

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Stanovení frakcí dusíkatých látek krmiv

ve výživě přežvýkavců

Doktorská disertační práce

Autor: Ing. Marie Koukolová

Školitel: doc. Ing. Petr Homolka, CSc., Ph.D.

Konzultant: Ing. Veronika Koukolová, Ph.D.

Praha 2018

Vedoucí disertační práce: Doc. Ing. Petr Homolka, CSc., Ph.D.

Česká zemědělská univerzita v Praze

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky

Konzultant disertační práce: Ing. Veronika Koukolová, Ph.D.

Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha Uhřetěves

Oddělení výživy a krmení hospodářských zvířat

Disertační práce byla uskutečněna s finanční podporou dlouhodobého koncepčního rozvoje výzkumné organizace MZe ČR MZERO0717 a MZE-RO0718.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma **Stanovení frakcí dusíkatých látek krmiv ve výživě přežvýkavců** vypracovala samostatně a s použitím uvedených pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Praze dne

.....

Ing. Marie Koukolová

Poděkování

Děkuji především svému školiteli **doc. Ing. Petru Homolkovi, CSc., Ph.D.** za odborné i pedagogické vedení mého doktorandského studia a za odbornou a obětavou pomoc, se kterou trpělivě přispíval ke zpracování disertační práce.

Dále bych ráda poděkovala **Ing. Veronice Koukolové, Ph.D.** za předávání odborných zkušeností a užitečných podnětů, které byly důležité pro zpracování této disertační práce.

Mé poděkování patří také **Výzkumnému ústavu živočišné výroby, v.v.i.** za poskytnutí odborného zázemí pro řešení disertační práce a také **Vendulce Sobotkové** a **Vlastě Hladké** za předání praktických znalostí a zkušeností v laboratořích.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod | 6 |
| 2. Literární přehled | 7 |
| 2.1. Fyziologie trávení u přežvýkavců | 7 |
| 2.1.1. Trávení a trávicí soustava | 7 |
| 2.1.2. Bachorový ekosystém | 10 |
| 2.2. Živiny ve výživě přežvýkavců | 17 |
| 2.2.1. Živiny | 17 |
| 2.2.2. Metabolismus živin | 22 |
| 2.3. Systémy na hodnocení živin | 30 |
| 2.3.1. Hodnocení dusíkatých látek a aminokyselin | 30 |
| 2.3.2. Systém CNCPS | 31 |
| 2.3.3. Systém NRC | 38 |
| 2.3.4. Hodnocení stravitelnosti krmiv | 39 |
| 3. Cíle a hypotézy práce | 42 |
| 4. Metodika | 43 |
| 4.1. Testovaná krmiva | 43 |
| 4.2. Chemické rozborů základních živin | 45 |
| 4.3. Laboratorní analýzy frakcí dusíkatých látek | 52 |
| 4.4. Statistické vyhodnocení | 58 |
| 5. Výsledky a diskuse | 59 |
| 5.1. Výsledky rozborů sledovaných vzorků krmiv u souboru I | 59 |
| 5.1.1. Základní živinové složení a energie | 59 |
| 5.1.2. Stanovení frakcí dusíkatých látek | 61 |
| 5.1.3. Korelační závislosti proměnných | 66 |
| 5.2. Výsledky rozborů sledovaných vzorků krmiv u souboru II | 69 |
| 5.2.1. Základní živinové složení a energie | 69 |
| 5.2.2. Stanovení frakcí dusíkatých látek | 71 |
| 5.2.3. Predikce stravitelné organické hmoty a stravitelných dusíkatých látek na základě jednotlivých chemických analýz | 74 |
| 5.2.4. Korelační závislosti proměnných | 78 |
| 6. Závěr | 81 |
| 7. Seznam literatury | 83 |
| 8. Přílohy | 99 |
| 8.1. Obrázky | 99 |
| 8.2. Seznam zkratk | 101 |
| 8.3. Seznam tabulek | 103 |
| 8.4. Seznam grafů | 104 |
| 8.5. Seznam schémat | 105 |

1. Úvod

Vhodnou krmnou dávkou se hospodářským zvířatům poskytují důležité živiny, které kromě jejich užítkovosti ovlivňují také kvalitu výsledné produkce. Důležitou roli hraje i stravitelnost živin krmné dávky, protože ze stravitelných živin mohou přežvýkavci využívat energii pro důležité biologické procesy, záchovu, růst, březost a mléčnou a masnou produkci.

Mezi nepostradatelnou živinu ve výživě přežvýkavců patří dusíkaté látky (bílkoviny), které představují stavební látky a jsou důležitým faktorem pro růst, obnovu, látkový metabolismus a výživu živočišných buněk. Dusíkaté látky jsou přítomny v každé buňce, představují nedílnou součást cytoplazmy a pokud jsou v těle organismu v přebytku, mohou sloužit jako částečný zdroj energie.

V disertační práci, která byla zaměřena na hodnocení dusíkatých látek pomocí Cornellského systému, byla potvrzena důležitost znalosti jednotlivých frakcí dusíkatých látek krmiv, neboť znalost o jejich zastoupení v krmivech poskytuje přesnější informace pro optimální sestavování a formulaci krmných dávek.

2. Literární přehled

2.1. Fyziologie trávení u přežvýkavců

2.1.1. Trávení a trávicí soustava

Trávicí soustava přežvýkavců je unikátní díky jejich čtyřkomorovému žaludku. Ten tvoří předžaludky (bachor, čepec, kniha) a vlastní žaludek (slez) (Ishler *et al.*, 1996). Bachor, čepec a kniha tvoří 52 % objemu z celého trávicího traktu přežvýkavců. Zbytek objemu trávicího traktu představuje slez (8 %) a střeva (tenké střevo 28 % a tlusté střevo 14 %) (Naylor *et al.*, 1991).

Agarwal *et al.* (2015) uvádí, že bachor tvoří specializovanou komoru gastrointestinálního traktu, která je ideálním prostředím komplexního mikrobiálního ekosystému a která získává živiny z lignocelulolytických zemědělských produktů, které hospodářská zvířata konzumují. Tyto živiny jsou využívány jak bachorovými mikroorganismy, tak hostitelským zvířetem. Množství živin ve většině objemných krmiv, které přežvýkavci přijímají, je nízké. Proto, aby se splnily požadavky zvířat na živiny, tak musejí objem krmiva konzumovat ve velkém množství (Agarwal *et al.*, 2015). Důležitými segmenty gastrointestinálního traktu přežvýkavců, které jsou schopny správně zpracovat přijatá krmiva včetně živinově chudších objemných krmiv, jsou dutina ústní, hltan, jícen, předžaludky (bachor, čepec, kniha), vlastní žaludek (slez) a střeva (tenké střevo, slepé střevo, tlusté střevo, konečník) (Čermák *et al.*, 1994). Ostatní žlázy, které jsou spojené s trávením, jsou slez, slinivka břišní a játra (Agarwal *et al.*, 2015).

Trávicí trubice začíná dutinou ústní. Tu tvoří čelisti, tváře, pysky, zuby, slinné žlázy a hltan. Pysky jsou krátké, silné a u přežvýkavců téměř nehybné. Dlouhý, svalnatý a pohyblivý špičatý jazyk je hlavním úchopovým orgánem. Mezi hlavní slinné žlázy patří u skotu velké slinné žlázy, tj. příušní, podčelistní a podjazyčné. Na dutinu ústní navazuje dutý orgán hltan, kterým při polykání prochází potrava. Při samotném polykání se rozevírají trávicí cesty a uzavírají se nosní východy a vstup do hrtanu, což je společný úsek trávicí a dýchací soustavy. Potrava, která prochází hltanem, následně vede do jícnu, což je svalový orgán o velikosti 60-100 cm v závislosti na velikosti zvířete. Jeho hlavní funkcí je transport potravy do bachoru, nebo naopak rejekce potravy a skládá se z krční, hrudní a břišní části. Na rozdíl od monogastrů je žaludek přežvýkavců (u přežvýkavců předžaludek) rozdělen na 3 komory

(bachor, čepec, kniha) a pravý žaludek (slez). Podíl jednotlivých částí předžaludku, tj. bachoru, čepce, knihy a vlastního žaludku (slezu), je přibližně 79 %, 6 %, 5 % a 10 %, resp. (Agarwal *et al.*, 2015).

Pro trávení přijaté potravy přežvýkavců je důležitým procesem přežvykování, které se skládá z několika kroků. Prvně dojde k tzv. rejekci, což je proces, kdy je krmivo pozřené zvířetem vyvrženo z bachoru zpět do dutiny ústní. Následně dojde v dutině ústní k přežvykování, k dostatečnému proslinění sousta a k jeho zpětnému spolknutí (Van Soest, 1994). Fuller (2004) uvádí, že proslinění je pro trávení v bachoru velice důležité, protože dochází k neustálému promíchávání potravy díky silným cyklickým svalovým stahům, které se opakují cca každou minutu. Potrava, která se pak dostává do bachoru, je tedy přežvykována a smíšená se slinami v dutině ústní. V bachoru se pak zmenší velikost potravinových částic díky přítomným bakteriím, prvokům a houbám, které se připojují k částčkám potravy a vylučují trávicí enzymy. Ty se podílejí na zmenšení částic a potrava tak může projít trávicím traktem dál (Fuller, 2004).

Bachor

Bachor je zažívací orgán, jehož optimální teplota je 39 °C a pH 6,0 až 6,9 (Kamra, 2005). Tento orgán dosahuje objemu 100 až 130 litrů, je největší částí zažívacího ústrojí a vyplňuje téměř polovinu levé dutiny břišní (Puniya *et al.*, 2015). Jeho primární funkcí je trávení rostlinného materiálu (Ricard *et al.*, 2006), tj. tento obrovský prostor je naplňován stráveným a částečně natráveným krmivem. Kombinací mechanického přežvykování a enzymatické reakce jsou tyto přijaté pevné části krmiv členěny na menší části (Puniya *et al.*, 2015). Tohoto členění se účastní četné a rozmanité druhy bakterií, hub a nálevníků (Ricard *et al.*, 2006).

V bachoru jsou různé pilíře a záhyby, které jsou tvořeny svalovými vlákny. Pilíře zajišťují soustavné promíchávání bachorového obsahu při kontrakcích 2 až 3 pohyby/minutu a záhyby prochází přijatá a natrávená potrava dál trávicím traktem. Mezi velmi významný záhyb patří neuzavíratelný čepcobachorový splav, díky kterému existuje funkční jednota bachoru a čepce. Povrch bachorové sliznice je bezžlaznatý, 5 mm tlustý, tmavé barvy s výjimkou okrajů bachorových pilířů, které jsou světlejší a je kryt epitelem a papily. Papily se podobají listům, jsou velké 12 až 15 mm a jejich velikost a množství se mění v průběhu reprodukčního cyklu a v závislosti na složení předkládané krmné dávky. Jejich čtenější výskyt je zejména ve spodní části bachoru, kdežto směrem k horní části bachoru, k tzv. dorzální části bachoru, se

jejich výskyt a četnost snižují, až úplně mizí. Z dutiny ústní ústí jícní drážka, která začíná česlem a končí v čepcoknihovém otvoru, který stažením své svaloviny umožňuje průtok tekutin přímo z jícnu do knihy. Díky tomu přijaté tekutiny obchází bachor a tato funkce je důležitá zejména pro telata, jejichž hlavním krmivem je mléko a mléčné krmné směsi (Agarwal *et al.*, 2015).

Čepec

Čepec je trávicí orgán o objemu 6-10 litrů, který funguje jako „pumpa“. Díky němu se potrava dostává do bachoru a zpět a tím se udržuje v bachoru stálá vlhkost. Udržuje tím stálý chod potravy jak do bachoru, tak do knihy a pumpuje potravu k česlu pro tzv. rejekci a následné přežvýkování (Reece, 1997).

Jak uvádí Van Soest (1994), bachor a čepec jsou často pokládány za stejný orgán, který je však oddělen čepcobachorovým neuzavíratelným splavem. Proto je mezi těmito orgány možná výměna obsahu a jeho separace je pouze částečná. Mezi důležité procesy, probíhající v těchto dvou orgánech, patří fermentační aktivita a absorpce živin (Van Soest, 1994).

Knihy

Knihy je trávicí orgán, který je umístěn mezi neutrálním bachorem a kyselým slezem. Objem knihy se pohybuje mezi 9-15 litry a je důležitá pro regulaci bachorového obsahu proto, že zajišťuje, aby obsah slezu nemohl vstoupit zpátky do bachoru. Knihy je také považována za absorpční orgán, protože se v ní vstřebávají až dvě třetiny přijaté vody. Voda, která přichází do knihy, je z 30 až 60 % absorbována spolu s velkým množstvím těkavých mastných kyselin (TMK) (40-69 %), dále sodíkem, draslíkem a s ostatními ionty. Princip tohoto efektu spočívá v redukci obsahu, který jde do slezu a odstranit nebo snížit koncentraci TMK. U ovcí, koz, jelenů a antilop může být tento absorpční efekt méně důležitý, neboť v porovnání s jejich velikostí těla je knihy relativně menší. Obecně je považováno, že knihy, respektive funkce knihy, je důležitější u pastevních druhů zvířat, které vyžadují tento anatomický proces vývoje pro jejich vysokou konzumaci vlákniny (Van Soest, 1994).

Slez (vlastní žaludek)

Vlastní žaludek přežvýkavců (slez) je žláznatý orgán, jehož povrch tvoří spirálové řasy vysoké až 7 cm. Slez má objem 11 až 22 litrů a pH 1-2 díky působení sekrecí kyseliny

chlorovodíkové. Kyselina chlorovodíková a trávicí enzymy jsou potřebné pro rozrušování potravy, ale i mikrobiální biomasy symbiotických bachorových mikroorganismů (Van Soest, 1994). Slez je tedy trávicí orgán, jehož hlavní funkcí je shromažďování potravy a její promísení se žaludeční šťávou a následně přesun této natráveniny do dvanáctníku (Puniya *et al.*, 2015). Tato natrávenina potřebuje u přežvýkavců prakticky nepřetržitou sekreci žaludečních žláz. Zvířata nepřežvýkavá tuto nepřetržitou sekreci nepotřebují, protože u nich vstupuje natrávenina do slezu přerušovaně. Tento žlaznatý žaludek navazuje vrátníkem na tenké střevo, kde dochází k trávení živin (Van Soest, 1994).

Střevo

Střevo je velmi dlouhá stočená svalová část trávicí trubice a skládá se z tenkého a tlustého střeva. Tenké střevo je u skotu dlouhé 30 až 50 m a je rozděleno na dvanáctník, lačník a kyčelník. Mezi jeho nejvýznamnější funkce patří trávení bílkovin, sacharidů a lipidů. Trávení těchto živin je umožněno pomocí trávicích šťáv, tj. šťávy pankreatické, střevní a žlučové. Tlusté střevo je u skotu dlouhé cca 10 m a skládá se ze slepého střeva, tračníku a konečníku. Celá trávicí soustava je zakončena řitním otvorem (Marvan *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2015).

2.1.2. Bachorový ekosystém

Puniya *et al.* (2015) uvádí, že podrobný průzkum bachorového mikrobiálního ekosystému byl zahájen Robertem Hungatem v roce 1950. Ten poukázal na možnosti, jak prozkoumat složité bachorové mikrobiální struktury a další anaerobní ekosystémy bachoru. Bachor, který u přežvýkavců představuje čtyřkomorový žaludek a je uzpůsobený zejména k pastvě, skrývá složitou „bio síť“, kde jsou v těsné blízkosti formy od primitivních archeí až po složitější prvoky. Někteří z těchto mikrobů dokáží s ostatními komunikovat tak, aby získali energii a produkovali vysoce aktivní lignocelulolytické enzymy, které podporují trávení hostitele. To vede ke vzniku TMK, kyselině mravenčí, vodíku, oxidu uhličitého a metanu. Mnoho let se odborníci na výživu, mikrobiologové a fyziologové snažili prostudovat bachor s cílem maximalizovat jeho produktivitu a celkově zlepšit zdraví hostitele prostřednictvím manipulace s bachorem a jeho prostředím. V případě, že byl bachor bez bachorových mikroorganismů, nebo když byl bachorový ekosystém narušen, byl jasně patrný škodlivý vliv

na zdraví zvířete a jeho produktivitu (Puniya *et al.*, 2015). Pochopení složitých funkcí a interakcí mikrobiálních společenstev v rámci jejich místa představuje velkou výzvu pro odborníky přes bachorovou mikrobiologii i dnes. A právě pokroky v molekulární biologii a genomiky nabízejí nové možnosti pro provedení komplexního přezkoumání struktury a funkce bachoru mikrobiálních společenstev (Sirohi *et al.*, 2012). Tyto podrobné analýzy individuálních skupin mikrobů, mikrobiální struktury, složení a interakce mohou poskytnout funkční rozměry bachorového prostředí, které přispějí k dosažení hlavního cíle bachorové mikrobiologie. Tedy k celistvému pochopení bachorového ekosystému (Puniya *et al.*, 2015).

Tabulka 1. Fyziologická, chemická a mikrobiální charakteristika bachorového prostředí (Puniya *et al.*, 2015).

| | |
|--|---|
| Fyziologické vlastnosti | |
| Sušina (%) | 10-18 |
| Osmotický tlak | 250-350 mOsmol/Kg ⁻¹ |
| pH | 5,5-6,9 |
| Redoxní potenciál | -350 až -400 mV |
| Teplota | 38-41 °C |
| Chemické vlastnosti | |
| AMK a oligopeptidy | <1 mmol.L ⁻¹ přítomny 2-3 hodiny po nakrmení |
| Amoniak | 2-12 mmol.L ⁻¹ |
| Celulóza, hemicelulóza, pektin | Vždy přítomny |
| Mukopolysacharidy | Vždy přítomny |
| Plynná fáze | CO ₂ 65; CH ₄ 27; N ₂ 7; O ₂ 0,6, H ₂ 0,2 |
| Růstové faktory | Dostatečná zásoba; MK s rozvětveným řetězcem, MK s krátkým řetězcem, puriny, pyrimidiny, další neznámé komponenty |
| Lignin | Vždy přítomen |
| Minerály | Vysoký podíl Ca; všeobecně dobrá zásoba |
| Netěkavé kyseliny (mmol.L ⁻¹) | Laktát <10 |
| Rozpustné sacharidy | 1 mmol.L ⁻¹ přítomny 2-3 hodiny po nakrmení |
| Stopové prvky/vitamíny | Vždy přítomny; dobrá zásoba vitamínu B |
| Těkavé mastné kyseliny (mmol.L ⁻¹) | Acetát 60-90, propionát 15-30, butyrát 10-25, MK s rozvětveným řetězcem a vyšší než 2-5 |
| Mikrobiální vlastnosti | |
| Anaerobní houby | 10 ³⁻⁵ g ⁻¹ (6 rodů) |
| Bakterie | 10 ¹⁰⁻¹¹ g ⁻¹ (>200 druhů) |
| Bakteriofágy | 10 ⁷⁻⁹ g ⁻¹ částic ml ⁻¹ |
| Obrvení prvoci | 10 ⁴⁻⁶ g ⁻¹ (25 rodů) |

AMK, aminokyseliny; MK, mastné kyseliny.

Býložravci strukturálních sacharidů, zahrnujících lignin, celulózu a hemicelulózu, nejsou schopni využít sami sebe pro tvorbu enzymů, proto využívají právě přítomné symbiotické mikroorganismy, které tyto potřebné sloučeniny vytvářejí pro sebe a tím i pro hostitele. Tyto mikrobi jsou obecně rozděleni do tří oblastí: bakterie, nálevníci a houby (Puniya *et al.*, 2015).

Bakterie

Bachor obsahuje různé druhy bakterií, které se aktivně podílí na degradaci přijatých krmiv (Tabulka 2) a zejména na odbourávání rostlinné vlákniny (Puniya *et al.*, 2015). Již v roce 1966 Minato ve své publikaci uvedl, že tyto bakterie jsou spojené s přijatým krmivem a tvoří téměř 50-75 % z celkové mikrobiální populace. Dále tento autor uvedl, že přilnavost mikrobů k pevným látkám je důležitým faktorem pro úspěšnou konkurenci, úspěšné přežití v bachoru a také je tato vlastnost důležitá při samotném trávení pevných částic (Minato *et al.*, 1966). Kromě toho, na většině bachorových endoglukanázových a xylanázových aktivit se podílejí bakterie, a proto jsou tyto bakterie navázané na vlákninu rozhodující pro bachorové trávení. Tyto bakterie jsou rozděleny na základě jejich asociace jako volně plovoucí v bachorové tekutině, připevněné na částičky krmiva (pevně/volně), a na bakterie v bachorovém epitelu, plísni a prvoky. Kromě toho jsou tyto bakterie rozděleny podle toho, jakou mají funkci a podle toho, na degradaci které rostlinné složky se v bachoru podílejí. Mohou zahrnovat bakterie degradující vlákninu (celulózu, hemicelulózu a lignin), škrob, močovinu a řadu dalších (Puniya *et al.*, 2015) (Tabulka 2). Obecně se bachorové bakterie definují jako anaerobní mikroorganismy, kdy přítomnost kyslíku může některé z nich ihned zabít. Optimální pH v bachoru pro růst bakterií se pohybuje mezi 6,0-6,9 a za příznivou teplotu je považováno 39 °C (Kamra, 2005). Optimální pH je v bachoru udržováno přísunem pufrujících látek slinami a odvodem kyselých fermentačních produktů bachorovým epitelem. Tato rychle absorbované TMK se mohou pokrýt až 80 % energetických požadavků zvířat (Xiao *et al.*, 2016). Bakterie jsou schopné tolerovat vyšší úroveň organických kyselin, aniž by to nepříznivě ovlivňovalo jejich metabolismus (Kamra, 2005).

Tabulka 2. Zástupci některých bachorových mikrobů u domácích a volně žijících zvířat (Kamra, 2005).

| Krmivo | Bakterie | Krmivo | Bakterie |
|-------------------------------------|--|---|--|
| Bakterie vázané na sacharidy | | Bakterie vázané na dusík | |
| Celulóza | <i>Fibrobacter succinogenes</i> | Degradovatelný protein | <i>Prevotella ruminicola</i> |
| | (<i>Bacteroides succinogenes</i>) | | <i>Ruminobacter amylophilus</i> |
| | <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | Močovina Ostatní bakterie Kyselé využití | <i>Clostridium bifermentans</i> |
| | <i>Ruminococcus albus</i> | | <i>Megasphaera elsdenii</i> |
| | <i>Clostridium cellobioparum</i> | | <i>Megasphaera elsdenii</i> |
| | <i>Clostridium longisporum</i> | | (<i>Peptostreptococcus elsdenii</i>) |
| | <i>Clostridium lochheadii</i> | | <i>Wollinella succinogenes</i> |
| <i>Eubacterium cellulosolvens</i> | (<i>Vibrio succinogenes</i>) | | |
| Hemicelulóza | (<i>Cillobacterium cellulosolvens</i>) | <i>Veillonella gazogenes</i> | |
| | <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> | (<i>Veillonella alcalescens</i> , | |
| | <i>Prevotella ruminicola</i> | <i>Micrococcus lactolytica</i>) | |
| | (<i>Bacteroides ruminicola</i>) | <i>Oxalobacter formigenes</i> | |
| | <i>Eubacterium xylanophilum</i> | <i>Desulphovibrio desulphuricans</i> | |
| Škrob | <i>E. uniformis</i> | <i>Desulphatomaculum ruminis</i> | |
| | <i>Streptococcus bovis</i> | <i>Succiniclasticum ruminis</i> | |
| | <i>Ruminobacter amylophilus</i> | (<i>Bacteroides amylophilu</i>) | |
| | (<i>Bacteroides amylophilu</i>) | Lipolytické bakterie | |
| | <i>Prevotella ruminicola</i> | Acetogenické bakterie | |
| Cukr/dextriny | (<i>Bacteroides ruminicola</i>) | Degradovatelné tříslloviny | <i>Anaerovibrio lipolytica</i> |
| | <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> | Degradovatelná mimosa (amino acid) | <i>Eubacterium limosum</i> |
| | <i>Succinivibrio amylolytica</i> | | <i>Acetitomaculum ruminis</i> |
| | <i>Selenomonas ruminantium</i> | | <i>Streptococcus caprinus</i> |
| | <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> | | <i>Eubacterium oxidoreducens</i> |
| | <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> | Metanogenní bakterie archea | <i>Synergistes jonesii</i> |
| | <i>L. helveticus</i> | | <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> |
| | <i>Bifidobacterium globosum</i> , <i>B. longum</i> | | <i>Methanobacterium formicum</i> |
| | <i>B. thermophilum</i> | | <i>Methanosarcina barkeri</i> |
| | <i>B. ruminale</i> | Mykoplazmatické bakterie | <i>Methanomicrobium mobile</i> |
| Pektin | <i>B. ruminantium</i> | | <i>Anaeroplasma bactoclasticum</i> |
| | <i>Treponema saccharophilum</i> | | <i>Anaeroplasma abactoclasticum</i> |
| | <i>Lachnospira multiparus</i> | | |

Nálevníci

Další skupinou jsou bachoroví nálevníci, kteří patří mezi nejpokročilejší skupinu prvoků. Jejich tvar těla je oválný a velikost buněk se pohybuje od 10-4500 μm (Hausmann *et* Hülsmann, 2003), přičemž prvoci s velikostí 20-200 μm nejsou spojeny s částičky krmiva (Puniya *et al.*, 2015). Počet těchto prvoků je v 1 ml bachorové tekutiny kolem 0,5 milionů (Brade *et* Distl, 2015) a mohou tvořit až 50 % životaschopné biomasy bachoru (Puniya *et al.*, 2015). Stejně jako u bakterií, je i pro nálevníky důležité udržovat optimální pH bachoru. To se u nálevníků pohybuje od 5,5 do 7,5. Tato variabilita je ovlivněna zejména typem potravy a frekvencí krmení (Franzolin *et* Dehority, 2010). Clarke (1977) uvádí, že bachoroví nálevníci jsou citliví na změny bachorového pH a nemohou přežít, pokud pH stoupne nad 7,8 nebo naopak klesne pod 5,0. Novější studie (Dehority, 2005) uvádí, že k redukci prvoků dochází při poklesu pH již pod 5,4. Co se týče pouze snížení populace nálevníků v bachoru, studie Nagaraja *et* Titgemeyer (2007) zveřejnila, že právě tato skutečnost může být dobrým indikátorem akutní a subakutní acidózy a to v důsledku nahromadění kyseliny mléčné nebo TMK. Bachoroví nálevníci tráví v bachoru celulózu, produkují aminokyseliny (AMK) a zpracovávají nestavitelné strukturální polysacharidy na nestabilní lipidy, aby mohly být snadno absorbovány hostitelem a vytvářet tak jeho hlavní zásoby energie (Cameron, 2003).

