerční krmná směs pro nosnice N1 (ZZN Pelhřimov), CL_{50}: krmná dávka obsahující 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z celých semen lupiny, CL_{100}: krmná dávka bez sójového extrahovaného šrotu nahrazená šrotem z celých semen lupiny, OL_{50}: krmná dávka obsahující 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z odslupkovaných semen lupiny, OL_{100}: krmná dávka bez sójového extrahovaného šrotu nahrazená šrotem z odslupkovaných semen lupiny

Tabulka P3: Chemický rozbor mastných kyselin v jednotlivých krmivech (g/100 g tuku).

Mastné kyseliny	*Vzorec*	*KKS*	*CL50*	*CL100*	*OL50*	*OL100*
MÁSELNÁ	*C4:0*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
KAPRONOVÁ	*C6:0*	*0,01*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
KAPRYLOVÁ	*C8:0*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
KAPRINOVÁ	*C10:0*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
UNDEKANOVÁ	*C11:0*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
LAUROVÁ	*C12:0*	*0,02*	*0,03*	*0,02*	*0,02*	*0,02*
TRIDEKANOVÁ	*C13:0*	*0,01*	*0,01*	*0,01*	*0,01*	*0,01*
MYRISTOVÁ	*C14:0*	*0,20*	*0,19*	*0,11*	*0,13*	*0,14*
MYRISTOLEJOVÁ	*C14:1*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
PENTADEKANOVÁ	*C15:0*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
CIS-10-PENTADEKENOVÁ	*C15:1*	*0,01*	*0,00*	*0,01*	*0,01*	*0,01*
PALMITOVÁ	*C16:0*	*14,59*	*12,81*	*9,50*	*10,24*	*10,06*
PALMITOLEJOVÁ	*C16:1*	*0,21*	*0,30*	*0,32*	*0,24*	*0,31*
HEPTADEKANOVÁ	*C17:0*	*0,15*	*0,12*	*0,10*	*0,11*	*0,11*
CIS-10-HEPTADEKENOVÁ	*C17:1*	*0,07*	*0,07*	*0,07*	*0,06*	*0,06*
STEAROVÁ	*C18:0*	*2,21*	*2,20*	*1,79*	*1,80*	*1,85*
OLEJOVÁ/ELAIDOVÁ	*C18:1n9t+ C18:1n9c*	*18,82*	*18,05*	*25,28*	*17,05*	*23,07*
LINOLOVÁ/LINOLELAIDOVÁ	*C18:2n6c + C18:2n6t*	*27,09*	*21,89*	*27,34*	*34,38*	*31,08*
γ-LINOLENOVÁ	*C18:3n6*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
LINOLENOVÁ	*C18:3n3*	*4,16*	*6,28*	*7,20*	*5,68*	*7,16*
ARACHOVÁ	*C20:0*	*0,26*	*0,59*	*0,83*	*0,57*	*0,76*
CIS-11-EIKOSENOVÁ	*C20:1n9*	*0,54*	*2,67*	*4,36*	*2,67*	*3,82*
CIS-11,14 EIKOSADIENOVÁ	*C20:2n6*	*0,06*	*0,14*	*0,20*	*0,13*	*0,18*
CIS -8,11,14 -EIKOSATRIENOVÁ	*C20:3n6*	*0,03*	*0,06*	*0,10*	*0,08*	*0,09*
HENEIKOSANOVÁ	*C21:0*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
ARACHIDONOVÁ	*C20:4n6*	*0,02*	*0,01*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
CIS -11,14,17-EIKOSATRIENOVÁ	*C20:3n3*	*0,01*	*0,04*	*0,08*	*0,04*	*0,07*
CIS-5,8,11,14,17-EIKOSAPENTAENOVÁ	*C20:5n3*	*0,32*	*1,39*	*2,30*	*1,57*	*2,00*
BEHENOVÁ	*C22:0*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
ERUKOVÁ	*C22:1n9*	*0,05*	*0,86*	*1,55*	*0,93*	*1,36*
CIS-13,16-DOKOSADIENOVÁ	*C22:2n6*	*0,00*	*0,04*	*0,06*	*0,04*	*0,05*
TRIKOSANOVÁ	*C23:0*	*0,03*	*0,06*	*0,08*	*0,07*	*0,08*
LIGNOCEROVÁ	*24:00:00*	*0,19*	*0,42*	*0,56*	*0,41*	*0,55*
CIS-4,7,10,13,16,19-DOKOSAHEXAENOVÁ	*C22:6n3*	*0,21*	*0,18*	*0,05*	*0,10*	*0,09*
NERVONOVÁ	*C24:1*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*	*0,00*
DOKOSATETRAENOVÁ	*C22:4n6*	*0,00*	*0,05*	*0,10*	*0,08*	*0,09*
DOKOSAPENTAENOVÁ	*C22:5n3*	*0,61*	*1,37*	*1,83*	*1,36*	*1,81*