Pokud dojde k poruše bachorového trávení (odstranění nálevníků z bachoru), bude to mít vliv na užítkovost zvířat. Dojde ke zvýšení kyseliny mléčné a kyseliny propionové v bachorové šťávě, k výraznému klesání amonného dusíku a výrazně se zvýší počet bakterií a hub v bachorové šťávě (Kamra, 2005). Williams *et* Coleman (1992) uvádějí, že zvířata bez bachorových prvoků vykazují zvyšující se počet bakterií, snížení produkce amoniaku a TMK a snížení stravitelnosti organické hmoty. Dále uvádí, že biologická hodnota bakteriálního a protozoálního proteinu se předpokládá podobná. Avšak stravitelnost protozoálního proteinu je podstatně vyšší než bakteriálního (Williams *et* Coleman, 1992). Dále je znám pufrovací účinek protozoí díky jejich rychlému přijímání škrobových zrn, které zpomaluje rychlost fermentaci bachorových bakterií a následně tvorbu TMK. Tento pufrovací efekt má tendenci stabilizovat bachorovou fermentaci a vede ke snížení redoxního potenciálu bachorové tráveniny (Franzolin *et* Dehority, 2010).

Tabulka 3. Zástupci některých prvků bachorového mikrobiálního ekosystému domácích a volně žijících zvířat (Kamra, 2005).

| Protozoa | Hostitel | Protozoa | Hostitel |
|-------------------------------|--|--|---|
| Holotrich protozoa | | Entodiniomorphid protozoa | |
| <i>Isotricha prostoma</i> | Ovce Zebu Antilopa Buvol Jelen Koza | <i>Entodinium bovis</i> | Skot Buvol Buvol Ovce Koza Ovce |
| <i>I. intestinalis</i> | Skot Bizon Kančil Jelen | <i>E. bubalum</i> <i>E. bursa</i> <i>E. caudatum</i> <i>E. chatterjeei</i> | Koza Indická koza Buvol Skot |
| <i>Dasytricha ruminantium</i> | Ovce Antilopa Buvol | <i>E. longinucleatum</i> <i>Diplodinium dendatum</i> <i>D. indicum</i> | Buvol Široce rozšířené Indický skot |
| <i>Oligoisotricha bubali</i> | Buvol Skot | <i>Eremoplastron asiaticus</i> <i>E. bubalus</i> | Indický skot Brazilský skot Buvol |
| | | <i>Eudiplodinium maggii</i> <i>Ostracodinium trivesiculatum</i> <i>Polyplastron multivesiculatum</i> | Široce rozšířené Skot Buvol Skot Ovce Koza Antilopa |
| | | <i>Metadinium medium</i> <i>Epidinium caudatum</i> | Skot Buvol Africká antilopa Skot Ovce Koza |
| | | <i>Ophryoscolex caudatus</i> <i>Caloscolex camelicus</i> | Široce rozšířené Velbloud |

Nálevníci, kteří žijí v symbióze s přežvýkavci, systematicky spadají do podtřídy Trichostomatia. Dle Ricarda *et al.* (2006) se mohou se rozdělit do dvou hlavních skupin na řád Entodiniomorpha (*Entodinium simplex*, *Entodinium caudatum*, *Eudiplodinium Maggii*, *Metadinium medium*, *Diploplastron affine*, *Polyplastron multivesiculatum* a *Epidinium*

ecaudatum) a řád Vestibuliferida, dříve nazývaný Holotricha (*Isotricha prostoma*, *Isotricha intestinalis* a *Dasytricha ruminantium*) (Ricard *et al.*, 2006; Puniya *et al.*, 2015). V bachoru se vyskytuje nálevníků méně než bakterií; bylo jich nalezeno zhruba 250 druhů a převažovaly druhy třídy *Ciliata*. V jednom hostiteli se většinou vyskytuje zhruba 5-6 různých rodů a jejich výskyt je podmíněn zejména potravou zvířete (Puniya *et al.*, 2015).

Houby

Poslední skupinou, osidlující bachorové prostředí, jsou anaerobní houby, které se do bachoru přežvýkavců dostávají spolu s přijatým krmivem (Ørskov *et Ryle*, 1990) a hrají velmi důležitou roli při degradaci lignocelulolytických rostlinných částí (Puniya *et al.*, 2015). Tzn., kmeny těchto anaerobních hub mají aktivní a pozitivní úlohu při mikrobiální degradaci vlákniny (Kamra, 2005), jsou důležité při trávení celulózy a také se podílejí na rozrušování rostlinných pletiv, což je důležité zejména pro lepší pronikání bakterií (Ørskov *et Ryle*, 1990). Lee *et al.* (2004) uvádějí, že k rozrušování rostlinných pletiv dochází, oproti celulolytickým bakteriím, proniknutím kořínky hub zevnitř. Anaerobní houby v bachorovém prostředí tvoří max. 20 % životaschopné biomasy bachoru a i přes takto malé zastoupení jsou považovány za nejúčinnější rozkladače vlákniny (Puniya *et al.*, 2015).

Podle klasifikačního systému z roku 2007 (Hibbett *et al.*, 2007) byly anaerobní houby popsány na řád Neocallimastigales, třídu Neocallimastigomycetes, kmen Neocallimastigomycota (Hibbett *et al.*, 2007; Dagar *et al.*, 2011; Sirohi *et al.* 2013; Grüniger *et al.*, 2014). Mezi jedny z nejběžnějších anaerobních hub bachorového prostředí patří druhy *Neocallimastix frontalis*, *Neocallimastix patriciarum* a *Neocallimastix hurleyensis* (Tabulka 4).

Tyto houby nejsou výlučně jen houbami bachorového prostředí, ale mohou se nacházet v celém trávicím traktu (Davies *et al.*, 1993) a část jich byla také izolována ze slin a výkalů (Lowe *et al.*, 1987). Přestože se jedná o anaerobní houby, tento fakt poukazuje jistou toleranci s kyslíkem a také odolnost proti vysychání (Puniya *et al.*, 2015).

Tabulka 4. Zástupci některých hub bachorového mikrobiálního ekosystému domácích a volně žijících zvířat (Kamra, 2005).

| Houby | Zdroj izolace |
|---|---------------|
| <i>Neocallimastix frontalis</i> | Kráva |
| <i>N. patriciarum</i> | Ovce |
| <i>N. hurleyensis</i> | Skot |
| <i>Sphaeromonas communis</i> ((<i>Caecomyces communis</i>)) | Skot |
| <i>Caecomyces equi</i> | Kůň |
| <i>Orpinomyces bovis</i> | Skot |
| <i>Anaeromyces mucronatus</i> (<i>Ruminomyces mucronatus</i>) | Skot |
| <i>Ruminomyces elegans</i> | Skot |
| <i>Piromyces communis</i> | Kůň |
| | Slon |
| <i>Piromyces mae</i> | Kůň |
| | Slon |
| <i>Piromyces dumbonica</i> | Kůň |
| | Slon |

2.2. Živiny ve výživě přežvýkavců

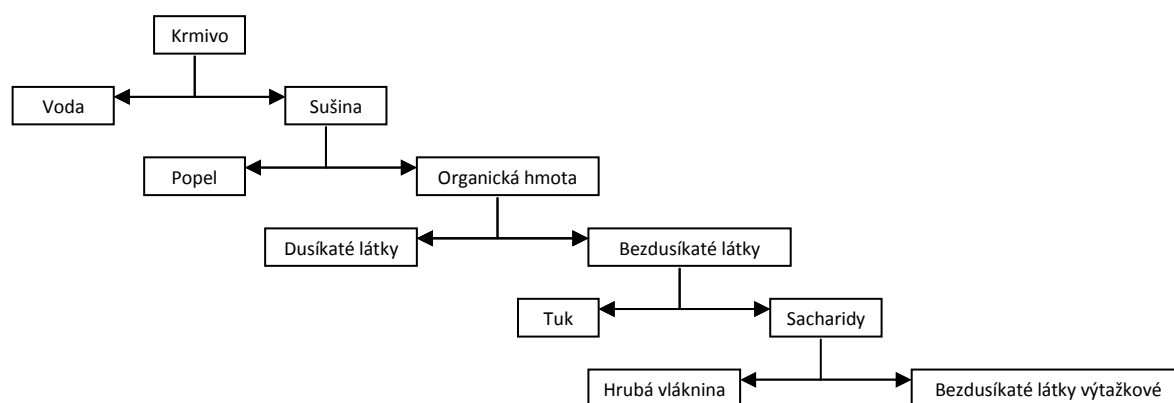
2.2.1. Živiny

Krmiva jsou ve výživě přežvýkavců důležitá jak pro jejich důležitou schopnost do určité míry zaplnit trávicí trakt a tím uspokojit pocit (Kudrna *et al.*, 1998), tak pro jejich záchovu, růst, reprodukci a laktaci. Dodávají energii a nezbytné živiny formou bílkovin, vitamínů a minerálů. Energie a bílkoviny jsou pro přežvýkavce často nejvíce limitující faktory, proto se jimi zabývá celá řada hodnotících systémů. Některé vlastnosti krmiv souvisí s jejich úpravou (např. velikost částic) a nemají žádnou souvislost s původním chemickým složením. Stručně řečeno, reakce zvířat na krmiva závisí na složité interakci mezi složením krmné dávky, způsobem přípravy krmné dávky a na následné živinové hodnotě krmné dávky. Domácí zvířata jsou krmena v rámci krmných dávek, které jsou určeny pro maximalizaci jejich produktivity a jsou většinou hodnoceny na základě jejich schopnosti vyvolat u zvířete požadovaný výsledek. Krmiva jsou hodnocena z hlediska obsahu energie a bílkovin a nedostatky minerálů a vitamínů jsou obvykle kompenzovány jejich doplněním (Van Soest, 1994).

Živiny v krmivech představují organické a anorganické látky, které jsou po přijetí a strávení schopny být v organismu zvířete metabolizovány. Tyto organické látky jsou schopny být zabudovány do nově vytvořených tkání vlastního těla, ale také do produktů, které uvolňují při jejich štěpení energii. Anorganické látky jsou také zabudovány do tkání těla nebo produktu, ale neuvolňují při svém štěpení energii. Mezi hlavní energetické živiny patří sacharidy, dusíkaté látky a tuky (Kudrna *et al.*, 1998).

Saha *et al.* (2010) definuje živiny jako prvky, sloučeniny nebo skupiny sloučenin, které jsou potřebné a/nebo využívané pro výživu a produkci zvířat. Mezi tyto běžné živiny ve výživě zvířat patří sacharidy (energie), dusíkaté látky, tuky, minerální látky, vitamíny a voda (Schéma 1) (Saha *et al.*, 2010).

Schéma 1. Živinové schéma živin v krmivu (Saha *et al.*, 2010).



Voda

Organismus hospodářských zvířat je z 60-70 % tvořen vodou. Voda je životně důležitá pro udržení tělních tekutin a správnou rovnováhu iontů, dále pro trávení, absorpci a metabolismus živin, přenos živin do/z tělních tekutin a v neposlední řadě pro vyloučení odpadního materiálu a přebytečného tepla z těla ven. Dojný skot dostává vodu pitím (Looper *et Waldner*, 2002) a přístup k vodě by měl být volný (Dschaak, 2012). Dále se voda dostává do organismu dojného skotu pomocí krmiv, která vodu obsahují a také metabolickou vodou, která vzniká při oxidaci organických živin. Voda z těla odchází močí, výkaly, mlékem, pocením, výparem

z tělesného povrchu a z dýchacích cest. Množství vody, které se z těla dostane, je ovlivněno aktivitou zvířete, teplotou vzduchu, vlhkostí, dechovou frekvencí zvířete, přísunem vody, spotřebou krmiva, produkcí mléka a dalšími faktory (Looper *et Waldner*, 2002).

Sušina

Sušina představuje vše, co je obsaženo v krmivu kromě vody, tj. dusíkaté látky, vlákninu, tuk, minerální látky apod. V praxi toto znamená celková hmotnost vody v krmivu odečtená od celkové hmotnosti krmiv, tj. vysušení krmiva při 103 °C do konstantní hmotnosti (Saha *et al.*, 2010).

Denní příjem sušiny (tzv. dry matter intake, DMI) má ve výživě přežvýkavců zásadní význam. Poskytuje informace o množství živin, které jsou zvířeti k dispozici na produkci a záchovu (NRC, 2001). Denní příjem sušiny představuje takové množství sušiny (nebo predikci množství sušiny) spotřebované zvířetem. Obvykle se příjem sušiny zvyšuje s příjmem stravitelných krmiv. Nicméně, nekvalitní komponenty v krmivech, jako jsou taniny a alkaloidy, mohou příjem krmiv a tím příjem sušiny snížit (Saha *et al.*, 2010).

Organická hmota

Organická hmota se stanoví výpočtem. Pomocí chemické analýzy se zjistí obsah popele a obsah sušiny a jejich rozdíl představuje obsah organické hmoty (Zeman *et al.*, 2006). Jak je uvedeno výše, sušina představuje vše, co je obsaženo v krmivu kromě vody, tj. dusíkaté látky, vlákninu, tuk, minerální látky apod. V praxi toto znamená celková hmotnost vody v krmivu odečtená od celkové hmotnosti krmiv, tj. vysušení krmiva při 103 °C do konstantní hmotnosti. Popel představuje zbytek vzorku krmiva po spálení v laboratoři při vysoké teplotě až 550 °C. Při spálení se odstraní organické látky a tím zbyde popel, který obsahuje anorganické minerální prvky (Saha *et al.*, 2010).

Organické kyseliny

Organické kyseliny patří mezi energetické látky a do metabolismu přežvýkavců jich může vstoupit velké množství, např. kyselina octová, propionová, mravenčí a máselná (Zeman *et al.*, 2006). Organické kyseliny působí v bacheru jako prevence při snižování bacherového pH a při metanogenezi, tzn. tyto kyseliny mohou v bacheru stimulovat růst bakterií a následně pozitivně ovlivnit bacherové kvašení a tím zlepšit produkci přežvýkavců. Kyseliny, které se

používají jako doplňkové látky, jsou zejména přirozeně se vyskytující kyseliny v buněčném metabolismu a jsou tedy přírodními produkty s minimální toxicitou. Vliv na produkci a zdraví zvířat byl prokázán u celé řady organických kyselin, např. kyseliny citrónové, fumarové, mravenčí nebo mléčné. Význam kyselin trávení a vstřebávání potravy a na stabilizaci bachorové mikroflóry byl prokázán v řadě studií (Sahoo *et al.*, 2014).

Dusíkaté látky

Dusíkaté látky jsou ve výživě přežvýkavců nenahraditelnou živinou. Představují celkový dusík v krmivu, který zahrnuje soubor látek proteinové i neproteinové (Schwab *et al.*, 2003). Jedná se o organické sloučeniny složené ze stavebních látek, tzv. aminokyselin. Aminokyseliny jsou životně důležité pro orgány, tkáně, svaly, srst, kůži, mléko a enzymy. Bílkoviny se musí zvířeti podávat denně na záchovu, růst, rozmnožování a laktaci (Wattiaux, 1998; Saha *et al.*, 2010). Bílkoviny jsou tvořeny velkými molekulami, které se vzájemně liší velikostí, tvarem, rozpustností, složením a tvoří obsah rostlinných a živočišných tkání. Mají funkci zejména stavební, ale také např. zásobní a energetickou. Dusíkaté látky neproteinové povahy (tzv. NPN) tvoří molekuly menší a zahrnují např. peptidy, nukleové kyseliny, amidy, aminy, dusičnany a amoniak (Schwab *et al.*, 2003; CNCPS, 2014). Jedná se o dusíkaté látky, které nejsou ve formě bílkovin, ale mohou být využity mikrobiálními organismy v bacheru pro svou syntézu nebo v gastrointestinálním traktu pro syntézu aminokyselin a bílkovin. Tedy proto, že je dusík nedílnou součástí každé aminokyseliny, může být NPN využit pro syntézu proteinů mikroorganismů v bacheru. Laboratorní analýzou se nejprve stanoví celkový N přítomný v krmivu a poté se celkové množství dusíkatých látek vypočítá pomocí přepočtového faktoru. Tento faktor je pro pícniny 6,25, protože obvykle obsahují 16 % N. Ale např. pro pšenici je tento faktor 5,70 a u jiných obilných zrn 5,90 (Saha *et al.*, 2010).

Kudrna *et al.* (1998) uvádí, že dusíkaté látky jsou nenahraditelné pro metabolické procesy v organismu. Umožňují správné fungování orgánů, podílejí se na realizaci genetických informací, tvoří speciální složku hormonů, jsou obsaženy v enzymech a nukleových kyselinách a jsou součástí celé řady dalších důležitých procesů organismu. Za mimořádných podmínek mohou sloužit jako energetický zdroj nebo se podílet na tvorbě glukosy a mastných kyselin (Kudrna *et al.*, 1998).

Přežvýkavci mají jedinečnou schopnost metabolizovat dusík přijatý v krmivu na protein v bacheru. Hlavním komponentem pro syntézu bacherového proteinu je amoniak. Amoniak

může být získán z bílkovinných krmiv z metabolismu přirozeně se vyskytujících bachorových bakterií, nebo přímo z částí NPN. Z bachoru vytvořený protein nebo dusíkaté látky prochází do slezu a do tenkého střeva. Tam jsou rozrušeny na aminokyseliny a jsou využity na pokrytí denní bílkovinné potřeby pro zvíře (Cassel, 1996).

Vzhledem k tomu, že obsah bílkovin v pícech, silážích nebo zrninách používaných ve výživě zvířat je občas nízký na to, aby vyhovoval potřebám zvířat dané kategorie, používají se proto bílkovinné doplňky. Proto je celková analýza bílkovin a dusíkatých látek předkládaných krmiv důležitá. Analýzou se zjistí obsah celkových dusíkatých látek, ale také lze zjistit obsah jednotlivých frakcí dusíkatých látek. Tzn. dle degradovatelnosti dusíkatých látek v bachoru lze zjistit dusíkaté látky nerozpustné v neutrálním detergentu a dusíkaté látky nerozpustné v kyselém detergentu (Saha *et al.*, 2010). A bílkoviny, předkládané přežvýkavcům v krmivech, jsou do značné míry ovlivněny rozsahem bachorové degradace (Broderick, 1987).

Sacharidy

Sacharidy jsou biochemické sloučeniny složené z uhlíku, vodíku a kyslíku (Saha *et al.*, 2010) a jsou jedním z nejdůležitějších zdrojů energie pro zvířata a bachorové mikroorganismy. Patří mezi primární prekurzory tuku a cukru (laktózy) v kravském mléce (Wattiaux *et Armentano*, 2006) a jejich specifickou vlastností je rozdílná fermentace v bachoru, čímž vzniká řada organických látek, zejména organických kyselin (Straková *et Suchý*, 2005). Mikroorganismy, které žijí v bachoru přežvýkavců, umožňují získat organismu energii z vláknitých sacharidů (strukturální sacharidy), které jsou vázány v buněčných stěnách rostlin ligninem (celulóza a hemicelulóza) nebo z vlákniny. Vzhledem k objemnosti vlákniny se zadržuje v bachoru a celulóza a hemicelulóza jsou fermentovány pomalu. S postupným dozráváním rostlin se zvyšuje obsah ligninu a tím i obsah vlákniny a míra fermentace celulózy a hemicelulózy se v bachoru snižuje. Vlákna ve formě dlouhých částic je zcela zásadní pro stimulaci přežvykávání, které je důležité pro rozrušení a fermentaci vlákniny. Přežvykávání stimuluje kontrakce bachoru a zvyšuje tok slin do bachoru. Sliny obsahují hydrogenuhličitan sodný (jedlá soda) a fosfátové soli, které pomáhají udržovat téměř neutrální pH v bachoru. Pokud v předkládané krmné dávce chybí vláknina, má to zpravidla za následek nízký obsah tuku v mléce a přispívá to k různým zdravotním problémům (např. dislokace slezu, bachorové acidóze apod.) (Wattiaux *et Armentano*, 2006).

Nestrukturální sacharidy (NSC), zahrnující škroby a jednoduché cukry, v bachoru fermentují rychle a téměř úplně. Zvyšují energii krmné dávky a tím zlepšují zásobování energií a určují množství bakteriálního proteinu produkovaného v bachoru (Wattiaux *et* Armentano, 2006). Nestrukturální sacharidy poskytují více dostupné energie (Saha *et al.*, 2010) a oproti strukturálním sacharidům nestimulují přežvykování a tvorbu slin a v jejich přebytku mohou bránit fermentaci vlákniny. Proto je pro efektivnost produkce mléka důležitá rovnováha mezi strukturálními a nestrukturálními sacharidy. Mezi hlavní orgány, které se u přežvýkavců podílejí na metabolismu sacharidů, patří bachor, játra a mléčná žláza (Wattiaux *et* Armentano, 2006).

Lipidy

Důležitou skupinou energetických živin jsou lipidy, které jsou nerozpustné ve vodě, ale jsou rozpustné v organických rozpouštědlech (např. ether, chloroform) (Wattiaux *et* Grummer, 2004). Z chemického hlediska se mohou lipidy dělit na jednoduché a složité. Mezi jednoduché lipidy patří tuky a vosky a mezi složité lipidy fosfolipidy, glykolipidy a lipoproteidy (Van Soest, 1994). Tuky patří mezi jejich nejvýznamnější skupinu (Zeman *et al.*, 2006). Krmná dávka dojnic obvykle zahrnuje 2-4 % tuků. Tuky jsou důležitou součástí krmné dávky, protože z 50 % přispívají k tvorbě tuku v mléce a v krmivu jsou nejvíce koncentrovaným zdrojem energie. V píce a semenech je množství tuku nižší, avšak některé plodiny (např. sója, bavlna) mají olejnatá semena, která mohou mít více než 20 % tuku (Wattiaux *et* Grummer, 2004).

Tuk (chemický název „triacylglycerol“) představuje bohatý zdroj energie. Obsahuje 2,25 až 2,8 × více energie, než mají sacharidy (Wattiaux *et* Grummer, 2004) a je vysoce stravitelný. Přidává se do krmných dávek ke zvýšení energetické hodnoty, pokud je příjem krmiva omezen kvůli zdraví zvířete, menší chutnosti přijímaného krmiva, nebo jako důsledek stresu (Saha *et al.*, 2010).

2.2.2. Metabolismus živin

Krmiva mohou být použita při tvorbě krmných dávek pro dojný skot v různých kombinacích a variantách. Předkládané krmné komponenty jsou zdrojem živin, tj. dusíkatých látek, tuků, sacharidů a vlákniny s potřebnou délkou pro správné trávení, metabolismus a produkci.