KKS: komerční krmná směs pro nosnice N1 (ZZN Pelhřimov), CL_{50}: krmná dávka obsahující 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z celých semen lupiny, CL_{100}: krmná dávka bez sójového extrahovaného šrotu nahrazená šrotem z celých semen lupiny, OL_{50}: krmná dávka obsahující 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z odslupkovaných semen lupiny, OL_{100}: krmná dávka bez sójového extrahovaného šrotu nahrazená šrotem z odslupkovaných semen lupiny

Tabulka P4: Chemický rozbor vybraných minerálních látek v jednotlivých krmivech (v kg krmiva).

Prvky stanovené metodou FAAS		*KKS*	*CL50*	*CL100*	*OL50*	*OL100*
K	g/kg	5,26	5,02	5,25	4,98	4,82
Na	g/kg	0,05	0,06	0,02	0,03	0,03
Ca	g/kg	24,48	25,30	12,84	15,28	14,49
Mg	g/kg	1,23	1,28	1,19	1,22	1,17
Cu	mg/kg	8,2	9,4	5,1	5,6	7,0
Fe	mg/kg	134,7	157,0	61,7	98,0	84,2
Mn	mg/kg	90,5	115,9	123,7	100,4	111,6
Zn	mg/kg	64,3	62,8	42,1	42,2	42,3

KKS: komerční krmná směs pro nosnice N1 (ZZN Pelhřimov), CL_{50}: krmná dávka obsahující 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z celých semen lupiny, CL_{100}: krmná dávka bez sójového extrahovaného šrotu nahrazená šrotem z celých semen lupiny, OL_{50}: krmná dávka obsahující 50 % sójového extrahovaného šrotu a 50 % šrotu z odslupkovaných semen lupiny, OL_{100}: krmná dávka bez sójového extrahovaného šrotu nahrazená šrotem z odslupkovaných semen lupiny

Tabulka P5: Růst bakterií (log KTJ/ml ± SD, n = 3) kultivovaných *in vitro* na odlišných růstových médiích po 24 hodinách (Gullón et al. 2015).

	Celkový počet anaerobních bakterií	**Bifidobakterie**	**Laktobacily a enterokoky**	***Prevotella* sp.**	***Atopobium* sp.**	***Clostridium* sp.**	***Roseburia intestinalis***
Lup.	$9,61 \pm 0,03^{B}$	$8,53 \pm 0,05^{C}$	$8,53 \pm 0,10^{B}$	$8,39 \pm 0,07^{A}$	$8,70 \pm 0,13^{B}$	$8,48 \pm 0,07^{BC}$	$8,80 \pm 0,08^{C}$
Bob	$9,61 \pm 0,06^{B}$	$8,47 \pm 0,08^{C}$	$8,47 \pm 0,15^{B}$	$8,62 \pm 0,04^{B}$	$8,46 \pm 0,12^{B}$	$8,55 \pm 0,12^{C}$	$8,82 \pm 0,13^{C}$
FOS	$9,59 \pm 0,05^{B}$	$8,17 \pm 0,01^{B}$	$8,23 \pm 0,05^{B}$	$8,70 \pm 0,08^{B}$	$8,41 \pm 0,03^{B}$	$8,30 \pm 0,02^{B}$	$8,40 \pm 0,15^{B}$
Blank	$8,49 \pm 0,17^{A}$	$7,59 \pm 0,09^{A}$	$7,49 \pm 0,06^{A}$	$8,29 \pm 0,10^{A}$	$7,85 \pm 0,15^{A}$	$7,92 \pm 0,10^{A}$	$7,52 \pm 0,09^{A}$

Lup.: lupina, FOS: fruktooligosacharidy

^{A,B,C} statistický významný rozdíl ($P < 0,05$)

Tabulka P6: Růst bakterií (log KTJ/g) ve slepých střevech nosnic krmených různými krmnými směsi (Zdunczyk et al. 2014).