Protože různá krmiva se liší v obsahu jednotlivých živin, musí být dobře zváženo, která krmiva se do krmné dávky zvolí, aby došlo ke splnění živinových potřeb zvířat. Musí se zohlednit řada faktorů s ohledem na volbu krmiva, jako je typ a původ krmiva, množství krmiv, poměr koncentrovaných a objemných krmiv, minerálů, vitamínů a dalších přidaných látek do krmné dávky. Krmná dávka dojníc se tedy skládá z různých komponentů, které mohou docílit splnění jejich požadavků. Důležité je v tomto směru také eliminovat přebytek či nedostatek jedné nebo více živin v krmné dávce, které mohou ovlivnit (omezit) výkon a produkci zvířat. Proto dochází k optimalizaci předkládaných krmiv díky informacím o živinovém složení krmné dávky a živinovém metabolismu v těle zvířat (Ishler *et al.*, 1996).

Metabolismus dusíkatých látek

Trávení dusíkatých látek probíhá v žaludku a na začátku tenkého střeva (Zeman *et al.*, 2006). Bílkovinná krmiva jsou v batoru přežvýkavců degradována pomocí mikroorganismů přes aminokyseliny na amoniak a mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem (Wattiaux, 1998). Rychlost a rozsah, při kterém dochází k degradaci proteinů, závisí na proteolytické aktivitě batorové mikroflóry a na typu bílkovin, tj. na citlivosti a dostupnosti peptidových vazeb (Zadeh *et al.*, 2013). Avšak nejen bílkovinná krmiva souvisí s výskytem amoniaku v batoru; až 86 % mikroorganismů v batoru je schopno využít pro syntézu tělních aminokyselin i amidové formy dusíku. Dalším zdrojem mikrobiální hydrolyzy dusíkatých látek jsou degradační produkty katabolismu proteinu z krmné dávky, proteiny těl batorových mikroorganismů a dusík, který vzniká při hydrolyze močoviny recirkulované z krve přes batorovou stěnu do batoru (Drevjany *et al.*, 2004; Zadeh *et al.*, 2013). Nízká hladina amoniaku v batoru má za následek nedostatek dusíku pro bakterie a tudíž i pokles stravitelnost krmiva. Naopak, příliš amoniaku v batoru vede ke ztrátám, toxicitě a v extrémních případech ke smrti zvířete (Wattiaux, 1998).

Batorové bakterie využívají amoniak pro svůj růst (Kudrna *et al.*, 1998). Množství amoniaku, které se využije pro tuto syntézu mikrobiálního proteinu, je do značné míry ovlivněno dostupnou energií získanou fermentací sacharidů. V průměru je 20 g bakteriálního proteinu syntetizováno ze 100 g fermentovatelné organické hmoty v batoru. Syntéza bílkovin se může pohybovat od méně než 400 g/den do cca 1500 g/den v závislosti na stravitelnosti přijatých krmiv. Podíl proteinu v bakteriích se pohybuje mezi 38-55 % (Tabulka 5). Pokud tedy dojnice přijmou více krmiva, bakterie obsahují více bílkovin a přechází z batoru do slezu rychleji (Wattiaux, 1998). Za optimální koncentraci amoniaku pro tvorbu

bílkovin se považuje rozmezí 4,7-5,8 mmol/bachorové tekutiny. Avšak reálná hladina amoniaku v bachorové tekutině se obvykle pohybuje mezi 4-12 mmol/l (Hofírek *et* Dvořák, 2009). Pokud se hladina močoviny v krvi a mléce pohybuje nad 5 mmol/l, může se jednat o selhávání bachorové fermentace (Dvořák, 2005).

Tabulka 5. Složení (%) a intestinální stravitelnost dusíku (%) bachorovými mikroorganismy (Wattiaux, 1998).

| Ukazatel | Bakterie | | Nálevníci |
|-------------------|----------|--------|-----------|
| | Průměr | Rozsah | |
| Bílkoviny | 47,5 | 38-55 | – |
| Nukleové kyseliny | 27,6 | – | – |
| Lipidy | 7,0 | 4-25 | – |
| Sacharidy | 11,5 | 6-23 | – |
| Peptidoglykan * | 2,0 | – | – |
| Minerály | 4,4 | – | – |
| Dusíkaté látky | 62,5 | 31-78 | 24-49 |
| Stravitelnost | 71,0 | 44-86 | 76-85 |

* buněčné stěny bakterií

Část bílkovin často odolává bachorové degradaci a v nedegradované formě prochází až do tenkého střeva. Tato odolnost proti bachorové degradaci se liší mezi různými zdroji bílkovin a závisí na řadě faktorů. Bílkoviny v píci jsou obvykle degradovány v širším rozsahu (60-80 %) než bílkoviny koncentrovaných krmiv nebo krmiv vyprodukovaných jako vedlejší produkty průmyslu (20-60 %). Část bakteriálního proteinu je tedy rozložena v bachoru a část proudí spolu s ostatními nestrávenými částmi krmiv do slezu. Silné kyseliny, které jsou vylučované slezem, ukončí veškerou mikrobiální aktivitu přichozího mikrobiálního proteinu a trávicí enzymy začnou rozkládat bílkoviny na aminokyseliny. Následně, až 60 % aminokyselin vstřebaných tenkým střevem pochází z bakteriálního proteinu, zbylých 40 % pochází z nedegradovaných bílkovin z bachoru. Aminokyselinové složení bakteriálních proteinů je relativně konstantní bez ohledu na složení bílkovin. Všechny aminokyseliny, včetně základních, jsou přítomny v bakteriální bílkovině v takovém poměru, který je blízký podílu aminokyselin potřebných mléčnou žlázou pro tvorbu mléka, tj. přeměna bílkovin z krmiva na bakteriální bílkoviny je obvykle prospěšný proces. Výjimka nastává v případě, že zvířata jsou krmena velice kvalitními bílkovinami a amoniak nemůže být v bachoru využit kvůli nedostatku fermentovatelné energie (Wattiaux, 1998).

Mikrobiální protein patří mezi velice hodnotné bílkoviny, ale např. pro vysokoužitkové dojnice nestačí. Chybí v něm např. některé esenciální aminokyseliny (Tabulka 6), které narušují tvorbu bílkovin (tzv. proteosyntézu) (Kudrna *et* Homolka, 2009). Tato tvorba není narušována v případě, že esenciální aminokyselina chybí a v krvi není dostupná a v tento moment se proteosyntéza zastavuje. Pokud se jedná o neesenciální aminokyselinu, může být v organismu syntetizována. Jedná-li s o esenciální aminokyselinu, proteosyntéza ustává a k její obnově dojde jen v případě, že je tato aminokyselina doplněna v krmné dávce. Tato aminokyselina tedy limituje tvorbu bílkovin a nazývá se limitující. U dojnic se považuje za první limitující aminokyselinu lysin (Rulquin, 1994).

Tabulka 6. Rozdělení aminokyselin podle esenciality (Kudrna *et al.*, 1998).

| Esenciální aminokyseliny | Semiesenciální aminokyseliny | Neesenciální aminokyseliny |
|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| histidin | arginin | glycin |
| isoleucin | tyrosin | alanin |
| leucin | cystein | kyselina asparagová |
| lysin | | asparagin |
| methionin | | kyselina glutamová |
| fenylalanin | | glutamin |
| treonin | | prolin |
| trypsin | | hydroxyprolin |
| valin | | serin |

Až 80 % bílkovin, které se dostanou do tenkého střeva, je stráveno. Zbytek nestrávených bílkovin projde až do výkalů. Součástí výkalů je dusík pocházející z trávicích enzymů, které přecházejí do střev a nahrazují střevní buňky jako tzv. metabolický protein výkalů. V průměru z 1 kg přijaté sušiny/den je 33 g tělesné bílkoviny vytvořeno výkaly. Výkaly přežvýkavců patří mezi kvalitní hnojiva, protože jsou bohatá na organickou hmotu. V porovnání s nepřežvýkavými zvířaty obsahují výkaly přežvýkavců 2,2 až 2,6 % dusíku, což odpovídá 14-16 % dusíkatých látek (Wattiaux, 1998).

V případě, že chybí fermentovatelná energie nebo pokud jsou dusíkaté látky krmiv vysoce degradovatelné, tak ne všechny amoniak musí být přeměněn na mikrobiální bílkovinu, tj. nedojde k syntéze mikrobiálního proteinu. Pokud je amoniak v přebytku, přes bachorovou stěnu je transportován do jater a tam je detoxikován na endogenní močovinu, která se uvolní

do krve. Krví se buď může vrátit do bachoru pomocí slin a prostřednictvím bachorové stěny, nebo může být vyloučena močí. Pokud se vrátí zpět do bachoru, je přeměněna zpět na amoniak a může sloužit jako zdroj dusíku pro růst bakterií. Pokud je močovina vyloučena močí, není dále využita. Pokud má krmná dávka nízký obsah dusíkatých látek, většina močoviny je opětovně využita a jen málo se vyloučí ve formě moči z těla ven. S vyšším obsahem dusíkatých látek v krmné dávce se močovina méně opětovně vrací do těla a více se jí vylučuje z organismu ve formě moči (Wattiaux, 1998).

Mléčná žláza dojnic potřebuje během laktace velké množství aminokyselin k syntéze mléčné bílkoviny. Aminokyseliny mohou být přeměněny na jiné aminokyseliny nebo se přeměňují na energii. Většina aminokyselin, která je absorbována v mléčné žláze, se využívá k syntéze mléčné bílkoviny. Mléko obsahuje cca 30 g bílkovin/kg, ovšem v závislosti na mnoha faktorech (např. na plemeni, úrovni výživy apod.) (Wattiaux, 1998).

Až 90 % mléčných bílkovin představuje kasiin. Existuje celá řada typů této mléčné bílkoviny, které přispívají k vysoké mléčné hodnotě mnoha mléčných výrobků. Syrovátková bílkovina je také syntetizována z aminokyselin v mléčné žláze (Wattiaux, 1998). Mezi syrovátkové bílkoviny patří β -laktoglobulin (10 %), α -laktoglobulin (3 %), imunoglobuliny (2 %), krevní albumin (1 %) a albumózopeptonové frakce (2 %) (Jelínek *et al.*, 2003). Enzym α -laktalbumin je nezbytný pro syntézu laktózy a β -laktoglobulin je důležitý pro tvorbu tvarohu při výrobě sýrů. Některé bílkoviny obsažené v mléce (imunoglobuliny) jsou důležité pro obranyschopnost čerstvě narozených telat. Imunoglobuliny nejsou syntetizovány v mléčné žláze, ale jsou absorbovány přímo z krve a proto je jejich koncentrace v kolostru (mlezivu) vysoká. Mléko obsahuje i malé množství sloučenin neproteinového dusíku (př. močovina 0,05 g/kg) (Wattiaux, 1998). Mlezivo se vyznačuje přítomností kromě nejvýznamnější složky imunoglobulinů vysokým obsahem bílkovin, karotenu, vitamínu A, vitamínu E, riboflavinu, niacinu, sodíku, hořčíku a draslíku (Reece, 1997).

Metabolismus sacharidů

Sacharidy jsou pro přežvýkavce a bachorové mikroorganismy nejvýznamnějším zdrojem energie (Wattiaux *et* Armentano, 2006) a běžná krmná dávka hospodářských zvířat obsahuje sacharidy, které pokrývají více než polovinu energie potřebné na záchovu, růst a produkci. Hlavním zdrojem energie zvířat a prekurzorem syntézy laktózy v mléčné žláze je glukóza. Pochopení trávení a vstřebávání sacharidů, dostupnost glukózy v krmné dávce a zapojení

glukogeneze při regulaci homeostázy glukózy je nezbytné pro sestavování krmných dávek, které ovlivňují produkci a kvalitu zemědělských produktů (Nafikov *et* Beitz, 2007).

Během bachorové fermentace mikroorganismy bachoru (zejména bakterie) fermentují sacharidy pro tvorbu energie, plynů (methanu a oxidu uhličitého), tepla a kyselin. Energie vyprodukovaná v průběhu fermentace je využita pro růst bakterií, zejména při syntéze bílkovin. Oxid uhličitý a methan (CH₄) jsou vylučovány prostřednictvím říhání a energie CH₄ se ztrácí. Hlavním produktem bachorové fermentace jsou TMK (Urban *et al.*, 1997). Kyselina octová, propionová a máselná jsou TMK, které tvoří více než 95 % kyselin vytvořených v bachoru (Bannink *et al.*, 2007a). Množství a poměr TMK vytvořených v bachoru ovlivňuje zdroj sacharidů v krmné dávce (Wattiaux *et* Armentano, 2006). V bachoru dojníc se denně vytvoří 3-5 kg kyseliny octové, 1,5-3 kg kyseliny propionové a 1-1,5 kg kyseliny máselné (Spann, 1993). TMK poskytují polovinu až dvě třetiny (cca 50-75 %) z celkového množství metabolizovatelné energie pro dojnice (Bannink, 2007b). Celkové množství mastných kyselin v bachorové tekutině je 80-120 mmol/l. Jejich největší koncentrace je 3-5 hodin po nakrmení zvířat a klesá s ukončením fermentace (Hofírek *et* Dvořák, 2009).

Kyselina octová se podílí na tvorbě TMK až z 65 %, kyselina propionová z 20 % a kyselina máselná z 15 %. V tomto případě může být zásoba kyselinou octovou dostatečná pro maximální produkci mléčného tuku, ale množství kyseliny propionové, vytvořené v bachoru, může omezit množství vyprodukovaného mléka díky omezené dodávce glukózy (zejména na začátku laktace). Nestrukturální sacharidy, obsažené zejména v koncentrovaných krmivech, podporují produkci kyseliny propionové. Zatímco strukturální sacharidy, které se vyskytují více v píci, podporují produkci kyseliny octové. Kromě toho, nestrukturální sacharidy vytváří více TMK (tzn. více energie), protože v bachoru fermentují rychle a úplně (Wattiaux *et* Armentano, 2006). Za ideální poměr kyseliny octové a kyseliny propionové je považován poměr vyšší než 2,4 : 1 (Dvořák, 2005). Zkrmování koncentrátů má za následek zvýšení produkce TMK a zvýšené množství (%) kyseliny propionové na úkor kyseliny octové. Když jsou zvířata krmena velkým množstvím koncentrovaných krmiv (nebo v případě, že jsou krmiva jemně rozemleta) může klesnout podíl kyseliny octové pod 40 %, zatímco podíl kyseliny propionové se může zvýšit nad 40 %. Produkce mléka se může zvýšit díky většímu množství glukózy pocházející z propionátu, ale kyselina octová potřebná pro syntézu tuku může být v nedostatku. Obecně platí, že nedostatek kyseliny octové je spojen se sníženou produkcí tuku a sníženým procentem tuku v mléce. Kromě toho, přebytek kyseliny

propionové (vzhledem ke kyselině octové) představuje pro dojnici dostupnější energii pro ukládání tukových tkání (přírůstek tělesné hmotnosti) než pro syntézu mléka. Tzn. přebytečné koncentráty v krmné dávce mohou vést k tloušťnutí krav a pokud se krmná dávka s přebytečnými koncentráty neomezí, může mít špatný vliv na zdraví dojnice. Např. prodělávají těžké porody, může být zvýšená tvorba tuku v játrech nebo dochází ke ketózám. Na druhé straně, nedostatek koncentrátů v krmné dávce limituje energetický příjem, produkci mléka a produkci mléčné bílkoviny. To znamená, že změny v podílu koncentrovaných krmiv a objemných krmiv (pícnin) v krmné dávce mají zásadní význam na množství a podíl každé TMK vytvořené v batoru. TMK na druhé straně ovlivňují produkci mléka, podíl mléčného tuku a účinnou přeměnu krmiva do tvorby mléka (Wattiaux *et* Armentano, 2006).

Metabolismus lipidů

Většina lipidů je v batoru přežvýkavců hydrolyzována pomocí mikroorganismů a produkty hydrolýzy se účastní dalších procesů přeměny. Vazby mezi glycerolem a mastnými kyselinami jsou rozrušeny až na glycerol a tři mastné kyseliny. Glycerol se rychle fermentuje na TMK (viz *Metabolismus sacharidů*). Některé mastné kyseliny využívají bakterie pro syntézu fosfolipidů, které jsou důležité pro tvorbu buněčné membrány. Dále je pro metabolismus lipidů důležitá hydrogenace nenasycených mastných kyselin, kdy je dvojná vazba mastné kyseliny nahrazena dvěma atomy vodíku. Např. při hydrogenaci se kyselina olejová přemění na kyselinu stearovou (Wattiaux *et* Grummer, 2007).

Volné mastné kyseliny se v batoru připojují ke krmivu a k mikrobiálním částicím a brání normální fermentaci zejména strukturálních sacharidů. Nadbytek tuků v krmné dávce (více než 8 %) může mít negativní vliv na produkci mléka a na množství tuku v mléce. Nenasycené tuky mají horší negativní účinek než tuky nasycené. Nicméně, tuky mohou být „chráněné“, tzn. zpomalit rychlost hydrolýzy a mohou být v batoru inertní. Obaly semen mají tendenci chránit lipidy přímo v obalech a tím je méně zpřístupnit pro batorovou hydrolýzu ve srovnání s oleji. Mikrobiální fosfolipidy tvoří 10-15 % lipidů, které odchází z batoru. Zbývajících 85-90 % jsou nasycené mastné kyseliny, které jsou převážně ve formě kyseliny palmitové a stearové navázané na přijaté krmivo a mikrobiální částice (Wattiaux *et* Grummer, 2007).

Fosfolipidy mikrobiálního původu jsou tráveny v tenkém střevě. Tyto lipidy se podílejí na tvorbě zásobních mastných kyselin, které jsou v tenkém střevě tráveny a vstřebávány přes

stěnu střeva. Žluč, která je vylučována játry, spolu s pankreatickými šťávami, které jsou bohaté na enzymy a hydrogenuhličitany, se mísí s obsahem tenkého střeva. Tyto sekrety jsou nezbytné pro umožnění absorpci pomocí micel, které jsou velice dobře smáčivé a mohou vstoupit do střevních buněk. Ve střevních buňkách jsou hlavní části mastných kyselin navázány na glycerol (z glukózy z krve) za vzniku triglyceridů. Triglyceridy, některé volné mastné kyseliny, cholesterol a další látky lipidům podobné jsou pokryty bílkovinami za vzniku lipoproteinů bohatých na triglyceridy, nazývané též chylomikrony nebo lipoproteiny s velmi nízkou hustotou. Tyto lipoproteiny bohaté na triglyceridy vstupují do lymfatických cév a proudí do hrudního kanálu (do tzv. křížovatky lymfatického systému a krevního systému), kde vstupují do krevního systému. Na rozdíl od většiny živin absorbovaných z gastrointestinálního traktu vstupují přijímané lipidy do krevního oběhu přímo a jsou využívány ve všech tělesných tkáních, aniž by byly předtím zpracovány v játrech (Wattiaux *et* Grummer, 2007).

Obsah mléčného tuku závisí na fermentačních procesech v bachoru a na produkci TMK. Mastné kyseliny tedy ovlivňují až polovinu mléčného tuku. Polovina mléčného tuku a mastných kyselin je syntetizována v mléčné žláze ze vzniklých TMK. Druhá polovina mléčného tuku se do mléčné žlázy dostává spolu s krví ve formě neesterifikovaných mastných kyselin (tzv. non-esterified fatty acids, NEFA). Tyto mastné kyseliny pocházejí především z výše zmiňovaných lipoproteinů bohatých na triglyceridy vytvořených během střevní absorpce lipidů. Vyšší příjem masných kyselin s dlouhým řetězcem (tj. s více než 16 atomy uhlíku) zvyšuje jejich sekreci v mléce, ale zároveň inhibuje syntézu mastných kyselin s krátkým a středně dlouhým řetězcem. Nízký obsah vlákniny v krmné dávce se odráží na sníženém obsahu tuku, což lze částečně kompenzovat navýšením tuku v krmné dávce (Wattiaux *et* Grummer, 2007).

Během období podvýživy dojnic nebo na začátku laktace potřebují dojnice pokrýt potřebu energie. Kromě tuku z krmné dávky mobilizují i zásoby z tukových tělních tkání a mastné kyseliny, pocházející z triglyceridů uložených v tělních tukových tkáních, se uvolňují do krve. Tyto mastné kyseliny se rozpouští v játrech, kde mohou být využity jako zdroj energie nebo mohou být přeměněny na ketony, které mohou být uvolněny do krve a mnoho tkání je pak využívá jako zdroj energie. Játra nemají velkou kapacitu pro vytvoření a transport lipoproteinů bohatých na triglyceridy a přebytek uvolněných mastných kyselin je uložen

v jaterních buňkách. Tuk, který je uložen v játrech, se pak podílí na začátku laktace na rozvoji celé řady metabolických poruch (např. ketóza a ztučnění jater) (Wattiaux *et* Grummer, 2007).

2.3. Systémy na hodnocení živin

2.3.1. Hodnocení dusíkatých látek a aminokyselin

Historicky byly bílkovinné požadavky dojníc, které doporučuje národní rada pro výzkum, tzv. NRC (National Research Council), vyjádřeny jako koncentrace v krmné dávce, protože většina krmivářských pokusů byla prováděna na základě zkoumání vlivu na zvířata na odstupňovanou koncentraci bílkovin v krmné dávce. Výzkumy, týkající se požadavků zvířat na bílkoviny, začaly s největší pravděpodobností v roce 1908 vydáním zprávy Henryho P. Armsby, který byl předsedou organizačního výboru American Society of Animal Nutrition, ve kterém Armsby zdůraznil potřebu studovat tuto problematiku za účelem zlepšení kvality výzkumu bílkovin. Série pokusů na bílkovinné požadavky zvířat, které proběhly v letech 1919-1923, byly zveřejněny spolu s návrhy na další pokusy zaměřených na výživu zvířat tak, aby bylo objasněno chemické složení bílkovin a jejich nutriční hodnota pro hospodářská zvířata. Zejména bylo prokázáno, že rozdílné zastoupení aminokyselin v bílkovinách mění nutriční hodnotu bílkovin. Proto požadavek na bílkoviny lze vyjádřit z hlediska potřeby množství nezbytných aminokyselin buď jednotlivě, nebo společně (Tedeschi *et al.*, 2015).

Od roku 1960 probíhaly metabolické pokusy, v dalších letech byly postupně odvozeny bílkovinné požadavky zvířat vycházejících z krmných pokusů a hodnocení stravitelnosti krmiv (Tedeschi *et al.*, 2015).

Postupně byly definovány jednotlivé požadavky a nároky zvířat na záchovu, růst, březost, laktaci, aminokyselinové složení produktů a účinnost využití absorbovaných aminokyselin (Kudrna *et* Homolka, 2009). V průběhu let došlo k lepšímu poznání bílkovinných vlastností, k lepší frakcionaci bílkovin a byly stanoveny bílkovinné požadavky zvířat v různých fyziologických fázích, což představovalo malý pokrok v požadavcích jednotlivých aminokyselin namísto bílkovinných požadavků. Od 80. let minulého století našly své uplatnění predikční rovnice sloužící k sestavování krmných dávek (Tedeschi *et al.*, 2015).

Souběžně se systémem NRC vznikaly další systémy (Tedeschi *et al.*, 2015):

- britský: Agricultural Research Council (ARC, 1980)
- francouzský: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, 1989),
- australský: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO, 1990),
- německý: Rostock Feed Evaluation System (Beyer *et al.*, 2003).

V České republice se dříve využíval systém stravitelných dusíkatých látek. Tento systém neposkytoval komplexní informace z hlediska fyziologického trávení dusíkatých látek, protože nerespektoval mikrobiální fermentaci v batoru, degradaci dusíkatých látek v batoru ani využití dusíkatých látek vstupujících do tenkého střeva (Harazim *et Homolka*, 2002; Zeman *et al.*, 2006). Systém byl v 90. letech nahrazen francouzským systémem PDI (z francouzského „Protéines vraies réellement digestibles dans l'intestin grêle“, v překladu protein skutečně stravitelný v tenkém střevě), který porovnává příjem živin na základě normované potřeby pro daný druh a užitkovost zvířat a posuzuje požadavky zvířat na zásobení bílkovinami a dusíkatými látkami podle jejich množství skutečně vstupujícího do tenkého střeva. Systém PDI zohledňuje mikrobiální fermentaci v batoru, degradaci dusíkatých látek v krmivech a rozdílné využití dusíkatých látek, které vstupují do tenkého střeva (Kudrna *et Homolka*, 2009).

2.3.2. Systém CNCPS

Cornellský systém (tzv. Cornell Net Carbohydrate and Protein System, CNCPS) byl poprvé publikován v roce 1992 a následně 1993 v sérii čtyř publikací: Fox *et al.* (1992), Russell *et al.* (1992), Sniffen *et al.* (1992) a O'Connor *et al.* (1993) (Fox *et al.*, 2004). Následně byly provedeny další úpravy systému a vyvinuty další submodely: Tylutki *et al.* (1994), Tedeschi *et al.* (2000a), Tedeschi *et al.* (2000b), Tedeschi *et al.* (2001), Tedeschi *et al.* (2002a), Tedeschi *et al.* (2002b) a Tedeschi *et al.* (2008) (Tedeschi *et al.*, 2015). Tento systém hraje důležitou roli ve výživě přežvýkavců a je stále více propracováván (Valderrama *et Anrique*, 2011; Chrenková *et al.*, 2014; Polat *et al.*, 2014 a další).

Podrobný popis tohoto modelu se zaměřením na hodnocení dusíkatých látek a aminokyselin publikoval Fox *et Tedeschi* (2003). Publikace autorů uvádí, že jedním z hlavních řešení

problémů tohoto aminokyselinového modelu je stanovení účinnosti využití specifického aminokyselinového složení (Fox *et* Tedeschi, 2003). V cornellském systému je každá aminokyselina spojena s účinností využití metabolizovatelného proteinu (bílkovina přecházející z bachoru do dalších částí trávicího traktu) v závislosti na fyziologickém stavu zvířete (záchova, březost, dojení), kromě růstu, který jednotlivé aminokyseliny efektivně využívá (Tedeschi *et al.*, 2015).

Obecně byl tento systém vyvinut za účelem prohloubení znalostí o degradovatelnosti a trávení sacharidů a dusíkatých látek a dále byl vyvinut pro přesnější zajištění nutričních požadavků přežvýkavců (Cannas, 2000; Fox *et al.*, 2004). Systém využívá poznatky o složení a trávení krmiv v těle zvířat a tím se snaží zajistit nutriční požadavky přežvýkavců. CNCPS podrobně popsal různě degradovatelné části dusíkatých látek a to na frakci A, B1, B2, B3 a C. Tyto frakce přispívají k lepší predikci využitelnosti přijímaných krmiv, užitkovosti zvířat a jednotlivých živin přecházejících do masné a mléčné produkce (Fox *et al.*, 2004; Ghoorchi *et* Arbabi, 2010; CNCPS, 2014). Tímto znalost jednotlivých frakcí dusíkatých látek umožňuje, aby byla krmná dávka vyvážená ve smyslu míry degradace a průchodu trávení v trávicím traktu, čímž by se zlepšila účinnost využití krmiv (Dinn *et al.*, 1998).

Frakce dusíkatých látek jsou dle cornellského systému rozdělené podrobně v porovnání NRC systémem, který dusíkaté látky rozděluje pouze na frakce A, B a C. Frakce dusíkatých látek krmiv jsou dle cornellského systému detailněji rozděleny na frakce A, B1, B2, B3 a C (Schwab *et al.*, 2003):

- frakce A (neproteinový dusík),
- frakce B1 (rychle rozložitelný protein),
- frakce B2 (středně rozložitelný protein),
- frakce B3 (pomalu rozložitelný protein),
- frakce C (vázaný (nestravitelný) protein).

Tabulka 7. Rozdělení frakcí dusíkatých látek v krmivech (Van Soest, 1994; Licitra *et al.*, 1996).

| Frakce | Popis | Klasifikace |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| Neproteinový dusík | NPN | A |
| Rychle rozložitelný protein | BSP | B1 |
| Středně rozložitelný protein | IP - NDIP | B2 |
| Pomalou rozložitelný protein | NDIP - ADIP | B3 |
| Vázaný (nestravitelný) protein | ADIP | C |

A, neproteinový dusík; ADIP, protein nerozpustný v kyselém detergentu; B1, rychle rozložitelný protein; B2, středně rozložitelný protein; B3, pomalu rozložitelný protein; BSP, v pufru rozpustný protein; C, vázaný (nestravitelný) protein; IP, nerozpustný protein; NDIP, protein nerozpustný v neutrálním detergentu; NPN, neproteinový dusík.

CNCPS systém sjednotil způsoby hodnocení dusíkatých látek v krmivech, které vycházejí z frakcí A, B a C. Oproti hodnocení sacharidových frakcí, které jsou ve srovnání s frakcemi dusíkatých látek sjednoceny a standardizovány. Proto je důležité se zaměřit na standardizaci a validaci těchto laboratorních postupů (Licitra *et al.*, 1996).

Frakce dusíkatých látek

Krmiva obsahují celou řadu bílkovin, ale i dusíkatých látek nebílkovinné povahy (NPN). Tyto dusíkaté látky se souhrnně nazývají frakce dusíkatých látek, též nazývané jako bílkovinné či proteinové frakce. Bílkoviny jsou velké molekuly, které se liší svou velikostí, tvarem, rozpustností a aminokyselinovým složením. Jsou přítomny v buněčných stěnách a v buněčném obsahu rostlinných a živočišných tkání, kde plní celou řadu důležitých funkcí, např. funkce strukturální, zásobní, katalytická, transportní apod. NPN tvoří menší molekuly a zahrnují peptidy, volné aminokyseliny, nukleové kyseliny, amidy, aminy, dusičnany a amoniak. Travniny a luštěniny obsahují tohoto NPN nejvíce a v nejvariabilnějších koncentracích. Siláže obsahují více NPN než seno (30-65 % siláže, 15-25 % seno). A stejně jako u stanovení bílkovin, které se zjišťují přepočtem dusíku koeficientem 6,25, i dusíkaté látky nebílkovinného původu se zjišťují přepočtem dusíku koeficientem 6,25 (Schwab *et al.*, 2003).

Frakce dusíkatých látek, které vycházejí z chemické frakcionace dle Licitry *et al.* (1996), jsou rozdělené dle jejich degradace v batoru a dle jejich stravitelnosti v tenkém střevě na frakci

A, B1, B2, B3 a C. V roce 2015 vydal autorský kolektiv Higgs *et al.* (2015) publikaci s pozměněnou frakcionací NL, tj. frakce A1, A2, B1, B2 a C, kde jsou rozpustné frakce charakterizovány písmenem A (A1, A2), přičemž frakce A1 zahrnuje pouze amoniak, který současně zastupuje i močovinu. Volné aminokyseliny a peptidy s krátkým řetězcem (NPN), které byly původně součástí frakce A, byly přesunuty do frakce A2 určené jako rozpustný skutečný protein. Frakce označené písmenem B (B1 – nerozpustný skutečný protein, B2 – protein navázaný na vlákninu) jsou nerozpustné. Nestravitelná frakce C má ve všech verzích Cornellského systému stejný význam (Higgs *et al.*, 2015).

Frakce A

Tato dusíkatá frakce krmiva (NPN, neproteinový dusík) představuje v batoru rychle degradovatelnou a vstřebatelnou část dusíkatých látek, které do batoru přijdou spolu s přijatým krmivem. Díky této rychlosti batorové degradace a vstřebatelnosti se NPN nedostane do tenkého střeva (Chalupa *et Boston*, 2003).

NPN je z chemického hlediska dusík, který po vysrážení ve specifickém činidlu přechází do filtrátu. Těchto nízkomolekulárních látek mohou krmiva obsahovat širokou škálu (Licitra *et al.*, 1996). Jde o dusík, který se nesráží v kyselině trichloroctové (TCA), ale zároveň je rozpustný v fosfáto-borátovém pufru (Sniffen *et al.*, 1992) a zjistí se jako rozdíl mezi celkovými dusíkatými látkami a mezi hodnotou skutečně vysrážené bílkoviny. Alternativou kyseliny trichloroctové může být použití kyseliny wolframové. Obě tyto kyseliny (kyselina trichloroctové i wolframová) patří mezi nejběžnější srážedla, která se aplikují na krmivech (Licitra *et al.*, 1996).

Tyto nízkomolekulární dusíkaté látky zahrnují peptidy, volné aminokyseliny, nukleové kyseliny, amidy, aminy, dusičnany a amoniak a ve srovnání s nestravitelnou bílkovinou (frakce C) je tato frakce v batoru 100% degradovatelná (Schwab *et al.*, 2003).

NPN se získá po laboratorním stanovení výpočtem jako rozdíl mezi celkovými dusíkatými látkami a mezi dusíkatými látkami nerozpustnými ve srážedle (kyselina trichloroctové nebo wolframová) (Epifanio *et al.*, 2014). Konečné množství NPN se vyjádří buď jako procento z celkových dusíkatých látek, nebo v hmotnostních jednotkách v sušině (Fox *et al.*, 2004).

Za předpokladu, že frakce A je neproteinový dusík, který vstupuje přímo do batoru, může být problém u kvalitních vojtěškových siláží. Až dvě třetiny nebílkovinného dusíku mohou

být peptidy a aminokyseliny, které ovlivňují vyšší nárůst degradujících nestrukturálních sacharidů oproti očekávanému nárůstu amoniaku. Jedná-li se o kvalitní vojtěškovou siláž, mohou být součástí frakce B1 až dvě třetiny tohoto neproteinového dusíku (Fox *et al.*, 2004).

Řadou experimentů bylo prokázáno, že při podávání krmné dávky, kdy byly dusíkaté látky zastoupeny hlavně NPN, docházelo k mírnému nárůstu hmotnosti a mléčné produkce (Broderick, 2007).

Frakce B1

Frakce B je dle jejich možné degradovatelnosti v bachoru rozdělena podrobně na pomalu rozložitelný protein krmiv (B1), středně rozložitelný protein krmiv (B2) a na rychle rozložitelný protein krmiv (B3) (Negrão *et al.*, 2014). Frakce B1 je (stejně jako frakce A) rozpustná ve fosfáto-borátovém pufru, ale sráží se i v TCA nebo v kyselině wolframové (Krishnamoorthy *et al.*, 1983; Licitra *et al.*, 1996). Tato proteinová frakce krmiv obsahuje globuliny a část albuminů (Zeman *et al.*, 2006) a poskytuje peptidy potřebné pro mikroorganismy tak, aby byl zajištěn jejich maximální růst (Fox *et al.*, 2004). Albuminy jsou charakterizovány jako látky bílkovinné povahy rozpustné ve vodě a globuliny jsou charakterizovány jako bílkovinné látky rozpustné v chloridu sodném (Bakshi *et al.*, 2013).

Frakce B1 je v bachoru rychle degradována (120-400 %/hod) (Schwab *et al.*, 2003) a malé množství, které uniklo bachorové degradaci, je v tenkém střevě tráveno ze 100 % (Fox *et al.*, 2004).

Stanovení rychlosti degradace frakce B1 bylo za předpokladu samostatné definice frakce A a frakce B1, protože rychlost degradace těchto frakcí je u rozpustného proteinu a peptidů podobná (Lanzas *et al.*, 2008).

Frakce B2

Rozložitelnost frakce B2 (středně rozložitelný protein) závisí na rychlosti trávení a pasáži trávicím traktem (Sniffen *et al.*, 1992). Po vstupu do trávicího traktu přežvýkavců degraduje tato frakce na nízké úrovni a prostupuje dále do tenkého střeva (Mudřík *et al.*, 2006). Rychlost trávení bývá 3-16 %/hod (Schwab *et al.*, 2003) a množství, které se dostane z bachoru do tenkého střeva, bývá tráveno ze 100 % (Fox *et al.*, 2004). Frakce B2 zahrnuje

albuminy (viz frakce B1) a gluteliny, které jsou charakterizovány jako bílkovinné látky rozpustné v hydroxidu sodném.

Frakce B3 představuje variabilní fermentaci, tj. jedna z jeho částí je fermentována v bachoru a druhá část uniká do tenkého střeva, přičemž cíl této frakce závisí právě na rychlosti trávení a pasáže (Carrera *et al.*, 2012).

Hodnota frakce B2 je jako jediná z proteinových frakcí získávána dopočtem, kdy se od celkových dusíkatých látek krmiva odečítají zbylé frakce, tj. A, B1, B3 a C. Hodnota této středně rozložitelné proteinové frakce bývá oproti ostatním frakcím vyšší, což je dáno tím, že vlastnosti této frakce jsou na střední úrovni rozpustnosti.

Frakce B3

Jak uvádí Sniffen *et al.* (1992), pomalu rozložitelná frakce proteinu krmiva (B3) je frakce nerozpustná v tzv. ND (neutrálním detergentu) a zároveň rozpustná v tzv. AD (kyselém detergentu). Pomalá degradovatelnost této frakce (pomalejší než frakce B1 a B2) spočívá ve vazbě na buněčnou stěnu rostlin a předpokládá se, že její velká část uniká bachorové degradaci (Yu *et al.*, 2003). Fox *et al.* (2004) uvádí, že tato frakce je trávena v tenkém střevě z 80 % a Schwab *et al.* (2003) uvádí, že rychlost trávení je velmi pomalá (0,06-0,55 %/hod).

Frakce B3, reprezentující pomalu degradující část dusíkatých látek krmiv, se zjistí odečtením ADIP od NDIP, neboť tato frakce je právě nerozpustná v ND, ale je rozpustná v AD (Gupta *et al.*, 2011).

Podobně popisují frakci B3 i autoři Pereira *et al.* (2010), kteří říkají, že frakce B3 se určí rozdílem mezi dusíkem nerozpustným v ND (NDIP) a dusíkem nerozpustným v AD (ADIP). Frakce B3 se následně získá odečtením ADIP od NDIP a představuje dusíkaté látky, které jsou přilnuté k buněčné stěně a je u nich předpokládána degradace, avšak nižší míry, než je tomu u frakce B1 nebo B2 (Pereira *et al.*, 2010).

Dusíkaté látky, spojené s NDF, jsou navázané na buněčnou stěnu a zahrnují i nestravitelný dusík, který se nachází v kyselém detergentu. Tedy, dusíkaté látky nerozpustné v neutrálním detergentu, ale rozpustné v kyselém detergentu, jsou stravitelné, ale pomalu degradovatelné a v CNCPS jsou nazývány jako frakce B3. Obecně jsou dusíkaté látky s buněčnou stěnou kovalentně spojeny s hemicelulózami (glykoproteiny, což jsou proteiny s navázanými

sacharidy), které se podílejí na vazbách ve stěnách rostlinných pletiv. Při zahřívání dochází k denaturaci proteinů a mohou se stávat nerozpustnými, čímž se zvyšuje frakce B a zejména frakce C, získávána jako ADIP (Licitra *et al.*, 1996).

Frakce C

Vázaný, neboli nestravitelný protein (frakce C), v batoru nedegraduje, tj. prochází bachorem bez známky degradace do tenkého střeva, a následně není v tenkém střevě stravitelný (Mudřík *et al.*, 2006). Tento vázaný, neboli nestravitelný protein, je nerozpustný v AD a je spojen s Maillardovou reakcí, taninem a ligninem (Sniffen *et al.*, 1992). Z buněčných stěn není možné extrahovat všechny dusík. Zbytkové jádro bývá odolné, nestravitelné a spojené s ligninem a to dokonce i u čerstvé píce, která neobsahuje taniny. Taniny, pokud jsou přítomny, jsou jednou z možností, která zvyšuje nerozpustný protein spojený se stěnou rostlinných buněk. Další možností je tzv. Maillardova neboli neenzymatická reakce hnědnutí způsobená zahřátím a sušením. Tyto frakce mívají nízkou biologickou dostupnost a mají tendenci se objevovat u acido detergentní vlákniny. Zvýšené množství ADF může být z velké části způsobeno produkcí ligninu z neenzymatického hnědnutí (Licitra *et al.*, 1996).

Vzhledem ke složení této frakce může její vysoký podíl v krmné dávce znamenat, že se díky její nedegradovatelnosti může objevit ve výkalech (Navrátil, 2010). Yu *et al.* (2003) uvádí, že frakce C, představující protein nerozpustný v kyselém detergentu, je velice odolná vůči mikrobiálnímu rozkladu a působení enzymů a proto není pro zvíře dostupná (Yu *et al.*, 2003).

Frakce C zastupuje dusíkaté látky, které jsou silnou vazbou spojeny s ligninem a taninem a to zejména díky Maillardově reakci. Tato frakce je z chemického hlediska nerozpustná v AD a představuje tedy součást ADF. V batoru je tato nerozpustná frakce nedegradovatelná a v tenkém střevě je považována za nestravitelnou (Třináctý *et al.*, 2016). Dále tito autoři uvádějí, že proteinová frakce C je důležitým parametrem, neboť její nepřiměřené navýšení způsobuje pokles intestinální stravitelnosti. Výsledné vlastnosti tepelně upravených krmiv jsou pak ovlivněny jak použitou technologií (mikronizace, toustování, extruze apod.), tak i teplotou a dobou působení nebo např. vlhkostí (Třináctý *et al.*, 2016).

Schéma 2. Frakce dusíkatých látek dle CNCPS (Fijałkowska *et al.*, 2015).

| Dusíkaté látky | | |
|---|--|---|
| Skutečný protein | | A Neproteinový dusík |
| V pufru nerozpustný protein | | B1 V pufru rozpustný protein |
| Protein nerozpustný v neutrálním detergentu | | B2 Protein rozpustný v neutrálním detergentu |
| C Protein nerozpustný v kyselém detergentu | B3 Protein rozpustný v kyselém detergentu | |

2.3.3. Systém NRC

Mezi časté systémy hodnocení krmiv patří americký systém NRC (National Research Council) (Kudrna *et Homolka*, 2009). V roce 1945 vydala NRC „Živinné doporučení pro masný skot“ (Recommended Nutrient Allowances for Beef Cattle), které vycházelo z dřívějších Mitchellihovo poznatků z roku 1929, kdy byly definovány minimální požadavky skotu na bílkoviny. Následně bylo ještě v témže roce vydáno „Živinné doporučení pro dojný skot“ (Recommended Nutrient Allowances for Dairy Cattle). V průběhu let 1950 až 1956 byla tato doporučení přeformulována a definována jako „Nutriční požadavky dojného skotu“ (Nutrient Requirements of Dairy Cattle) (Tedeschi *et al.*, 2015).

V průběhu dalších let byl tento systém pro výživu skotu upřesňován. V 70. letech minulého století byly do tohoto systému zahrnuty živinné potřeby z hlediska bachorových mikroorganismů. V 90. letech minulého století byly již zapracovány pojmy bachorová degradace, by-pass protein, v bachoru nedegradovatelný protein a mikrobiální protein. V současné době tento systém zahrnuje celou řadu nutričních modelů zahrnujících model bílkovinných krmiv s rozdělením bílkovinných (dusíkatých) frakcí dle jejich degradovatelnosti. Oba modely NRC vyvinuli v letech 1996, 2000 a 2001 predikční rovnice pro správné vybalancování živin a krmiv pro správnou výživu zvířat. Norma NRC se stala

jednou z možností, jak snížit náklady na výrobní jednotku a zároveň snížit přebytečné vylučování živin, včetně dusíku (Tedeschi *et al.*, 2015).

Norma NRC hodnotí dusíkaté látky pomocí *in situ* metod, které fungují na základě vložení nylonových či polyesterových sáčků do bachoru zvířete. Tento systém hodnotí jednotlivé frakce dusíku, tj. frakci A, B a C (Richter *et* Třináctý, 2009). Frakce A je rychle degradovatelná frakce krmiva. Tato dusíkatá část krmiva je v bachoru úplně degradovatelná a běžně se odhaduje jako % dusíkatých látek, které ze sáčku uniklo během počátečního působení ve vodě zahřáté na 39 °C. Tato rychle degradovatelná část krmiva zahrnuje neproteinový dusík, rychle rozložitelné bílkoviny a bílkovinné části, které jsou menší než póry nylonových a polyesterových sáčků. Frakce B zahrnuje část nerozpustných dusíkatých látek. Tato frakce je spojena s částmi většími, než je velikost pórů nylonových a polyesterových sáčků a je charakterizovaná jako potenciálně rozložitelná část dusíkatých látek krmiv. Degradace této frakce může trvat s ohledem na typ krmiva 48 až 72 hodin. Norma NRC navrhla inkubaci krmiv v časových intervalech 0, 2, 4, 8, 16, 20 a 48 hodin (72 hodin v případě píče). Frakce C reprezentuje v bachoru nedegradovatelnou část dusíkatých látek, tj. zbytek dusíkatých látek po degradaci v nylonovém nebo polyesterovém sáčku (Schwab *et al.*, 2003).

2.3.4. Hodnocení stravitelnosti krmiv

Hodnocení stravitelnosti krmiv je založeno na korelaci stravitelnosti organické hmoty s živinovým ukazatelem krmiva, jako je např. lignin, vláknina apod. (Mudřík *et al.*, 2006). Stravitelnost krmiv obecně klesá s vyšším či rostoucím příjmem krmiv a je ovlivněna řadou faktorů, např. procesem zpracování krmiv, ošetřením krmiv, ale zejména i stářím porostu či agrotechnickými a klimatickými podmínkami (Jeroch *et al.*, 2006). Principem těchto metod je napodobení trávicího traktu přežvýkavců a patří sem metody *in vivo*, *in situ* (nebo *in sacco*), *in vitro* (Koukolová, 2005) a NIRS:

- *in vivo* – bilanční metody, které jsou založeny na úbytku živin, které je způsobeno při průchodu krmiva trávicím traktem (Vencl, 1985),
- *in situ* (*in sacco*) – metody, při kterých se zjistí degradovatelnost živin v bachoru (Ørskov *at* McDonald, 1979),

- *in vitro* – zjednodušeně lze tuto metodu charakterizovat jako simulaci *in vivo* metody aplikovanou v laboratorních podmínkách (Mišurcová, 2011),
- NIRS – spektrometrická metoda v blízké infračervené oblasti (Marten *et al.*, 1983).

Predikce stravitelnosti krmiv může vycházet z výsledků chemických rozborů *in vitro* a *in situ* metod, NIRS (Tinnimit *et Thomas*, 1976; Huhtanen *et al.*, 2006; Jančík, 2007). Tyto metody jsou vyvíjeny a využívány za účelem zjednodušení *in vivo* metod, které jsou časově a finančně náročné, pracné a obtížně standardizovatelné (Brown *et al.*, 2002; Jančík, 2007).

In vivo

Stanovení stravitelnosti metodou *in vivo* je založeno na bilančních pokusech. Tyto metody poskytují určitou znalost o dostupnosti přijatelné energie a živin a nejčastěji se jedná o bilanční pokusy prováděné na skopcích, ale i jednotlivých kategoriích skotu. Tato metoda je náročnější na čas, práci, dostatečné materiální vybavení k pokusům a je vhodné zakomponovat vyrovnanou skupinu pokusných zvířat. Dalším důležitým předpokladem k dosažení kvalitních výsledků je podávání přesně zaznamenaného množství krmiva, evidování přijaté vody a přesný odchyt výkalů a moči v pokusném bilančním období (Vencel, 1985; Rymer, 2000).

Pro hodnocení stravitelnosti *in vivo* metodou na bilančních pokusech na zvířatech je důležité zajistit určitou standardizaci (Schiemann, 1981):

- eliminace faktorů jiných než původu krmiva, které ovlivňují stravitelnost,
- dosažení reprodukovatelnosti,
- zajištění aditivní energetické hodnoty při sestavování krmných dávek.

In situ (in sacco)

Stanovení stravitelnosti metodou *in situ* (známá též jako metoda „nylon bag technique“ či *in sacco*) je založena na úbytku krmiva v sáčku, které jsou na nosiči vloženy do bachoru zvířete, kde se inkubují v časových intervalech 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, případně 72 a 144 hodin (Mehrez *et Ørskov*, 1977; Ørskov, 2000).

Stravitelnost stanovená metodou *in situ* může být ovlivněna celou řadou faktorů, např. velikostí pórů sáčků, velikostí částic testovaného krmiva, navázkou krmiva vzhledem k velikosti sáčků, vliv může mít i předkládaná krmná dávka a druh zvířete (Weakley *et al.*, 1983; Meyer *et Mackie*, 1986; Vanzant *et al.*, 1998; Nandra *et al.*, 2000).

In vitro

Predikce bachorové a střevní degradovatelnosti lze stanovit laboratorně (Tománková *et Kopečný*, 1995; Míka *et al.*, 1997). Tyto laboratorní metody mají oproti metodám s živými zvířaty řadu výhod, tj. nejsou tak časově a finančně nákladné a pracné, nezasahují do walfare zvířat, není zde vliv variability samotných zvířat a není zde problém se standardizací podmínek týkajících se samotných sáčků potřebných k inkubaci, týkající se poměru hmotnosti navážky ve vztahu k povrchu sáčku, krmné dávky a frekvenci krmení (Stern *et al.*, 1997).

Jednou z rozšířených *in vitro* metod je metoda Tilley a Terry (1963), která je založena na inkubaci vzorků krmiv v bachorové tekutině za předepsaných podmínek po dobu 48 hodin a následné inkubaci v roztoku pepsinu a 0,1 M kyseliny chlorovodíkové (Tilley *et Terry*, 1963). Další využívanou metodou v oblasti *in vitro* je metoda tzv. umělého bachoru dle Lampetera (1970), která je srovnatelná s metodou Tilley a Terry (1963).