Krmná směs	Celkové počty anaerobních bakterií	Laktobacily a Enterokoky	Bifidobakterie	*E. coli*	*Bacteroides* sp. *Prevotella* sp.	*Clostridiaceae* sp.
S	9,58 ^{B}	8,24 ^{B}	8,13 ^{C}	8,01 ^{A}	8,80 ^{A}	6,44
L_{10}	9,70 ^{A}	8,44 ^{AB}	8,30 ^{B}	6,80 ^{B}	8,35 ^{B}	6,47
L_{20}	9,65 ^{AB}	8,58 ^{A}	8,58 ^{A}	6,67 ^{B}	8,42 ^{B}	6,16

S: krmná dávka obsahující příměs sóji, L_{10}: krmná dávka s příměsí 10 % lupiny, L_{20}: krmná dávka s příměsí 20 % lupiny

^{A,B,C} statistický významný rozdíl (P <0,05)

Tabulka P7: Růst bakterií (log KTJ/g ± SD, n = 6) ve voleti a slepých střevech brojlerových kuřat krmených různými krmnými směsi (Geigerová et al. 2017).

	Krmná směs	Celkový počet anaerobních bakterií	Bifidobakterie	Laktobacily	*E.coli*
Vole (kuřata)	L_0	8,72 ± 0,54	5,66 ± 0,37	8,28 ± 0,51	6,20 ± 1,14
	L_{50}	8,31 ± 0,54	5,42 ± 0,56	8,04 ± 0,69	6,29 ± 1,38
	L_{100}	9,21 ± 056	6,29 ± 1,24	8,93 ± 0,69	5,44 ± 0,50
Slepé střevo (kuřata)	L_0	9,33 ± 0,38	8,34 ± 1,34	8,76 ± 0,68^{A}	7,99 ± 0,39
	L_{50}	9,56 ± 0,27	9,14 ± 0,27	8,21 ± 0,68^{A}	8,57 ± 0,65
	L_{100}	9,77 ± 0,29	8,95 ± 0,46	9,55 ± 0,49^{B}	8,22 ± 0,23
Slepé střevo (kachny)	L_0	9,54 ± 0,45	6,93 ±0,74^{A}	4,53 ± 0,04^{A}	7,21 ± 0,29
	L_{50}	9,96 ± 0,42	8,55 ± 0,44^{B}	6,55 ± 0,98^{B}	6,97 ± 0,86
	L_{100}	9,93 ± 0,32	8,15 ± 0,53^{B}	6,06 ± 0,56^{B}	7,13 ± 0,28

L_0: krmná dávka s příměsí sójové mouky, L_{50}: krmná dávka s příměsí složené z 50 % sójové moky a 50 % lupinové mouky, L_{100}: krmná dávka s příměsí lupinové mouky

^{A,B} statistický významný rozdíl (P <0,05)

Tabulka P8: Růst bakterií (log KTJ/g, n = 8) ve voleti, kyčelníku a slepých střevech brojlerových kuřat krmených různými krmnými směsi (Rubio et al. 1998).

	1. pokus			2. pokus		
	Krmná směs	**Laktobacily**	***E.coli***	**Krmná směs**	**Laktobacily**	***E.coli***
	Kontrola	$7,57^{A}$	5,8	Kontrola	7,36	4,09
Vole	Lupina/sója	$7,96^{AB}$	4,94	Celá lupina	7,29	4,21
	Lupina/kasein	$8,28^{B}$	5,5	Loupaná lupina	7,37	4,77
	Kontrola	$6,83^{A}$	4,47	Kontrola	$4,41^{A}$	4,4
Kyčelník	Lupina/sója	$7,77^{B}$	4,25	Celá lupina	$4,37^{A}$	4,49
	Lupina/kasein	$7,69^{B}$	4,66	Loupaná lupina	$5,26^{B}$	4,89
	Kontrola	$8,56^{A}$	7,61	Kontrola	$6,39^{A}$	6,14
Slepé střevo	Lupina/sója	$9,32^{B}$	8,26	Celá lupina	$7,80^{B}$	6,78
	Lupina/kasein	$9,85^{B}$	8,15	Loupaná lupina	$8,34^{B}$	6,79

^{A,B} statistický významný rozdíl ($P < 0,05$)