Obecně se tyto metody dají shrnout jako metody využívající inokula, enzymatické preparáty a chemické roztoky (Koukolová, 2005).

NIRS

Tato metoda reflexní spektroskopie v blízké infračervené oblasti je v posledních letech využívána pro svou přesnost a rychlost stanovení. Tato spektroskopická metoda funguje na principu změn v energetickém stavu vibračních a rotačních pohybů molekul po absorpci elektromagnetického záření. Podle charakteru molekul přítomných ve zkoumaném krmivu následuje odezva infračerveného spektrometru a podle charakteru získaného spektra se zpětně stanoví složení analyzovaného vzorku. Je však zapotřebí dostatečné množství materiálu pro kvantitativní kalibraci (Mudřík *et al.*, 2006).

3. Cíle a hypotézy práce

Cíle práce

- stanovení základních živin a brutto energie vybraných vzorků krmiv,
- stanovení frakcí dusíkatých látek vybraných krmiv na základě Cornellského systému dle laboratorních analýz Licitry *et al.* (1996),
- vytvoření predikčních rovnic na základě základních živinových rozborů a rozborů stravitelné organické hmoty a stravitelných dusíkatých látek,
- statistické vyhodnocení frakcí dusíkatých látek krmiv.

Hypotézy práce:

- soubor krmiv bude vykazovat rozdílné hodnoty jednotlivých frakcí dusíkatých látek,
- mezi živinami, energií, chemickým složením dusíkatých látek a frakcemi dusíkatých látek budou nalezeny statisticky významné rozdíly,
- kombinací jednotlivých živin, energie, chemického složení dusíkatých látek a frakcí dusíkatých látek lze sestavit predikční rovnice pro výpočet stravitelné organické hmoty a stravitelných dusíkatých látek.

4. Metodika

4.1. Testovaná krmiva

K pokusům disertační práce byly vybrány následující vzorky krmiv:

- pastevní porost odebíraný ve dvou vegetačních sezónách v Krkonošském národním parku,
- jadrná a objemná krmiva z krmných dávek pro dojnice na farmě Netluky z Výzkumného ústavu živočišné výroby, v.v.i. Praha Uhřetěves,
- různé hybridy jílků a kostřav z DLF Hladké Životice.

Krmiva byla rozdělena do dvou skupin:

Skupina I

Skupina objemných a jadrných krmiv ($n = 15$):

- vysokohorská pastevní píce odebíraná ve dvou sečích ($n = 2$),
- běžně dostupná a využívaná jadrná a objemná krmiva ($n = 13$).

Skupina II

Skupina objemné píce (hybridů trav) ($n = 30$):

- kostřavovité hybridy ($n = 14$),
- jílkovité hybridy ($n = 16$).

Teoretické i praktické zvládnutí metod, stejně jako vyhodnocování výsledků, probíhalo ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v.v.i., Praha Uhřetěves (VÚŽV), na oddělení Výživy a krmení hospodářských zvířat. Laboratorní postupy byly realizovány v laboratořích a statistické zpracování výsledků bylo konzultováno s biometrickou jednotkou VÚŽV.

Tabulka 8. Přehled pokusných vzorků krmiv.

| Číslo vzorku | Krmivo | Popis krmiva |
|-------------------|--|-----------------|
| Skupina I | | |
| 1 | Lupina bílá ¹ | odrůda Amiga |
| 2 | Lupina bílá ¹ | odrůda Prima |
| 3 | Jetelová siláž ¹ | |
| 4 | Kukuřičná siláž ¹ | |
| 5 | Jílková siláž ¹ | |
| 6 | Travní siláž o vyšší sušině ¹ | |
| 7 | Vojtěšková siláž ¹ | |
| 8 | Ječný šrot ¹ | |
| 9 | Pšeničný šrot ¹ | |
| 10 | Řepkové výlisky ¹ | |
| 11 | Řepka (pokrutina extrudovaná) ¹ | |
| 12 | Řepka (pokrutina bez extrudace) ¹ | |
| 13 | Sójový extrahovaný šrot ¹ | |
| 14 | Pastevní porost ² | 1. seč |
| 15 | Pastevní porost ² | 2. seč |
| Skupina II | | |
| 16 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Kolumbus |
| 17 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Kolumbus |
| 18 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Felina |
| 19 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Felina |
| 20 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Mahulena |
| 21 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Mahulena |
| 22 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Hykor |
| 23 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Hykor |
| 24 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Fojtan |
| 25 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Fojtan |
| 26 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Korina |
| 27 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Korina |
| 28 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Kora |
| 29 | Kostřavovité hybridy ³ | odrůda Kora |
| 30 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Kertak |

Pokračování tabulky 8 na následující straně.

Pokračování tabulky 8.

| | | |
|----|--------------------------------|-----------------|
| 31 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Kentaur |
| 32 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Bečva |
| 33 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Bečva |
| 34 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Odra |
| 35 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Odra |
| 36 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Achilles |
| 37 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Achilles |
| 38 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Hostyn |
| 39 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Hostyn |
| 40 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Perun |
| 41 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Perun |
| 42 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Perseus |
| 43 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Perseus |
| 44 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Lofa |
| 45 | Jílkovité hybridy ³ | odrůda Lofa |

¹Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.; ²Krkonošský národní park; ³DLF Hladké Žitovice.

4.2. Chemické rozborů základních živin

Odebrané vzorky byly usušeny v sušárně při teplotě do 50 °C dle metodiky „Stanovení využitelnosti živin u přežvýkavců“ (Harazim *et al.*, 1999) a pomlety mlýnkem na velikost 1 mm. U laborovaných vzorků byla stanovena:

- sušina,
- dusíkaté látky (NL) dle Kjeldahl metody ($N \times 6,25$),
- hrubá vláknina (CF) (AOAC, 2005),
- neutrálně detergentní vláknina (NDF) dle Van Soesta *et al.* (1991),
- acido detergentní vláknina (ADF) dle Van Soesta *et al.* (1991),
- acido detergentní lignin (ADL) dle Van Soesta *et al.* (1991),
- tuk přímou extrakcí dle Soxhleta,
- popel (AOAC, 2005),
- bezdusíkaté látky výtahové (BNLV),
- brutto energie (BE) (IKA C 5000 Werke, Germany).

Stanovení sušiny

Stanovení sušiny v původním vzorku představuje zbytek krmiva po vysušení v sušárně za předepsaných podmínek při teplotě $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstantní hodnoty. Sušina byla stanovena sušením v hliníkové misce při původním množství krmiva v rozmezí 3-5 g vzorku. Zjišťuje se jako rozdíl mezi hmotností vzorku před vysušením a po vysušení, z čehož se zjistí obsah sušiny v krmivu. Zbytek po vysušení představuje sušina krmiva (dry matter, DM), úbytek po sušení představuje vlhkost.

Výpočet sušiny:

$$x = ((w_1 - w_2) / w_1) \times 100$$

$$\text{DM} = 1000 - x$$

Kde:

x – vlhkost krmiva (g/kg)

DM – sušina krmiva (g/kg)

w₁ – hmotnost navážky před sušením (g)

w₂ – hmotnost vysušeného vzorku (g)

Stanovení popela

Stanovení popela je založeno na dokonalém spálení vzorku krmiva stanoveným způsobem v muflové peci 4,5 hodiny při teplotě $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstantní hmotnosti. Tímto způsobem se zjišťuje rozdíl mezi hmotností vzorku před spálením a po spálení. Z hmotnostního rozdílu se zjistí obsah popela v krmivu a zbytek po spálení představuje popel v krmivu.

Výpočet popela:

$$\text{Popel} = ((w_3 - w_1) / (w_2 - w_1)) \times 100$$

Kde:

Popel (%)

w₁ – hmotnost prázdného kelímku po vysušení (g)

w₂ – hmotnost kelímku s navážkou před zpopelněním (g)

w₃ – hmotnost kelímku se zbytkem po zpopelnění (g)

Stanovení obsahu dusíkatých látek

Dusíkaté látky (NL) byly stanoveny Kjeldahlovou metodou ($N \times 6,25$). Tato metoda vychází z 3 na sebe navazujících laboratorních analýz, tj. mineralizace, destilace a titrace. Pro mineralizaci, neboli převedení organické hmoty na anorganickou, byly potřebné následující chemikálie:

- katalyzátor ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$),
- 30% roztok peroxidu vodíku (30% H_2O_2),
- kyselina sírová (koncentrovaná H_2SO_4),
- hydroxid sodný (NaOH).

Postup pro mineralizaci vycházel z navážky 1,000 g ($\pm 0,0001$ g) vzorku krmiva do mineralizační tuby, kam byly následně přidány chemikálie v množství 5 g katalyzátoru, 2-10 ml 30% H_2O_2 a 25-30 ml H_2SO_4 . Mineralizační blok s mineralizačními tubami se zahříval a mineralizoval při teplotě 420 °C po dobu minimálně 1 hodiny. Po dokonalém spálení, kdy byl vzorek převedený na čirý roztok síranu amonného ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) se světle modrým až zeleným zbarvením, se tuby nechaly vychladnout a pak do nich bylo přidáno 50 ml destilované H_2O . Destilace a titrace proběhla v přístroji Kjelttec. Pro tyto analýzy byly potřebné následující chemikálie:

- hydroxid sodný (NaOH),
- kyselina boritá (H_3BO_3).

Blok s mineralizačními tubami byl vložen do přístroje Kjelttec. Nejdříve proběhla destilace, při níž byl amoniak ze síranu amonného jímán do kyseliny borité. Pak následovala titrace, pomocí které se zjistilo, kolik kyseliny borité bylo amoniakem zneutralizováno.

Výpočet dusíkatých látek:

$$\text{NL} = (\text{M} \times \text{c} \times 6,25 \times \text{titr}) / \text{w}$$

Kde:

NL – dusíkaté látky (g/kg)

M – molekulová hmotnost N

c – normalita použité kyseliny

w – hmotnost navážky vzorku (g)

Stanovení hrubé vlákniny

Stanovení hrubé vlákniny (CF) vychází z metody dle Henneberg-Stohmann pomocí přístroje Ankom nebo Fibertec. Pro tuto práci byla hrubá vláknina zanalyzována na přístroji Fibertec a stanovila se zahříváním krmiva při 60 °C v kyselém a vzápětí v neutrálním roztoku. Do skleněné frity byl navážen 1,000 g ($\pm 0,0001$ g) vzorku. Frity byly vloženy do přístroje Fibertec a vzorek byl zahříván při teplotě cca 60 °C 30 minut v 1,25% roztoku kyseliny sírové a poté 30 minut v 1,25% roztoku hydroxidu draselného. Následně byly vzorky promyty acetonem 3 \times 3 min a po dostatečném vyvětrání byly sušeny v sušárně 4,5 hodiny při teplotě 103 °C \pm 2 °C. Váha byla zaznamenána, frity byly vloženy do pece a byly spalovány při 550°C \pm 20 °C po dobu 4,5 hodiny. Váha frity po vychladnutí byla zapsána a poté byl vypočítán obsah hrubé vlákniny.

Výpočet hrubé vlákniny:

$$CF = 100 \times (m_1 - m_2) / m_0$$

Kde:

CF – hrubá vláknina (%)

m₁ – hmotnost frity s vysušeným vzorkem po analýze (g)

m₂ – hmotnost po spálení (g)

m₀ – hmotnost navážky vzorku (g)

Stanovení neutrálně detergentní vlákniny pomocí přístroje Fibertec

Neutrálně detergentní vláknina (NDF) byla stanovena na přístroji Fibertec podle Van Soesta *et al.* (1991). Analýza vychází z působení neutrálního prostředí (neutrálního detergentu, ND) na vzorek. Složení neutrálního roztoku (ND) je následující:

- 30 g laurylsulfátu sodného (CH₃(CH₂)₁₁SO₃Na),
- 18,61 g dihydrátu ethylendiamintetraoctanu disodného (EDTA),
- 6,81 g dekahydrátu tetraboritanu disodného (Na₂B₄O₇·10H₂O),

- 4,56 g bezvodého hydrogenfosforečnanu sodného (Na_2HPO_4),
- 10 ml triethylenglykolu ($\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$).

Všechny chemikálie byly rozpouštěny v cca 800 ml zahřáté destilované vody a následně byly doplněny do objemu 1000 ml. Samotný proces vycházel z navážky 1,000 g ($\pm 0,0001$ g) vzorku do frit. Frity byly vloženy do přístroje Fibertec, byly doplněny 100 ml ND roztoku, byly přidány 2 ml standardizovaného amylázového roztoku (pro 6 vzorků se smíchá 0,613 ml alfa amylázy a 27,5 ml ND roztoku) a přivedeny k varu. Poté se teplota snížila na cca 60 °C a takto se vzorky zahřívaly po dobu 60 min. Po ukončení hydrolýzy byl roztok z frit odsát a přidalo se 30 ml horké destilované vody a 2 ml standardizovaného amylázového roztoku na dobu 1 min. Poté bylo činidlo odsáto a vzorky se promývaly horkou destilovanou vodou. Frity se přemístily do studené jednotky a pomocí acetonu se 3 × 3 min promíchaly a odsály (aceton extrahuje případná barviva a tuk). Takto připravené frity se po dostatečném vyvětrání sušily v sušárně 4,5 hodiny (nebo nejlépe přes noc) při teplotě 103 °C \pm 2 °C. Váha byla zaznamenána, frity byly vloženy do pece a spalovaly se při 550°C \pm 20 °C po dobu 4,5 hodiny. Váha frity po vychladnutí byla zaznamenána a poté byla vypočítána neutrálně detergentní vláknina.

Výpočet neutrálně detergentní vlákniny:

$$\text{NDF} = 100 \times (m_1 - m_2) / m_0$$

Kde:

NDF – neutrálně detergentní vláknina (%)

m_1 – hmotnost frity s vysušeným vzorkem po analýze (g)

m_2 – hmotnost frity po spálení (g)

m_0 – hmotnost navážky vzorku (g)

Stanovení acido detergentní vlákniny pomocí přístroje Fibertec

Acido detergentní vláknina (ADF) byla stanovena na přístroji Fibertec podle Van Soesta *et al.* (1991). Analýza vychází z působení kyselého prostředí (kyselého detergentu, AD) na vzorek. Složení kyselého roztoku (AD):

- 20 g cetyltrimetylammonium bromidu (CTAB),

- 27,8 ml 1 N H₂SO₄,
- vše bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno po rysku 1000 ml.

Samotný proces vycházel z navážky 1,000 g ($\pm 0,0001$ g) vzorku do frit. Frity byly vloženy do přístroje Fibertec, byly doplněny 100 ml AD roztoku a po dosažení bodu varu byly po dobu 60 min zahřívány při teplotě cca 60 °C. Poté byl AD roztok z frit odsát a frity byly promývány horkou destilovanou vodou. Po dostatečném promytí se vložily do studené jednotky a pomocí acetonu se 3 × 3 min promíchaly a odsály (aceton extrahuje případná barviva a tuk). Takto připravené frity se sušily v sušárně 4,5 hodiny (nebo nejlépe přes noc) při teplotě 103 °C \pm 2 °C. Váha byla zaznamenána, frity byly vloženy do pece a spalovaly se při 550°C \pm 20 °C po dobu 4,5 hodiny. Váha frity po vychladnutí byla zaznamenána a poté byla vypočítána acido detergentní vláknina.

Výpočet acido detergentní vlákniny:

$$ADF = 100 \times (m_1 - m_2) / m_0$$

Kde:

ADF – acido detergentní vláknina (%)

m₁ – hmotnost frity s vysušeným vzorkem po analýze (g)

m₂ – hmotnost frity po spálení (g)

m₀ – hmotnost navážky vzorku (g)

Stanovení acido detergentního ligninu pomocí přístroje Fibertec

Lignin je stanovován jako zbytek ligninocelulózového komplexu po ošetření 72% H₂SO₄ při pokojové teplotě pomocí přístroje Fibertec dle Van Soesta *et al.* (1991). Samotný proces vycházel ze stejného postupu, jako při stanovení ADF. Nejdříve se musel připravit AD roztok:

- 20 g cetyltrimetylammonium bromidu (CTAB),
- 27,8 ml 1 N H₂SO₄,
- vše bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno po rysku 1000 ml.

Analýza vychází z navážky 1,000 g ($\pm 0,0001$) krmiva do frit. Frity byly vloženy do přístroje Fibertec, byly doplněny 100 ml AD roztoku a po dosažení bodu varu byly po dobu 60 min

zahřívány při teplotě cca 60 °C. Poté byl AD roztok z frit odsát a frity byly promývány horkou destilovanou vodou. Po dostatečném promytí se takto připravený vzorek umístil do kádinky s roztokem 72% H₂SO₄, kde došlo k promísení. V případě, že se z obsahu vytvořily hrudky, použila se skleněná tyčinka na rozetření. Takto se vzorek ponechal stát 3 hodiny při pokojové teplotě za občasného míchání (každou hodinu). Po 3 hodinách se kyselina ze vzorku odfiltrovala a takto připravené frity se vzorky se sušily v sušárně 4,5 hodiny (nebo nejlépe přes noc) při teplotě 103 °C ± 2 °C. Váha byla zaznamenána, frity byly vloženy do pece a spalovány se při 550 °C ± 20 °C po dobu 4,5 hodiny. Váha frity po vychladnutí byla zaznamenána a poté byl vypočítán acido detergentní lignin.

Výpočet acido detergentního ligninu:

$$ADL = 100 \times (m_1 - m_2) / m_0$$

Kde:

ADL – acido detergentní lignin (%)

m₁ – hmotnost frity s vysušeným vzorkem po analýze (g)

m₂ – hmotnost frity po spálení (g)

m₀ – hmotnost navážky vzorku (g)

Stanovení tuků

Tuky byly stanoveny přímou extrakcí petroléterem na přístroji Soxtec metodou dle Soxhleta. Tato metoda vychází z přesné navážky vzorku 2 g (± 0,0001 g) do extrakčních patron, které se umísťují do olejové lázně přístroje Soxtec. Tam probíhala 120 minut extrakce tuku petroléterem do extrakčních baněk, které byly nasazené na přístroji. Po odpaření petroléteru byly extrakční baňky vyjmuty a sušeny v sušárně po dobu 30 minut při teplotě 103 °C ± 2 °C. Po vysušení a vychladnutí byly extrakční baňky zváženy a byl vypočítán obsah tuku.

Výpočet tuku:

$$Tuk = (w_3 - w_1) \times 100 / (w_2 \times DM)$$

Kde:

Tuk – obsah tuku (%)

w₁ – hmotnost extrakční baňky

w₂ – navážka vzorku (g)

w₃ – hmotnost extrakční baňky vyextrahovaným tukem

DM – obsah sušiny původního vzorku (% DM/100)

Stanovení energie

Energetická hodnota krmiva byla stanovena v laboratoři na kalorimetru. Tato energie krmiva, vloženého do kalorimetru v podobě granule, se stanovila jako spalné teplo, které se uvolnilo při spálení krmiva v kalorimetrické bombě. Takto stanovená energie se označuje jako brutto energie (BE) a představuje celkový obsah energie v krmivu v MJ/kg.

4.3. Laboratorní analýzy frakcí dusíkatých látek

Disertační práce je založena na stanovení jednotlivých frakcí dusíkatých látek dle jejich degradovatelnosti. Degradovatelnost dusíkatých látek byla stanovena laboratorními metodami dle Licitry *et al.* (1996).

Laboratorní stanovení byla následující (Licitra *et al.*, 1996):

- stanovení neproteinového dusíku,
- stanovení rozpustného dusíku a proteinu,
- stanovení dusíku nerozpustného v kyselém detergentu,
- stanovení dusíku nerozpustného v neutrálním detergentu.

Mezi základní laboratorní vybavení patří přístroj na stanovení dusíkatých látek dle Kjeldahla. V této disertační práci byl využit přístroj Kjeltec 2400, který je plně automatizován a umožňuje analýzu až 60 vzorků najednou. Dále je potřeba přístroj na stanovení vlákniny. Pro tuto práci byl využit přístroj Fibertec, který slouží ke stanovení jednotlivých frakcí strukturálních sacharidů, tj. acido detergentní vlákniny, neutrálně detergentní vlákniny a ke stanovení ligninu. Dále je zapotřebí standardního laboratorního vybavení.

Stanovení neproteinového dusíku (Licitra et al., 1996)

Neproteinový dusík (NPN), který se získá po laboratorním stanovení výpočtem jako rozdíl mezi celkovými dusíkatými látkami a mezi dusíkatými látkami nerozpustnými v kyselině trichloroctové (nebo v kyselině wolframové) představuje v bacheru rychle degradovatelnou a vstřebatelnou část dusíkatých látek.

Pro tuto analýzu je potřeba následující laboratorní vybavení:

- filtrační papíry,
- analytické váhy,
- Erlenmeyerovy baňky (100 ml),
- filtrační Büchnerovy nálevky,
- mineralizační blok,
- mineralizační tuby,
- Kjeldahl přístroj.
- Potřebné roztoky:
- 10 g kyseliny trichloroctové ($C_2HCl_3O_2$) doplněné destilovanou H_2O do 100 ml.

Stanovení NPN vycházelo z navážky 0,5 g ($\pm 0,0001$ g) vzorku do Erlenmeyerovy baňky. Metodika dle Licitry *et al.* (1996) uvádí objem Erlenmeyerovy baňky 150 ml. Tento objem jsme však k dispozici neměli a tak jsme použili Erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml, které se následně osvědčily. Do těchto 100 ml Erlenmeyerových baněk se k naváženému vzorku přidalo 50 ml destilované H_2O . Takto připravený vzorek se ponechal stát při pokojové teplotě 30 minut. Následně se přidalo 10 ml 10% TCA a takto se to nechalo působit dalších 30 minut. Poté byl vzorek převeden pomocí gravitace do filtračních papírů. Po převedení se filtrační papírek s převedeným vzorkem dle potřeby nejméně dvakrát promýval připraveným roztokem TCA až do úplného vyčištění Erlenmeyerovy baňky a byl přenesen do mineralizačních tub určených pro stanovení zbytkového dusíku v přístroji Kjeltec. Tuby se vysušily, nejlépe přes noc, při $103 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, následně se vzorky zmineralizovaly a pak na přístroji Kjeltec stanovil zbytkový dusík.

Výpočet zbytkového dusíku po Kjeldahl proceduře:

$$NL = (M \times c \times 6,25 \times \text{titr}) / w$$

Kde:

NL – dusíkaté látky (g/kg)

M – molekulová hmotnost N

c – normalita použité kyseliny

w – hmotnost navážky vzorku (g)

Stanovení rozpustného dusíku a proteinu (Licitra et al., 1996)

Rozpustný dusík a proteiny jsou definovány jako skutečný protein, který je rozpustný v pufru a má pH stejné jako bachor. Při tomto stanovení se ze vzorku vyloučí NPN v podobě frakce A odečtením zbytkového (nerozpustného) dusíku, který po působení pufru a roztoku azidu sodného ve vzorku zůstal, od celkových dusíkatých látek je zjištěn rozpustný protein (soluble protein, SOLP).

Pro tuto analýzu je potřeba následující laboratorní vybavení:

- filtrační papíry,
- analytické váhy,
- Erlenmeyerovy baňky (100 ml),
- filtrační Büchnerovy nálevky,
- membránová vývěva,
- odsávací baňka s gumovou zátkou (upravená pro nasazení nálevek a pro filtraci pod tlakem),
- sklopná pipeta se špačkem 50 ml,
- pipeta o objemu 1 ml,
- mineralizační blok,
- mineralizační tuby,
- Kjeldahl přístroj.

Příprava fosfáto-borátového pufru:

- 13,79 g dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),
- 8,91 g dekahydrátu tetraboritanu disodného ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$),
- 100 ml $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$,
- doplnit destilovanou H_2O do 1 litru.

Příprava roztoku azidu sodného:

- 10 g azidu sodného (NaN_3)
- doplnit destilovanou vodou do 100 ml.

Stanovení rozpustného dusíku a proteinu vycházelo z navážky 0,5 g ($\pm 0,0001$ g) vzorku do Erlenmeyerovy baňky. Metodika dle Licitry *et al.* (1996) uvádí použít 250 ml Erlenmeyerovu baňku, pro lepší převedení vzorku se osvědčila Erlenmayerova baňka o menším objemu 100 ml. Do baňky ke vzorku bylo přidáno 50 ml fosfáto-borátového pufru o pH 6,7-6,8 a 1 ml roztoku azidu sodného. Takto připravený vzorek se nechal stát při pokojové teplotě 3 hodiny. Poté byl vzorek přefiltrován pomocí gravitace 250 ml studené destilované H_2O . Zfiltrovaný vzorek byl přenesen do připravených mineralizačních tub určených pro stanovení zbytkového dusíku v přístroji Kjeldtec. Tuby se vysušily, nejlépe přes noc, při $103\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$, následně se vzorky zmineralizovaly a pak se v přístroji Kjeldtec stanovil zbytkový dusík.

Výpočet zbytkového dusíku po Kjeldahl proceduře:

$$\text{NL} = (\text{M} \times \text{c} \times 6,25 \times \text{titr}) / \text{w}$$

Kde:

NL – dusíkaté látky (g/kg)

M – molekulová hmotnost N

c – normalita použité kyseliny

w – hmotnost navážky vzorku (g)

Stanovení dusíku nerozpustného v kyselém detergentu (Licitra et al., 1996)

Dusík nerozpustný v kyselém detergentu se stanoví po stejné analýze, jako při stanovení ADF, tj. za použití AD roztoku na přístroji Fibertec. Po skončení analýzy je zbytkový dusík z frit převeden na filtrační papír a do mineralizačních tub a je zjištěn zbytkový dusík.

Pro tuto analýzu je potřeba následující laboratorní vybavení:

- filtrační papíry,
- analytické váhy,
- skleněné frity,

- přístroj Fibertec,
- mineralizační blok,
- mineralizační tuby,
- Kjeldahl přístroj.

Postup je následující:

Do skleněných frit určených do přístroje Fibertec se navážilo 0,5 g ($\pm 0,0001$ g) vzorku. Po nasazení frit do přístroje Fibertec a jejich dostatečném usazení bylo přidáno 100 ml AD roztoku a vše bylo uvedeno do varu. Poté následovala analýza shodná s kapitolou *Stanovení acido detergentní vlákniny na přístroji Fibertec* až po konečné vysušení vzorku v sušárně při teplotě $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 4,5 hod nebo nejlépe přes noc. Po usušení byly frity s rezidui zváženy a hmotnost zaznamenána. Následovalo převedení vzorku z fibertecových frit pomocí destilované H₂O na filtrační papír, přebytečná H₂O se odsála pomocí membránové vývěvy a vzorky byly přeneseny do mineralizačních tub určených pro stanovení zbytkového dusíku v přístroji Kjeltec. Po stanovení zbytkového dusíku byl vypočítán obsah dusíku nerozpustného v kyselém detergentu.

Výpočet zbytkového dusíku po Kjeldahl proceduře:

$$\text{NL} = (\text{M} \times \text{c} \times 6,25 \times \text{titr}) / \text{w}$$

Kde:

NL – dusíkaté látky (g/kg)

M – molekulová hmotnost N

c – normalita použité kyseliny

w – hmotnost navážky vzorku (g)

Stanovení dusíku nerozpustného v neutrálním detergentu (Licitra et al., 1996)

Stanovením dusíku nerozpustného v neutrálním detergentu (NDIP) se dopočítáváním z ostatních analýz získává frakce B2 (středně rozložitelný protein) a frakce B3 (pomalu rozložitelný protein). Tento dusík nerozpustný v ND je získáván na stejném principu, jako analýza NDF.

Pro tuto analýzu je potřeba následující laboratorní vybavení:

- filtrační papíry,
- analytické váhy,
- skleněné frity,
- přístroj Fibertec,
- mineralizační blok,
- mineralizační tuby,
- Kjeldahl přístroj.

Postup je následující:

Do skleněných frit určených do přístroje Fibertec se navázilo 0,5 g ($\pm 0,0001$ g) vzorku. Po nasazení frit do přístroje Fibertec a jejich dostatečném usazení bylo přidáno 100 ml ND roztoku a vše bylo uvedeno do varu. Poté následovala analýza shodná s kapitolou *Stanovení neutrálně detergentní vlákniny na přístroji Fibertec* až po konečné vysušení vzorku v sušárně při teplotě $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 4,5 hod nebo nejlépe přes noc. Po usušení byly frity s rezidui zváženy a hmotnost zaznamenána. Následovalo převedení vzorku z fibertecových frit pomocí destilované H₂O na filtrační papír, přebytečná H₂O se odsála pomocí membránové vývěvy a vzorky byly přeneseny do mineralizačních tub určených pro stanovení zbytkového dusíku v přístroji Kjeltec. Po stanovení zbytkového dusíku byl vypočítán obsah dusíku nerozpustného v neutrálním detergentu.

Výpočet zbytkového dusíku po Kjeldahl proceduře:

$$\text{NL} = (\text{M} \times \text{c} \times 6,25 \times \text{titr}) / \text{w}$$

Kde:

NL – dusíkaté látky (g/kg)

M – molekulová hmotnost N

c – normalita použité kyseliny

w – hmotnost navážky vzorku (g)

Výpočty frakcí dusíkatých látek

Výpočet pro vyjádření frakcí dusíkatých látek v g/kg NL (Cazzato *et al.*, 2012):

$$\text{frakce A} = \text{NPN (g/kg SOLP)} \times 0,01 \times \text{SOLP (g/kg NL)}$$

$$\text{frakce B1} = \text{SOLP} - \text{frakce A (g/kg NL)}$$

$$\text{frakce B2} = 1000 - \text{A} - \text{B1} - \text{B3} - \text{C (g/kg NL)}$$

$$\text{frakce B3} = \text{NDIP} - \text{ADIP (g/kg NL)}$$

$$\text{frakce C} = \text{ADIP (g/kg NL)}$$

Frakce A, neproteinový dusík; ADIP, protein nerozpustný v kyselém detergentu; frakce B1, rychle rozložitelný protein; frakce B2, středně rozložitelný protein; frakce B3, pomalu rozložitelný protein; frakce C, vázaný (nestravitelný) protein; NDIP, protein nerozpustný v neutrálním detergentu; NL, dusíkaté látky; SOLP, rozpustný protein.

4.4. Statistické vyhodnocení

Data byla statisticky vyhodnocena v programu SAS 9.4 (SAS, 2003), proceduře GLM (PROC GLM) a pomocí procedury PROC CORR byly vyhodnoceny korelační koeficienty mezi jednotlivými sledovanými proměnnými. Test statisticky významných rozdílů byl vyhodnocen Scheffého analýzou ($P < 0,05$). Predikční rovnice pro SOH a SNL byly testovány pomocí Linear Regression Model (PROC REG) (SAS, 2003). Minimální hladina významnosti pro testování regresního koeficientu byla $P < 0,0001$.

5. Výsledky a diskuse

V disertační práci jsou prezentovány výsledky jednotlivých stanovení živin a energie zvolených souborů krmiv, chemické složení NL a dále výsledky frakcí dusíkatých látek krmiv, jejich statistické zhodnocení a u vybraného souboru krmiv získání predikčních rovnic na základě získaných výsledků z laboratorních analýz.

Základní živiny a energie byly stanoveny pomocí základních laboratorních metod. Frakce dusíkatých látek byly získány pomocí laboratorních metod dle Cornellského systému na stanovení frakcí NL a stravitelnost OH a NL krmiv vybraného souboru krmiv byla stanovena ve Výzkumné stanici Jevíčko v NIR oblasti (spektrofotometr FOSS NIRSystems 6500, CompanyNIRSystems, Inc., Silver Spring, USA).

Jednotlivá rozborovaná krmiva byla rozdělena do 2 skupin. Skupina I představovala 2 vzorky píče odebírané ve dvou sečích a dále běžně dostupná a hospodářským zvířatům zkrmovaná objemná a jadrná krmiva. Skupina II zahrnovala hybridy tzv. Festulolium, tj. hybridy kostřav a jílků. Pro každou skupinu byla zvlášť vyhodnocena a zpracována data na základě laboratorních analýz. Následně byla provedena statistická analýza dat v programu SAS 9.4 (SAS, 2003). Výsledky obou skupiny byly zpracovány do dvou vědeckých IF publikací.

5.1. Výsledky rozborů sledovaných vzorků krmiv u souboru I

5.1.1. Základní živinové složení a energie

Živinové složení a energie lupin, koncentrovaných krmiv a pastevních porostů je uvedeno v tabulce 9. Dle předpokladů, obsah NL u pastevních porostů (vzorek 14, vzorek 15) s postupující vegetační fází porostu se snižoval a oproti tomu obsah vlákniny a ligninu se zvyšoval (Tabulka 9). Ostatní krmiva tohoto souboru vykazovala typické hodnoty NL a vlákniny, ale i ostatních chemických rozborů a energie. Toto chemické složení krmiv může být ovlivněno mnoha faktory, jako např. půdním typem, hnojením, klimatickými podmínkami (Van Soest, 1994; Valderrama *et Anrique*, 2011) či sklizní porostů (Kopecký *et al.*, 2017).

Tabulka 9. Živinné složení (g/kg sušiny) a energie (MJ/kg sušiny) krmiv u souboru I.

| Číslo vzorku | NL | Tuk | BNLV | Popel | OH | CF | ADF | NDF | ADL | BE |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 1 | 293,3 | 97,9 | 338,7 | 42,6 | 957,4 | 227,5 | 320,4 | 550,6 | 60,0 | 20,6 |
| 2 | 386,3 | 95,6 | 306,8 | 43,9 | 956,1 | 167,4 | 237,4 | 495,6 | 54,9 | 20,8 |
| 3 | 179,8 | 17,5 | 439,4 | 94,4 | 905,6 | 268,9 | 380,3 | 423,1 | 52,9 | 18,3 |
| 4 | 69,5 | 28,1 | 647,3 | 44,8 | 955,2 | 210,3 | 259,9 | 434,4 | 28,0 | 18,2 |
| 5 | 192,8 | 26,4 | 333,0 | 192,2 | 807,8 | 255,6 | 257,8 | 364,2 | 21,1 | 18,7 |
| 6 | 161,3 | 24,4 | 474,5 | 73,9 | 926,1 | 265,9 | 409,7 | 459,4 | 103,7 | 19,3 |
| 7 | 187,8 | 17,3 | 306,6 | 123,3 | 876,7 | 365,0 | 79,9 | 468,6 | 94,0 | 19,3 |
| 8 | 115,1 | 26,0 | 774,3 | 29,9 | 970,1 | 54,7 | 77,4 | 195,4 | 12,6 | 18,4 |
| 9 | 144,1 | 28,3 | 772,9 | 29,7 | 170,3 | 25,0 | 74,8 | 147,1 | 8,2 | 16,8 |
| 10 | 314,6 | 109,9 | 396,5 | 85,6 | 914,4 | 93,4 | 166,3 | 188,5 | 70,1 | 21,3 |
| 11 | 313,2 | 141,4 | 310,5 | 65,5 | 934,5 | 169,4 | 197,7 | 214,9 | 79,4 | 21,9 |
| 12 | 319,1 | 133,2 | 339,3 | 65,1 | 935,0 | 143,3 | 188,3 | 234,6 | 87,4 | 21,6 |
| 13 | 531,3 | 26,4 | 320,9 | 76,4 | 923,6 | 45,0 | 79,9 | 151,2 | 6,3 | 19,8 |
| 14 | 237,5 | 18,7 | 473,4 | 60,0 | 940,0 | 210,4 | 308,6 | 724,4 | 43,9 | 20,2 |
| 15 | 132,0 | 22,6 | 435,1 | 63,5 | 936,5 | 346,8 | 381,2 | 676,2 | 64,9 | 19,6 |

ADF, acido detergentní vláknina; ADL, acido detergentní lignin; BE, brutto energie; BNLV, bezdusíkaté látky výtažkové; CF, hrubá vláknina; NL, dusíkaté látky; OH, organická hmota.

1, lupina bílá Amiga; 2, lupina bílá Prima; 3, jetelová siláž; 4, kukuřičná siláž; 5, jílková siláž; 6, travní siláž o vyšší sušiny; 7, vojtěšková siláž; 8, ječný šrot; 9, pšeničný šrot; 10, řepkové výlisky; 11, řepka (pokrutina extrudovaná); 12, řepka (pokrutina bez extrudace); 13, sójový extrahovaný šrot; 14, pastevní porost 1. seč; 15, pastevní porost 2. seč.

Obsah NL krmiv se pohyboval od 69,5 do 531,3 g/kg sušiny. Hodnoty NL lupiny Amiga a Prima (293,3 a 386,3 g/kg sušiny, resp.) nebyly výrazně odlišné od výsledků publikovaných v práci Straková *et al.* (2006) (329,6 a 305,7 g/kg sušiny, resp.) Další sledovanou živinou v této práci byla hrubá vláknina. Hrubá vláknina ve světě již nepatří mezi sledované parametry, ale čeští farmáři se o tuto živinnou hodnotu stále zajímají, proto její stanovení bylo do práce zařazeno. Hodnoty hrubé vlákniny v této práci byly 167,4 a 227,5 g/kg sušiny pro lupiny, v rozmezí hodnot 210,3 až 365,0 g/kg sušiny pro siláže, od 25,0 do 169,4 g/kg sušiny pro koncentrovaná krmiva a 210,4 a 346,8 g/kg sušiny pro pastevní porosty. Hodnoty frakcí vlákniny NDF, ADF a ADL jsou prezentovány v tabulce 9. Se zvyšujícím se stářím byla potvrzena lignifikace pastevního porostu (ADL, 43,9 a 64,9 g/kg sušiny pro 1. a 2. seč, resp.) Tento trend již publikovala celá řada autorů (Coblentz *et al.*, 1998; Rinne *et Nykänen*, 2000; Homolka *et al.*, 2012 a řada dalších). Brutto energie sledovaných krmiv souboru I byla v průměru 19,7 MJ/kg sušiny.

Výsledky základního živinového složení a energie studovaných krmiv v této práci je možné popsat jako hodnoty standardní a lze je porovnat s řadou významných publikací (Van Soest, 1994; Elizalde *et al.*, 1999; Ghoorchi *et Arbabi*, 2010; Rinne *et Nykänen*, 2000; Straková *et al.*, 2006).

5.1.2. Stanovení frakcí dusíkatých látek

Tabulka 10 ukazuje chemické složení NL vycházejících z hodnot NPN, IP, SOLP, NDIP a ADIP v g/kg sušiny dle Licitry *et al.* (1996) u sledovaných lupin, koncentrovaných krmiv a pastevních porostů.

Tabulka 10. Chemické složení NL (g/kg sušiny) sledovaného souboru krmiv I.

| Číslo vzorku | NPN | IP | SOLP | NDIP | ADIP |
|--------------|-------|-------|-------|------|-------|
| 1 | 65,5 | 139,3 | 154,0 | 12,6 | 17,8 |
| 2 | 109,1 | 155,3 | 231,0 | 11,8 | 18,0 |
| 3 | 69,2 | 98,7 | 81,2 | 25,4 | 65,7 |
| 4 | 22,7 | 45,5 | 24,0 | 5,1 | 13,8 |
| 5 | 114,6 | 64,8 | 127,9 | 19,3 | 23,3 |
| 6 | 68,1 | 93,1 | 68,2 | 63,2 | 64,4 |
| 7 | 114,7 | 72,2 | 115,7 | 24,6 | 36,0 |
| 8 | 18,0 | 83,9 | 31,2 | 5,1 | 38,3 |
| 9 | 19,2 | 106,5 | 37,6 | 7,3 | 18,9 |
| 10 | 60,8 | 216,5 | 98,0 | 35,1 | 48,5 |
| 11 | 76,2 | 160,6 | 152,6 | 20,8 | 25,1 |
| 12 | 58,6 | 188,7 | 130,4 | 22,2 | 78,1 |
| 13 | 44,6 | 447,1 | 84,2 | 33,4 | 257,7 |
| 14 | 70,5 | 160,9 | 76,6 | 12,3 | 76,1 |
| 15 | 39,0 | 87,1 | 44,9 | 12,7 | 42,6 |

ADIP, protein nerozpustný v kyselém detergentu; IP, nerozpustný protein; NDIP, protein nerozpustný v neutrálním detergentu; NL; dusíkaté látky; NPN, neproteinový dusík; SOLP, rozpustný protein.

1, lupina bílá Amiga; 2, lupina bílá Prima; 3, jetelová siláž; 4, kukuřičná siláž; 5, jílková siláž; 6, travní siláž o vyšší sušině; 7, vojtěšková siláž; 8, ječný šrot; 9, pšeničný šrot; 10, řepkové výlisky; 11, řepka (pokrutina extrudovaná); 12, řepka (pokrutina bez extrudace); 13, sójový extrahovaný šrot; 14, pastevní porost 1. seč; 15, pastevní porost 2. seč.

Frakce NL (g/kg NL) sledovaného souboru krmiv jsou uvedeny v tabulce 11. Frakce A představuje v bachoru velmi rychle degradovatelnou část dusíkatých látek a hodnoty této frakce se u souboru I pohybovaly od 83,9 do 612,1 g/kg NL.

Tabulka 11. Frakce NL (g/kg NL) sledovaného souboru krmiv I.

| Číslo vzorku | A | B1 | B2 | B3 | C |
|-----------------|----------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|
| | g/kg NL | | | | |
| 1 | 223,3 ^{b,c} | 301,8 ^b | 414,0 ^d | 21,8 ^{h,i,j} | 39,1 ^g |
| 2 | 282,5 ^a | 315,5 ^a | 355,4 ^c | 16,0 ^{i,j} | 30,6 ^g |
| 3 | 384,9 ^{b,c} | 66,5 ^d | 183,2 ^{g,h,i} | 224,4 ^d | 141,0 ^c |
| 4 | 327,3 ^e | 17,6 ^d | 456,2 ^{h,i} | 125,2 ^{g,h} | 73,8 ^h |
| 5 | 594,7 ^a | 68,9 ^d | 215,4 ^{f,g,h} | 20,8 ^{i,j} | 100,2 ^f |
| 6 | 422,0 ^{b,c} | 1,0 ^d | 177,9 ⁱ | 7,0 ^j | 391,6 ^a |
| 7 | 612,1 ^a | 3,6 ^d | 192,6 ^{f,g,h,i} | 60,4 ^{f,g} | 131,2 ^{c,d} |
| 8 | 156,3 ^e | 115,0 ^d | 396,3 ^f | 287,8 ^e | 44,6 ^h |
| 9 | 133,4 ^e | 127,7 ^{c,d} | 607,5 ^e | 80,9 ^{f,g} | 50,5 ^h |
| 10 | 193,3 ^c | 118,3 ^c | 534,3 ^b | 42,5 ^f | 111,6 ^b |
| 11 | 243,3 ^b | 244,0 ^b | 432,3 ^c | 13,8 ^{i,j} | 66,4 ^{e,f} |
| 12 | 183,7 ^c | 224,9 ^b | 346,8 ^d | 174,9 ^c | 69,7 ^{d,e} |
| 13 | 83,9 ^d | 74,5 ^c | 356,4 ^a | 422,2 ^a | 62,9 ^b |
| 14 | 296,9 ^{b,c} | 25,7 ^d | 356,9 ^e | 268,6 ^b | 51,9 ^g |
| 15 | 295,6 ^d | 44,3 ^d | 337,1 ^{f,g} | 226,8 ^e | 96,2 ^g |

A, neproteinový dusík; B1, rychle rozložitelný protein; B2, středně rozložitelný protein; B3, pomalu rozložitelný protein; C, vázaný (nestravitelný) protein; NL, dusíkaté látky.

^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,j} různá písmenka uvádějí statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými krmivými ($P < 0,05$; Scheffe test).

1, lupina bílá Amiga; 2, lupina bílá Prima; 3, jetelová siláž; 4, kukuřičná siláž; 5, jílková siláž; 6, travní siláž o vyšší sušině; 7, vojtěšková siláž; 8, ječný šrot; 9, pšeničný šrot; 10, řepkové výlisky; 11, řepka (pokrutina extrudovaná); 12, řepka (pokrutina bez extrudace); 13, sójový extrahovaný šrot; 14, pastevní porost 1. seč; 15, pastevní porost 2. seč.

Nejnižší hodnoty této frakce A vykazoval sójový extrahovaný šrot (SEŠ). Tento nízký obsah frakce A u SEŠ může být dán tím, že sója obsahuje antinutriční látky spojené s inhibítorem tripsinu, který může blokovat stravitelnost bílkovin. Inhibitor tripsinu je antinutriční složka luštěnin, která inhibuje trávicí enzym a tím zhoršuje trávicí funkci v dolní části střeva

(Mahmood *et al.*, 2007). Proto je obsah frakce A (NPN) u SEŠ nižší (83,9 g/kg NL), zatímco obsah rychle rozložitelného proteinu (frakce B1, 74,5 g/kg NL), středně rozložitelného proteinu (frakce B2, 356,4 g/kg NL) a pomalu rozložitelného proteinu (frakce B3, 422,2g/kg NL) byl u SEŠ výrazně vyšší.

Průměr frakce A u lupin byl 252,9 g/kg NL. Tato hodnota byla podobná frakci A, kterou ve své publikaci u lupin popsal Cazzato *et al.* (2012). Alzueta *et al.* (2001) ve své práci potvrdil obdobné hodnoty frakce A (v rozmezí 211,0 až 329,0 g/kg NL) u vikve seté, jež patří mezi konvenční píceiny využívané ke krmení hospodářských zvířat (Swain *et al.*, 2016). Frakce A pro výsledky skupiny I této práce u obilných šrotů, řepkových krmiv, pastevní píce a siláží vykazovala průměrné hodnoty 144,9; 206,8; 296,3 a 468,2 g/kg NL, resp. Tyto výsledky jsou v souladu s některými autory (Choi *et al.*, 2002; Chrenková *et al.*, 2014; Polat *et al.*, 2014). Frakce A vykazovala silnou korelaci ($P < 0,001$) pouze s hodnotami SOLP ($r = 0,758$). Frakce B1 reprezentuje část SOLP, který se stanovuje pomocí boráto-fosfátového pufru a roztoku azidu sodného. Lupiny vykazovaly hodnoty frakce B1 (průměr 308,7 g/kg NL) a B2 (průměr 384,7 g/kg NL) odpovídající hodnotám publikovaným Cazzato *et al.* (2012) (B1 214,0 g/kg NL, B2 346,0 g/kg NL). Tento kolektiv autorů uvedl, že hodnoty frakcí NL lupin stanových dle CNCPS v databázi krmiv stále chybí. Proto stanovení kvality NL formou frakcí NL je důležitým faktorem pro stanovení nutriční hodnoty a degradovatelnosti krmiv. Také tato studie potvrzuje u lupin velmi rychlou bachorovou degradovatelnost NL (Cazzato *et al.*, 2012).

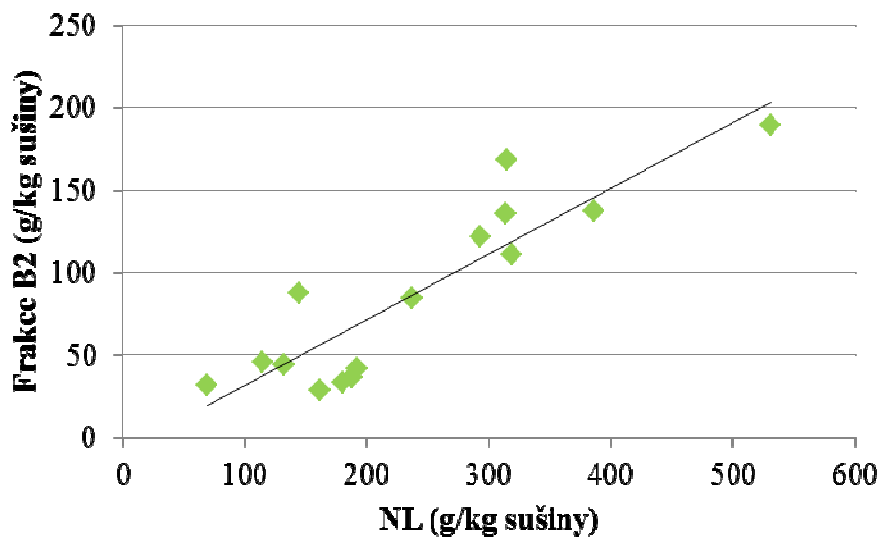
Výsledky frakce B1 u řepkových krmiv (průměr 195,7 g/kg NL) a SEŠ (74,5 g/kg NL) byly ve shodě s výsledky frakce B1 u řepky (349,0 g/kg NL), řepkového šrotu (171,0 g/kg NL) a sójového šrotu (88,0 g/kg NL) publikované v práci Chrenková *et al.* (2014). Studie autorů Mikolayunas-Sandroch *et al.* (2009) publikuje výsledky frakcí NL sójové moučky frakce B1 (90,3 g/kg NL) a frakce B2 (708,8 g/kg NL). Oproti tomu námi sledovaný soubor krmiv I vykazuje odlišné hodnoty frakce B1 (74,5 g/kg NL) a zejména hodnoty frakce B2 (356,4 g/kg NL). Tento rozdíl může být ovlivněn způsobem zpracování krmiv, což deklaruje řada studií Hvelplund *et Weisbjerg* (2000); Givens *et Rulquin* (2004) a další. Frakce B2 se pohybovala od 177,9 do 607,5 g/kg NL. Nejvyšší hodnota frakce B2 byla zjištěna u koncentrovaných krmiv (průměr 445,6 g/kg NL) a lupin (průměr 384,7 g/kg NL). Tyto vysoké hodnoty korespondují s hodnotami sóji (567,0 g/kg NL) publikovanými autory Bertipaglia *et al.* (2008). Autoři Alzueta *et al.* (2001) publikují výsledky frakce B2 (337,0 g/kg NL) u vikve

(bobovité) a Cazzato *et al.* (2012) uvádí výsledky frakce B2 lupin (346,0 g/kg NL); výsledky obou publikací korespondují s výsledky této práce.

Pro tyto frakce B1 a B2 je zřejmý rozdíl korelačních závislostí (Tabulka 12). U frakce B1 byla potvrzena ($P < 0,01$) nižší korelace s NL ($r = 0,665$), tukem ($r = 0,700$) a BE ($r = 0,653$). U frakce B2 byla potvrzena ($P < 0,0001$) velmi silná korelace s NL ($r = 0,891$) (Graf 1). Nižší korelace na hladině $P < 0,01$ byla potvrzena mezi frakcí B2 a B1 ($r = 0,682$). Korelace ($P < 0,05$) mezi frakcí B2 a tukem byla 0,596 a mezi frakcí B2 a BE byla 0,621.

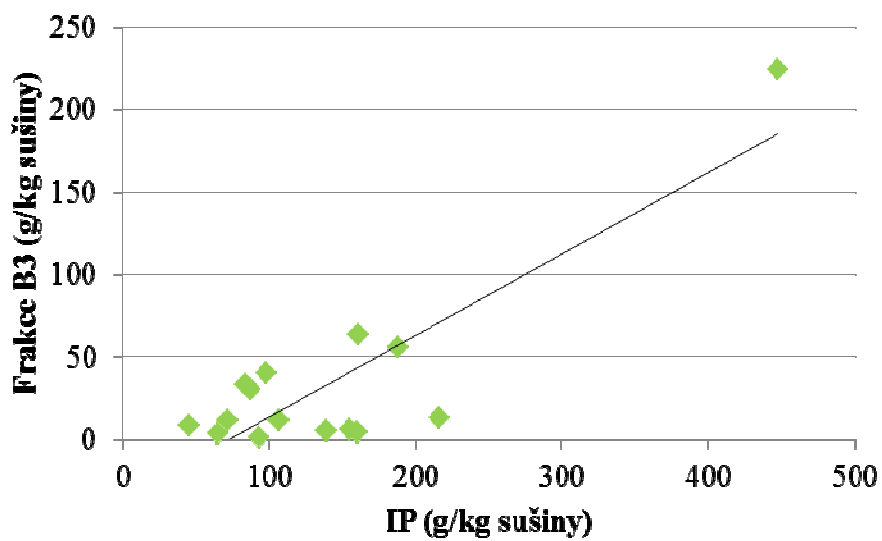
Frakce B3 (Tabulka 11) se pohybovala od 7,0 do 422,2 g/kg NL. Průměrná hodnota pro obilné šrotky byla 184,4 g/kg NL, pro řepková krmiva 77,1 g/kg NL, pro pastevní porost 247,7 g/kg NL a 87,6 g/kg NL pro siláže. Nejvyšší hodnota frakce B3 (422,2 g/kg NL) byla zjištěna u SEŠ. Podle Cazzato *et al.* (2012) jsou NL lupiny převážně degradovány v bachoru přežvýkavců. Výsledky lupin této práce (hodnoty frakcí B1 308,7 g/kg NL, B2 384,7 g/kg NL a B3 18,9 g/kg NL) mají obdobný trend jako výsledky publikované autory Cazzato *et al.* (2012) (B1 214,0 g/kg NL, B2 346,0 g/kg NL a B3 175,0 g/kg NL). Rozdíl mezi výsledky frakce B3 této práce a studií Cazzato *et al.* (2012) může být dán rozdílem v obsahu NDF (průměr 523,1 versus 215,0 g/kg sušiny) a ADF (průměr 278,9 versus 121,0 g/kg sušiny). Velmi silná korelace ($P < 0,0001$) byla potvrzena mezi frakcí B3 a IP ($r = 0,859$) (Graf 2) a mezi frakcí B3 a NDIP ($r = 0,969$). Pro frakci B3 a CP ($r = 0,924$) byla potvrzena korelace na hladině ($P < 0,01$). Frakce C u obilných šrotů sledovaných v této práci byla 44,6 g/kg NL (ječný šrot) a 50,5 g/kg NL (pšeničný šrot). Tyto hodnoty frakce C víceméně korespondují s hodnotami autorů Choi *et al.* (2002) (14,0 g/kg NL pro ječmen), Gupta *et al.* (2011) (26,0 g/kg NL pro ječmen) a Polat *et al.* (2014) (19,0 g/kg NL pro pšenici a 31,0 g/kg NL pro ječmen). Vyšší hodnoty frakce C (v průměru 167,6 g/kg NL) byly v této práci potvrzeny pro siláže (Tabulka 11). Korelace na hladině $P < 0,05$ byla nalezena mezi frakcí C a ADL ($r = 0,537$). Významné rozdíly na hladině statistické významnosti $P < 0,05$ byly pro jednotlivé frakce NL (A, B1, B2, B3 a C) potvrzeny signifikantní rozdíly mezi sledovanými krmivy (Tabulka 11).

Graf 1. Vliv obsahu NL na obsah frakce B2 u sledovaného souboru krmiv I.



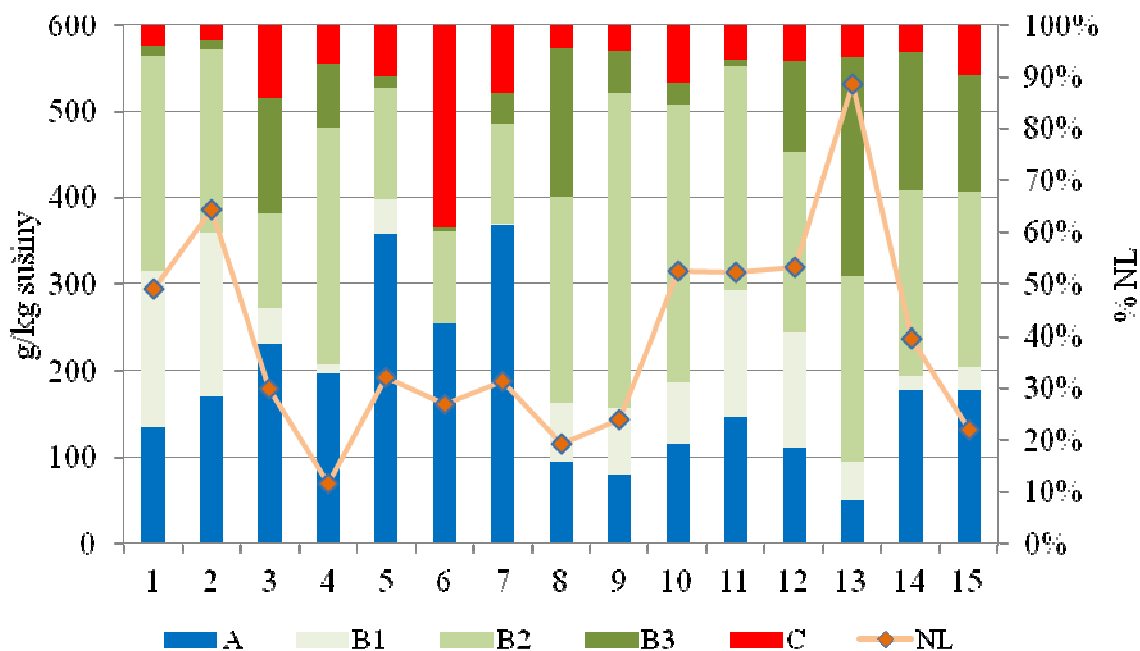
NL, dusíkaté látky.

Graf 2. Vliv obsahu IP na obsah frakce B3 u sledovaného souboru krmiv I.



IP, nerozputný protein.

Graf 3. Obsah NL (g/kg sušiny) s vyjádřením podílu frakcí NL ve 100% NL sledovaného souboru krmiv I.



A, neproteinový dusík; B1, rychle rozložitelný protein; B2, středně rozložitelný protein; B3, pomalu rozložitelný protein; C, vázaný (nestravitelný) protein; NL, dusíkaté látky.

1, lupina bílá Amiga; 2, lupina bílá Prima; 3, jetelová siláž; 4, kukuřičná siláž; 5, jílková siláž; 6, travní siláž o vyšší sušině; 7, vojtěšková siláž; 8, ječný šrot; 9, pšeničný šrot; 10, řepkové výlisky; 11, řepka (pokrutina extrudovaná); 12, řepka (pokrutina bez extrudace); 13, sójový extrahovaný šrot; 14, pastevní porost 1. seč; 15, pastevní porost 2. seč.

5.1.3. Korelační závislosti proměnných

V tabulce 12 jsou uvedeny korelační koeficienty skupiny I, které vyjadřují korelační závislost mezi chemickými rozbory základních živin a energií (NL, tuk, CF, NDF, ADF, ADL, BNLV, popel, OH, BE), chemickým složením NL (NPN, SOLP, IP, ADIP, NDIP) a frakcemi NL (A, B1, B2, B3, C).

Jak vyplývá z tabulky 12, nejsilnější pozitivní korelační závislost ($P < 0,0001$) byla potvrzena pro NDIP a frakci B3 ($r = 0,969$). Tato závislost je dána tím, že frakce B3 se počítá pomocí NDIP a potvrzuje důležitost této analýzy. Mezi další dvojice se silnými korelačními koeficienty ($P < 0,0001$) patří NL a frakce B2 ($r = 0,891$), NL a IP ($r = 0,890$), NDIP a IP ($r = 0,870$), frakce B3 a IP ($r = 0,859$), frakce B1 a SOLP ($r = 0,839$) a frakce B2 a IP ($r = 0,836$).

Silná korelační závislost ($P < 0,001$) byla potvrzena mezi kombinacemi SOLP a frakcí A ($r = 0,759$). Tuto kombinaci lze vyjádřit jako pozitivní korelaci mezi frakcí A a SOLP, ale stejně tak i jako pozitivní korelaci mezi NPN a SOLP, protože NPN představuje frakci A.

Korelační závislost ($P < 0,01$) byla potvrzena mezi frakcí B1 a tukem ($r = 0,700$), frakcí B1 a frakcí B2 ($r = 0,682$), NDF a ADF ($r = 0,669$), frakcí B1 a NL ($r = 0,665$), frakcí B2 a CF ($r = 0,656$), SOLP a BE ($r = 0,656$), frakcí B1 a BE ($r = 0,653$), NDIP a NL ($r = 0,642$), IP a CF ($r = -0,641$), NL a BE ($r = 0,634$), frakcí B3 a NL ($r = 0,624$), CF a NDF ($r = 0,621$) a mezi frakcí B2 a BE ($r = 0,621$).

Korelační závislost stanovená na nejnižší hladině závislosti $P < 0,05$ byla potvrzena mezi SOLP a NL ($r = 0,612$), frakcí B2 a tukem ($r = 0,595$), ADL a BE ($r = 0,572$), BNLV a OH ($r = 0,564$), BNLV a popelem ($r = -0,564$), BE a OH ($r = 0,559$), BE a popelem ($r = -0,559$), NL a CF ($r = -0,545$), ADL a ADIP ($r = 0,537$), ADL a frakcí C ($r = 0,537$), BNLV a SOLP ($r = -0,529$) a BNLV a tukem ($r = -0,517$). Dále byl potvrzen signifikantní vliv obsahu ADL na frakci C, která je navázána na ADF a je nestravitelná. Stejné hodnoty korelace u ADIP a frakce C s ADL je dána skutečností, že frakce ADIP představuje frakci C.

Nejčastěji a nejsilněji korelovaly jednotlivé živiny, frakce NL a jejich jednotlivé chemické složení s obsahem NL, což se ve výsledcích disertační práce očekávalo. Statistická závislost sledovaných proměnných byla také často potvrzena s CF a BE a samozřejmě i s jednotlivými frakcemi NL.

Tabulka 12. Korelační koeficienty vybraných proměnných sledovaného souboru krmiv I ($n = 15$).

| | NL | Tuk | CF | NDF | ADF | ADL | BNLV | Popel | OH | BE | NPN | IP | SOLP | ADIP | NDIP | A | B1 | B2 | B3 |
|-------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|-------|-------|
| Tuk | 0,349 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CF | -0,545 | -0,290 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NDF | -0,285 | -0,487 | 0,621 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ADF | -0,240 | -0,222 | 0,446 | 0,669 | | | | | | | | | | | | | | | |
| ADL | 0,013 | 0,181 | 0,384 | 0,263 | 0,421 | | | | | | | | | | | | | | |
| BNLV | -0,491 | -0,517 | -0,248 | 0,144 | 0,139 | -0,168 | | | | | | | | | | | | | |
| Popel | -0,208 | 0,173 | 0,322 | -0,309 | -0,327 | -0,317 | -0,564 | | | | | | | | | | | | |
| OH | 0,208 | -0,174 | -0,322 | 0,309 | 0,327 | 0,317 | 0,564 | -1,000 | | | | | | | | | | | |
| BE | 0,634 | 0,469 | -0,303 | 0,021 | 0,139 | 0,572 | -0,220 | -0,559 | 0,559 | | | | | | | | | | |
| NPN | 0,283 | -0,045 | 0,334 | 0,292 | 0,157 | 0,442 | -0,441 | 0,020 | -0,020 | 0,373 | | | | | | | | | |
| IP | 0,890 | 0,175 | -0,641 | -0,389 | -0,332 | -0,189 | -0,306 | -0,156 | 0,156 | 0,411 | -0,085 | | | | | | | | |
| SOLP | 0,612 | 0,450 | -0,063 | 0,061 | 0,059 | 0,356 | -0,529 | -0,178 | 0,178 | 0,655 | 0,758 | 0,185 | | | | | | | |
| ADIP | 0,243 | -0,124 | 0,017 | -0,113 | 0,253 | 0,537 | -0,142 | -0,057 | 0,057 | 0,215 | 0,257 | 0,275 | 0,046 | | | | | | |
| NDIP | 0,642 | -0,252 | -0,449 | -0,259 | -0,215 | -0,232 | -0,092 | -0,136 | 0,136 | 0,107 | -0,151 | 0,870 | -0,124 | 0,385 | | | | | |
| A | 0,283 | -0,045 | 0,334 | 0,292 | 0,157 | 0,442 | -0,441 | 0,020 | -0,020 | 0,373 | 1,000 | -0,085 | 0,758 | 0,257 | -0,151 | | | | |
| B1 | 0,665 | 0,700 | -0,372 | -0,155 | -0,045 | 0,155 | -0,410 | -0,279 | 0,279 | 0,653 | 0,281 | 0,344 | 0,839 | -0,147 | -0,056 | 0,281 | | | |
| B2 | 0,891 | 0,595 | -0,656 | -0,413 | -0,360 | -0,083 | -0,449 | -0,129 | 0,129 | 0,621 | 0,014 | 0,836 | 0,471 | 0,068 | 0,457 | 0,014 | 0,682 | | |
| B3 | 0,624 | -0,237 | -0,486 | -0,247 | -0,298 | -0,393 | -0,060 | -0,131 | 0,131 | 0,057 | -0,231 | 0,859 | -0,145 | 0,145 | 0,969 | -0,231 | -0,021 | 0,471 | |
| C | 0,243 | -0,124 | 0,017 | -0,113 | 0,253 | 0,537 | -0,142 | -0,057 | 0,057 | 0,215 | 0,257 | 0,275 | 0,046 | 1,000 | 0,385 | 0,257 | -0,147 | 0,068 | 0,145 |

A, neproteinový dusík; ADF, acido detergentní vláknina; ADIP, protein nerozpustný v kyselém detergentu; ADL, acido detergentní lignin; B1, rychle rozložitelný protein; B2, středně rozložitelný protein; B3, pomalu rozložitelný protein; BE, brutto energie; BNLV, bezdusíkaté látky výtahové; C, vázaný (nestravitelný) protein; CF, hrubá vláknina; IP, nerozpustný protein; NDF, neutrálně detergentní vláknina; NDIP, protein nerozpustný v neutrálním detergentu; NL, dusíkaté látky; NPN, neproteinový dusík; OH, organická hmota; SOLP, rozpustný protein.

„**Tučně**“ zvýrazněné korelační koeficienty byly stanoveny na hladině statistické významnosti $P < 0,05$.

5.2. Výsledky rozborů sledovaných vzorků krmiv u souboru II

5.2.1. Základní živinové složení a energie

Chemické složení hybridů tzv. Festulolium (hybridy kostřav a jílků) je uvedeno v tabulce 13. Obsah NL se pohyboval pro skupinu II od 111,9 do 163,9 g/kg sušiny; pro hybridy kostřav konkrétně v průměru 141,1 g/kg sušiny a pro hybridy jílků 140,2 g/kg sušiny. Vzhledem k metodicky jednotné sklizni porostu zde nejsou patrné žádné vyšší výkyvy NL, jako tomu bylo u pastervní píče ve skupině I, a obsah NL odpovídá standardním hodnotám hybridů kostřav a jílků. U tohoto souboru krmiv II byla rovněž další sledovanou živinou hrubá vláknina, která v ČR stále patří mezi stanovované živinové údaje. Hodnota hrubé vlákniny byla v průměru 267,5 g/kg sušiny pro hybridy kostřav a 243,1 g/kg sušiny pro hybridy jílků. Hodnoty jednotlivých frakcí vlákniny obou hybridů si byly podobné. U kostřavovitých hybridů byly hodnoty ADF, NDF a ADL 546,2; 324,9 a 31,1 g/kg sušiny, resp. a pro jílkové hybridy 515,7; 314,8 a 49,1 g/kg sušiny, resp. Obsah vlákniny, zejména ligninu a s ním spojený proces lignifikace představuje velmi důležitý parametr ovlivňující kvalitu píče (Wang *et al.*, 2017; Loučka *et al.*, 2018), což bylo u sledovaných hybridů kostřav a jílků statisticky potvrzeno ($P < 0,01$) pro NL versus CF ($r = -0,728$ a $r = -0,933$, resp.) a NDF ($r = -0,697$ a $r = -0,684$, resp.). Krmiva obsahující vlákninu se obvykle vyznačují vysokým obsahem lignocelulózy a nízkým obsahem bílkovin, horší chutností a nižší stravitelností živin (Elghandour *et al.*, 2016). Hodnoty dalších sledovaných živin e energie (tuk, popel a brutto energie) byly v průměru pro hybridy kostřav 26,8 a 76,1 g/kg sušiny a 18,1 MJ/kg sušiny, resp. a průměrné hodnoty pro hybridy jílků byly 28,9 a 72,8 g/kg sušiny a 18,3 MJ/kg sušiny, resp.

Tabulka 13. Živinné složení (g/kg sušiny) a energie (MJ/kg sušiny) sledovaného souboru krmiv II.

| Číslo vzorku | NL | Tuk | BNLV | Popel | OH | CF | ADF | NDF | ADL | BE |
|--------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| 16 | 151,6 | 32,6 | 495,2 | 80,0 | 920,0 | 240,6 | 329,0 | 559,5 | 27,2 | 18,1 |
| 17 | 144,4 | 29,0 | 500,0 | 69,7 | 930,3 | 257,0 | 330,0 | 577,2 | 25,0 | 18,3 |
| 18 | 127,4 | 25,7 | 498,1 | 74,8 | 925,2 | 274,0 | 365,3 | 603,3 | 33,2 | 18,0 |
| 19 | 144,4 | 25,2 | 480,7 | 80,3 | 919,7 | 269,4 | 388,9 | 598,0 | 39,0 | 18,1 |
| 20 | 113,5 | 18,8 | 505,8 | 71,6 | 928,4 | 290,4 | 381,8 | 611,3 | 39,7 | 18,1 |
| 21 | 140,3 | 23,5 | 479,8 | 73,4 | 926,6 | 283,1 | 399,1 | 601,7 | 43,3 | 18,2 |
| 22 | 134,3 | 26,6 | 489,3 | 80,7 | 919,3 | 269,2 | 328,4 | 597,1 | 32,1 | 18,1 |
| 23 | 138,8 | 26,6 | 489,9 | 73,7 | 926,3 | 271,0 | 319,9 | 583,1 | 28,9 | 18,3 |
| 24 | 156,2 | 29,8 | 475,1 | 80,5 | 919,5 | 258,5 | 312,1 | 576,8 | 29,9 | 18,1 |
| 25 | 140,1 | 26,1 | 491,8 | 73,9 | 926,1 | 268,1 | 335,5 | 577,0 | 29,0 | 18,2 |
| 26 | 149,3 | 28,9 | 480,7 | 74,7 | 925,3 | 266,5 | 330,6 | 588,3 | 26,8 | 18,2 |
| 27 | 141,2 | 29,4 | 489,6 | 78,3 | 921,8 | 261,6 | 340,3 | 577,9 | 29,3 | 18,1 |
| 28 | 142,2 | 26,1 | 485,1 | 73,5 | 926,5 | 273,1 | 362,7 | 591,5 | 44,1 | 18,1 |
| 29 | 152,4 | 26,5 | 478,3 | 80,9 | 919,1 | 262,0 | 371,2 | 587,9 | 41,1 | 18,2 |
| 30 | 141,7 | 32,4 | 509,9 | 79,5 | 920,5 | 236,6 | 319,1 | 532,5 | 32,9 | 18,1 |
| 31 | 158,0 | 36,6 | 498,1 | 88,8 | 911,2 | 218,4 | 314,0 | 537,2 | 37,2 | 18,0 |
| 32 | 135,5 | 26,6 | 524,5 | 69,6 | 930,5 | 243,7 | 318,1 | 541,0 | 38,8 | 18,3 |
| 33 | 150,3 | 28,7 | 516,5 | 63,7 | 936,3 | 240,8 | 370,0 | 532,0 | 61,5 | 18,6 |
| 34 | 111,9 | 24,3 | 534,7 | 65,5 | 934,5 | 263,5 | 358,3 | 564,1 | 83,4 | 18,2 |
| 35 | 163,9 | 31,7 | 515,9 | 69,3 | 930,7 | 219,3 | 299,8 | 526,1 | 79,9 | 18,5 |
| 36 | 129,5 | 30,0 | 517,0 | 78,1 | 922,0 | 245,5 | 352,0 | 565,8 | 87,5 | 18,2 |
| 37 | 120,1 | 23,0 | 523,2 | 63,4 | 936,6 | 270,3 | 370,1 | 587,7 | 49,7 | 18,4 |
| 38 | 153,2 | 31,4 | 514,8 | 74,5 | 925,5 | 226,1 | 328,3 | 543,7 | 36,8 | 18,3 |
| 39 | 123,6 | 24,2 | 520,2 | 66,0 | 934,0 | 266,1 | 350,0 | 556,5 | 36,3 | 18,3 |
| 40 | 141,9 | 27,9 | 515,7 | 70,1 | 929,9 | 244,4 | 336,7 | 547,6 | 57,2 | 18,2 |
| 41 | 126,0 | 26,2 | 522,0 | 69,6 | 930,4 | 256,3 | 354,8 | 560,0 | 50,3 | 18,2 |
| 42 | 123,5 | 28,1 | 510,2 | 78,6 | 921,4 | 259,7 | 342,6 | 589,3 | 58,0 | 18,0 |
| 43 | 151,4 | 31,7 | 498,4 | 77,7 | 922,3 | 240,9 | 336,0 | 554,6 | 41,3 | 18,3 |
| 44 | 155,4 | 27,5 | 513,3 | 74,0 | 926,0 | 229,8 | 336,6 | 549,1 | 53,8 | 18,4 |
| 45 | 156,7 | 33,0 | 505,6 | 76,6 | 923,4 | 228,1 | 315,7 | 562,8 | 37,4 | 18,2 |

ADF, acido detergentní vláknina; ADL, acido detergentní lignin; BE, brutto energie; BNLV, bezdusíkaté látky výtahové; CF, hrubá vláknina; NL, dusíkaté látky; OH, organická hmota.

16 – 29, kostřavovité hybridy; 30 – 45, jílkovité hybridy (charakteristika hybridů 16 – 45 je uvedena v Tabulce 8 v kapitole 4.1. Pokusný materiál).

5.2.2. Stanovení frakcí dusíkatých látek

Tabulka 14. Chemické složení NL (g/kg sušiny) sledovaného souboru krmiv II.

| Číslo vzorku | NPN | SOLP | g/kg sušiny | | |
|-----------------|------|------|-------------|------|------|
| | | | IP | NDIP | ADIP |
| 16 | 44,9 | 63,9 | 87,8 | 53,0 | 15,1 |
| 17 | 36,0 | 58,2 | 86,2 | 56,5 | 12,6 |
| 18 | 31,8 | 49,8 | 77,6 | 37,5 | 10,4 |
| 19 | 33,3 | 58,8 | 85,6 | 33,7 | 9,9 |
| 20 | 21,5 | 39,2 | 74,2 | 29,0 | 7,4 |
| 21 | 37,4 | 46,5 | 93,8 | 36,9 | 11,1 |
| 22 | 39,4 | 73,0 | 61,2 | 34,1 | 14,1 |
| 23 | 38,4 | 76,1 | 62,7 | 33,1 | 7,5 |
| 24 | 39,3 | 80,0 | 76,2 | 69,1 | 14,0 |
| 25 | 26,1 | 68,8 | 71,3 | 59,5 | 14,0 |
| 26 | 43,4 | 81,3 | 68,0 | 45,5 | 7,1 |
| 27 | 39,1 | 73,2 | 68,0 | 39,5 | 7,4 |
| 28 | 37,6 | 73,8 | 68,4 | 44,1 | 8,1 |
| 29 | 52,1 | 86,0 | 66,3 | 46,3 | 7,3 |
| 30 | 44,5 | 51,7 | 89,9 | 42,0 | 7,7 |
| 31 | 55,1 | 56,8 | 101,3 | 36,9 | 9,9 |
| 32 | 45,3 | 75,1 | 60,5 | 31,1 | 7,3 |
| 33 | 45,5 | 83,7 | 66,5 | 42,7 | 6,8 |
| 34 | 24,1 | 55,3 | 56,6 | 37,1 | 6,0 |
| 35 | 55,6 | 93,5 | 70,3 | 52,0 | 5,7 |
| 36 | 40,0 | 72,0 | 57,5 | 37,9 | 5,0 |
| 37 | 35,4 | 66,4 | 53,7 | 32,8 | 7,9 |
| 38 | 57,7 | 93,3 | 59,9 | 31,7 | 8,5 |
| 39 | 31,3 | 63,0 | 60,5 | 40,8 | 7,5 |
| 40 | 44,8 | 48,4 | 93,5 | 40,9 | 6,6 |
| 41 | 34,1 | 38,3 | 87,7 | 39,0 | 6,0 |
| 42 | 45,3 | 55,2 | 68,3 | 40,6 | 8,4 |
| 43 | 51,0 | 60,9 | 90,5 | 42,9 | 8,8 |
| 44 | 47,8 | 54,6 | 100,8 | 48,2 | 9,7 |
| 45 | 58,9 | 61,8 | 94,9 | 49,8 | 5,6 |

ADIP, protein nerozpustný v kyselém detergentu; IP, nerozpustný protein; NDIP, protein nerozpustný v neutrálním detergentu; NL, dusíkaté látky; NPN, neproteinový dusík; SOLP, rozpustný protein.

16 – 29, kostřavovité hybridy; 30 – 45, jílkovité hybridy (charakteristika hybridů 16 – 45 je uvedena v Tabulce 8 v kapitole 4.1. Pokusný materiál).

Tabulka 14 znázorňuje chemické složení NL sledovaného souboru II na základě hodnot NPN, SOLP, IP, NDIP a ADIP v g/kg sušiny. Tyto výsledky laboratorních analýz představují základní hodnoty pro následný výpočet jednotlivých frakcí NL.

Frakce NL sledovaného souboru krmiv II jsou uvedeny v tabulce 15. Výsledky frakcí NL u skupiny II byly pro oba soubory hybridů podobné. Průměrná hodnota frakce A byla 261,6 g/kg NL pro hybridy kostřav a 316,3 g/kg NL pro hybridy jílků. U obou souborů hybridů představuje frakce A největší podíl ze všech frakcí NL. Frakce A, která je součástí NL, je v trávicím traktu přežvýkavců velmi rychle dostupná a je rozpustná v pufru, ale zároveň není srážena v roztoku TCA (Lanzas *et al.*, 2008). Abbasi *et al.* (2012) uvádějí, že bachorové mikroorganismy využívají NPN, avšak v případě nadlimitního příjmu NL z krmné dávky vede k přeměně tohoto NPN na amoniak, který je následně v bachoru absorbován krví a transportován do jater, přeměněn na močovinu a částečně vylučován močí (Martin *et al.*, 2004). Se zralostí rostlin se snižoval obsah frakce A (Tabulka 15) pravděpodobně v důsledku zvýšeného navázání NL na buněčné stěny, což je vyjádřeno hodnotou NDIP (Tabulka 14).

Různě degradovatelné frakce B1, B2 a B3 byly pro hybridy kostřav v průměru 205,6; 222,3 a 236,05 g/kg NL, resp. a pro hybridy jílků 144,2; 249,9 a 236,8 g/kg sušiny, resp. Podobně jako Ehsani (2007) a Abbasi *et al.* (2012), byl v této práci potvrzen negativní, ale statisticky nevýznamný vztah mezi NDF a frakcí B1. U hybridů kostřav byl potvrzen trend poklesu frakce B2 s postupující zralostí ve vztahu k NDIP ($r = -0,709$; $P < 0,01$). Rozdíly mezi obsahem NDF se stoupajícím stářím rostlin mohou vysvětlit rozdíly v poměru frakcí B3 (Alzueta *et al.*, 2001; Abbasi *et al.*, 2012), což koresponduje s výsledky této práce, kdy byl nalezen významný statistický vztah mezi NDIP a frakcí B3 pro obě skupiny hybridů ($r = 0,954$; $P < 0,0001$). Malou část celkových NL představuje frakce C, která je nerozpustná, tudíž zvířeti nedostupná (Lanzas *et al.*, 2008). Průměrná hodnota frakce C pro hybridy kostřav byla 73,9 g/kg NL a pro hybridy jílků 52,8 g/kg NL. Dle některých autorů (Ehsani, 2007; Abbasi *et al.*, 2012) se frakce C v rostlině zvyšuje s její lignifikací, což bylo u ADL statisticky potvrzeno ($r = -0,584$; $P < 0,001$), avšak nebyl statisticky průkazný s obsahem NDIP (Tabulka 20).

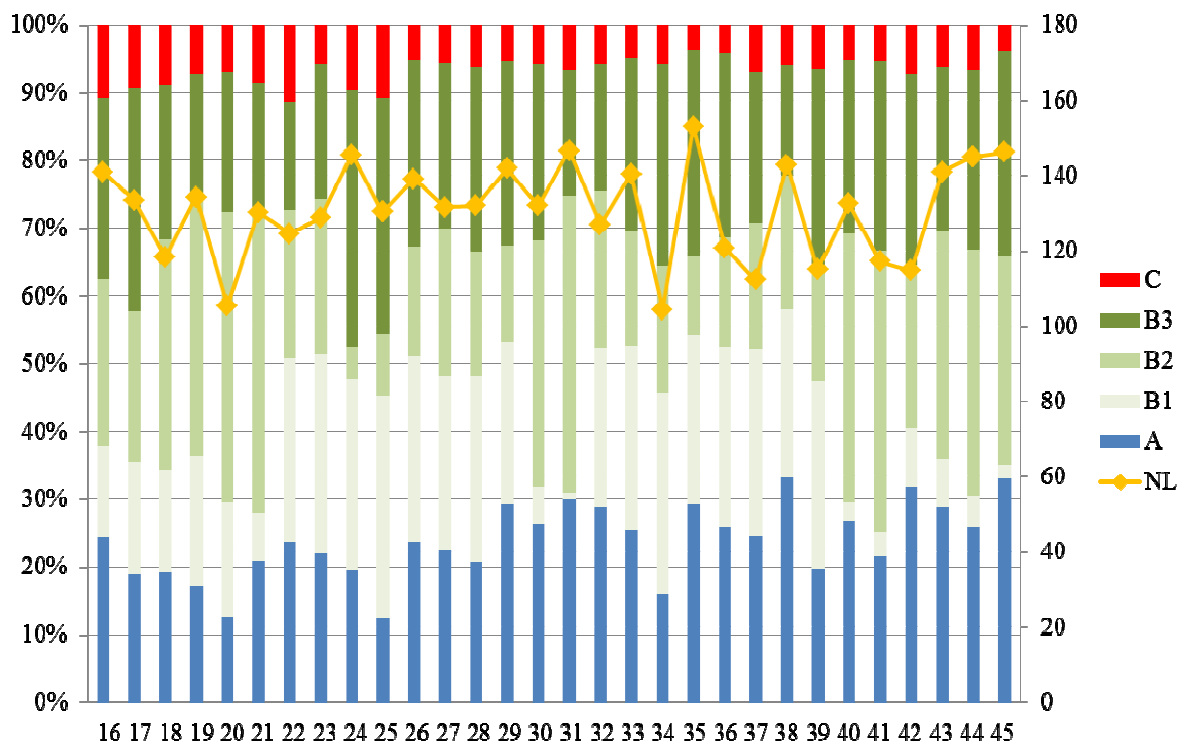
Tabulka 15. Frakce NL (g/kg NL) sledovaného souboru krmiv II.

| Číslo vzorku | A | B1 | B2 | B3 | C |
|-----------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | g/kg NL | | | | |
| 16 | 296,2 | 125,0 | 229,6 | 249,5 | 99,7 |
| 17 | 249,5 | 153,5 | 205,7 | 304,0 | 87,4 |
| 18 | 249,5 | 141,4 | 315,0 | 212,6 | 81,5 |
| 19 | 230,4 | 177,0 | 358,9 | 165,3 | 68,3 |
| 20 | 189,7 | 156,2 | 398,4 | 190,4 | 65,3 |
| 21 | 266,5 | 65,1 | 405,1 | 184,5 | 78,8 |
| 22 | 293,6 | 250,4 | 202,0 | 148,8 | 105,2 |
| 23 | 276,7 | 271,3 | 213,4 | 184,5 | 54,0 |
| 24 | 251,3 | 260,8 | 45,4 | 352,6 | 89,8 |
| 25 | 186,4 | 304,8 | 84,0 | 324,9 | 99,8 |
| 26 | 290,5 | 254,2 | 150,2 | 257,7 | 47,4 |
| 27 | 276,6 | 241,6 | 202,0 | 227,2 | 52,6 |
| 28 | 264,2 | 254,5 | 171,1 | 253,0 | 57,2 |
| 29 | 341,7 | 222,9 | 131,5 | 255,8 | 48,2 |
| 30 | 314,1 | 51,1 | 338,5 | 241,9 | 54,5 |
| 31 | 348,9 | 10,3 | 407,0 | 171,1 | 62,5 |
| 32 | 334,3 | 219,5 | 216,7 | 175,4 | 54,2 |
| 33 | 302,8 | 254,3 | 158,4 | 239,1 | 45,3 |
| 34 | 215,2 | 279,1 | 173,9 | 277,9 | 53,9 |
| 35 | 339,5 | 231,3 | 111,6 | 282,9 | 34,7 |
| 36 | 308,7 | 247,5 | 151,3 | 254,0 | 38,6 |
| 37 | 294,5 | 258,4 | 173,8 | 207,7 | 65,5 |
| 38 | 376,5 | 232,4 | 184,1 | 151,3 | 55,7 |
| 39 | 253,4 | 256,7 | 159,6 | 269,3 | 61,1 |
| 40 | 315,3 | 25,9 | 370,7 | 241,5 | 46,6 |
| 41 | 270,4 | 33,7 | 386,7 | 261,2 | 48,0 |
| 42 | 367,0 | 79,7 | 225,0 | 260,2 | 68,1 |
| 43 | 337,1 | 65,1 | 314,5 | 225,3 | 57,9 |
| 44 | 307,9 | 43,5 | 338,7 | 247,4 | 62,6 |
| 45 | 375,7 | 18,4 | 288,0 | 282,1 | 35,9 |

A, neproteinový dusík; B1, rychle rozložitelný protein; B2, středně rozložitelný protein; B3, pomalu rozložitelný protein; C, vázaný (nestravitelný) protein; NL, dusíkaté látky.

16 – 29, kostřavovité hybridy; 30 – 45, jílkovité hybridy (charakteristika hybridů 16 – 45 je uvedena v Tabulce 8 v kapitole 4.1. Pokusný materiál).

Graf 4. Obsah NL (g/kg sušiny) s vyjádřením podílu frakcí NL ve 100% NL sledovaného souboru krmiv II.



A, neproteinový dusík; B1, rychle rozložitelný protein; B2, středně rozložitelný protein; B3, pomalu rozložitelný protein; C, vázaný (nestravitelný) protein; NL, dusíkaté látky.

16 – 29, kostřavovité hybridy; 30 – 45, jílkovité hybridy (charakteristika hybridů 16 – 45 je uvedena v Tabulce 8 v kapitole 4.1. Pokusný materiál).

5.2.3. Predikce stravitelné organické hmoty a stravitelných dusíkatých látek na základě jednotlivých chemických analýz

V programu SAS (2003) byly pro predikci stravitelné organické hmoty (SOH) a stravitelných dusíkatých látek (SNL) (Tabulka 16) vyhodnoceny jednotlivé skupiny hybridů zvlášť, tzn. skupina kostřavovitých hybridů ($n = 14$) a jílkovitých hybridů ($n = 16$) a následně byly obě skupiny hybridů vyhodnoceny jako ucelený soubor ($n = 30$). Ucelená skupina obou hybridů poskytla lepší výsledky při vyhodnocování regresních rovnic, než oddělené soubory hybridů, což lze vysvětlit větším množstvím dat uceleného souboru hybridů *Festulolium*. Někteří autoři (Yamada *et al.*, 2005; Kopecký *et al.*, 2006; Kubota *et al.*, 2015) též popisují hybridy kostřav a jílků jako jednu (stejnou) skupinu vzhledem k jejich podobnému nutričnímu složení.

Tabulka 16. SOH a SNL (g/kg sušiny) sledovaného souboru krmiv II.

| Číslo vzorku | SOH | SNL |
|--------------|-------|-------|
| 16 | 792,4 | 90,7 |
| 17 | 800,8 | 87,9 |
| 18 | 800,7 | 65,1 |
| 19 | 792,5 | 79,3 |
| 20 | 768,0 | 55,0 |
| 21 | 778,3 | 76,0 |
| 22 | 800,9 | 73,7 |
| 23 | 788,0 | 77,5 |
| 24 | 812,0 | 91,2 |
| 25 | 806,9 | 77,0 |
| 26 | 809,8 | 83,8 |
| 27 | 804,9 | 76,9 |
| 28 | 804,9 | 78,6 |
| 29 | 810,2 | 85,1 |
| 30 | 826,8 | 76,3 |
| 31 | 830,1 | 92,8 |
| 32 | 824,7 | 76,0 |
| 33 | 817,8 | 88,0 |
| 34 | 805,5 | 50,8 |
| 35 | 831,8 | 100,6 |
| 36 | 805,8 | 66,7 |
| 37 | 800,9 | 55,6 |
| 38 | 819,0 | 88,3 |
| 39 | 791,7 | 60,6 |
| 40 | 820,5 | 76,3 |
| 41 | 811,2 | 62,9 |
| 42 | 809,5 | 58,3 |
| 43 | 809,4 | 85,9 |
| 44 | 832,6 | 89,4 |
| 45 | 832,4 | 89,9 |

SNL, stravitelné dusíkaté látky; SOH, stravitelná organická hmota.

Nejlepší kombinace pro predikci SOH jsou uvedeny v tabulce 17. Dle očekávání byly při použití jednoduchého lineárního modelu pro predikci SOH nejlepšími prediktory CF a NDF ($P > 0,0001$). U mnohonásobné regresní rovnice nejlépe vyhovovala kombinace NL s NDF a tuk s NDF. Jediné frakce, které bylo možné v práci využít pro predikci SOH, byla frakce A a B1 za současného využití hodnot SOLP ($P > 0,0001$).

Tabulka 17. Regresní rovnice pro zjištění SOH (y) (g/kg sušiny) na základě chemického složení a frakcí NL (g/kg sušiny) sledovaného souboru krmiv II.

| Rovnice | R^2 | RMSE | P |
|---|-------|-------|---------|
| Jednoduché lineární regresní rovnice | | | |
| $y = 760,151 + 1,161 A$ | 0,500 | 11,32 | >0,0001 |
| $y = 1092,576 - 0,537 NDF$ | 0,536 | 10,90 | >0,0001 |
| $y = 985,740 - 0,699 CF$ | 0,703 | 8,72 | >0,0001 |
| Vícenásobné regresní rovnice | | | |
| $y = 761,341 - 1,183 B1 + 1,151 SOLP$ | 0,500 | 11,52 | >0,0001 |
| $y = 712,238 + 3,021 tuk + 0,280 ADL$ | 0,538 | 11,08 | >0,0001 |
| $y = 997,388 + 0,329 NL - 0,445 NDF$ | 0,602 | 10,28 | >0,0001 |
| $y = 960,892 + 1,537 tuk - 0,370 NDF$ | 0,609 | 10,19 | >0,0001 |

A, neproteinový dusík; ADL, acido detergentní vláknina; B1, rychle rozložitelný protein; CF, hrubá vláknina; NDF, neutrálně detergentní vláknina; NL, dusíkaté látky; SOH, stravitelná organická hmota; SOLP, rozpustný protein.

P, pravděpodobnost; R^2 , determinační koeficient; RMSE, středně kvadratická chyba.

Predikce SNL byla publikována v řadě publikací (Villamide *et Fraga*, 1998; Valiente *et al.*, 2004). Dle očekávání byl úzký vztah mezi SNL a NL a jejich jednotlivými frakcemi ($P > 0,0001$) (Tabulka 18). SNL závisí na typu krmiva a je spojeno s obsahem NL, aminokyselin a obsahem škrobu (Xia *et al.*, 2012). Nejlepší jednoduchá lineární rovnice pro predikci SNL byla nalezena s NL. Vzhledem k poměrně snadnému a přesnému stanovení hodnoty NL je tato jednoduchá lineární rovnice vyhodnocena jako velmi vhodná pro přesný výpočet SNL. Další statisticky velmi významnou hodnotou ($P > 0,0001$) pro stanovení predikčních rovnic SNL vyšla frakce A, avšak R^2 byla pouze 0,513. Dále byly hledány rovnice v mnohonásobné kombinaci živin a jednotlivých frakcí NL. Nejlepší mnohonásobná regresní rovnice pro SNL v kombinaci živin byla nalezena mezi BNLV a NDF ($R^2 = 0,773$; $P < 0,0001$) a dále mezi BNLV a CF ($R^2 = 0,842$; $P < 0,0001$). I další živiny, hodnoty chemických analýz a frakcí NL poskytovaly vhodné kombinace (Tabulka 18). Kombinace CF a SOLP ($R^2 = 0,511$; $P < 0,0001$), CF a frakce C ($R^2 = 0,530$; $P < 0,0001$), CF a ADL ($R^2 = 0,552$; $P < 0,0001$), CF a NDIP ($R^2 = 0,554$; $P < 0,0001$), frakce A a B3 ($R^2 = 0,641$; $P < 0,0001$) a IP a SOLP ($R^2 = 0,969$; $P < 0,0001$). Statisticky velmi významně vyšly mnohonásobné kombinace jednotlivých frakcí NL. Nejlepší predikční rovnice pro SNL ($R^2 = 0,975$;

$P < 0,0001$) vyšla z kombinací všech frakcí, tj, A, B1, B2, B3 a C. Toto statisticky doložené tvrzení též potvrzuje $R^2 = 0,917$ ($P < 0,0001$) u kombinace o menším počtu frakcí (A, B1, B2 a C), ovšem za předpokladu, že pro výpočet frakce B2 je zapotřebí znát i hodnotu frakce B3.

Tabulka 18. Regresní rovnice pro zjištění SNL (y) (g/kg sušiny) na základě chemického složení a frakcí NL (g/kg sušiny) sledovaného souboru krmiv II.

| Rovnice | R^2 | RMSE | P |
|---|-------|-------|---------|
| Jednoduché lineární regresní rovnice | | | |
| $y = 37,562 + 0,961 A$ | 0,513 | 9,134 | >0,0001 |
| $y = -52,652 + 0,923 NL$ | 0,969 | 2,308 | >0,0001 |
| Vícenásobné regresní rovnice | | | |
| $y = 147,944 - 0,360 CF + 0,316 SOLP$ | 0,511 | 9,313 | >0,0001 |
| $y = 181,918 - 0,472 CF + 1,757 C$ | 0,530 | 9,140 | >0,0001 |
| $y = 216,909 - 0,494 CF - 0,342 ADL$ | 0,552 | 8,919 | >0,0001 |
| $y = 145,645 - 0,365 CF + 0,582 NDIP$ | 0,554 | 8,896 | >0,0001 |
| $y = 22,869 + 0,862 A + 0,564 B3$ | 0,641 | 7,988 | >0,0001 |
| $y = 732,738 - 0,559 NDF - 0,714 BNLV$ | 0,773 | 6,355 | >0,0001 |
| $y = 518,413 - 0,605 CF - 0,572 BNLV$ | 0,842 | 5,302 | >0,0001 |
| $y = -51,441 + 0,817 A + 1,067 B1 + 1,042 B2 + 1,040 C$ | 0,917 | 3,994 | >0,0001 |
| $y = -52,473 + 0,913 IP + 0,932 SOLP$ | 0,969 | 2,337 | >0,0001 |
| $y = -56,631 + 0,895 A + 0,992 B1 + 0,960 B2 + 0,927 B3$ $+ 1,170 C$ | 0,975 | 2,236 | >0,0001 |

A, neproteinový dusík; ADL, acido detergentní vláknina; B1, rychle rozložitelný protein; B2, středně rozložitelný protein; B3, pomalu rozložitelný protein; BNLV, bezdusíkaté látky výtažkové; C, vázaný (nestravitelný) protein; CF, hrubá vláknina; IP, nerozpustný protein; NDF, neutrálně detergentní vláknina; NDIP, protein nerozpustný v neutrálním detergentu; NL, dusíkaté látky; SNL, stravitelné dusíkaté látky; SOLP, rozpustný protein.

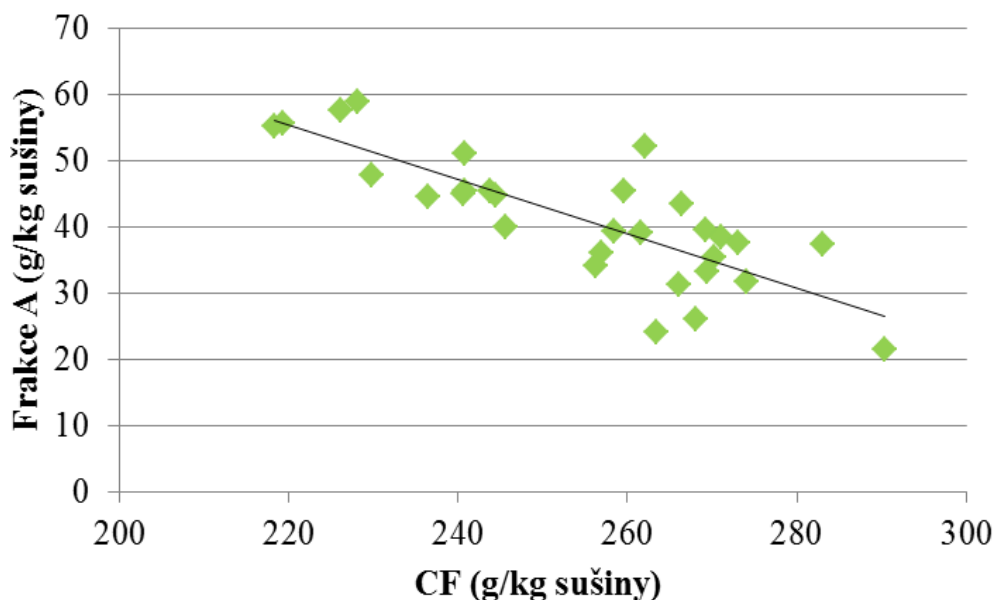
P, pravděpodobnost; R^2 , determinační koeficient; RMSE, středně kvadratická chyba.

5.2.4. Korelační závislosti proměnných

V tabulce 19 jsou uvedeny korelační koeficienty skupiny II. Korelace vyjadřují závislost mezi chemickými rozbory základních živin a energií (NL, tuk, CF, NDF, ADF, ADL, BNLV, popel, OH, GE), chemickým složením NL (NPN, SOLP, IP, ADIP, NDIP) a frakcemi NL (A, B1, B2, B3, C). Korelační závislosti mezi vybranými proměnnými byly hledány pro celý soubor krmiv II ($n = 30$). Oproti souboru I, ve kterém byly hodnoceny vzorky různých krmiv (soubor objemných a jaderných krmiv), bylo u souboru II (soubor objemných krmiv) nalezeno více silnějších korelačních závislostí na hladině významnosti $P < 0,0001$.

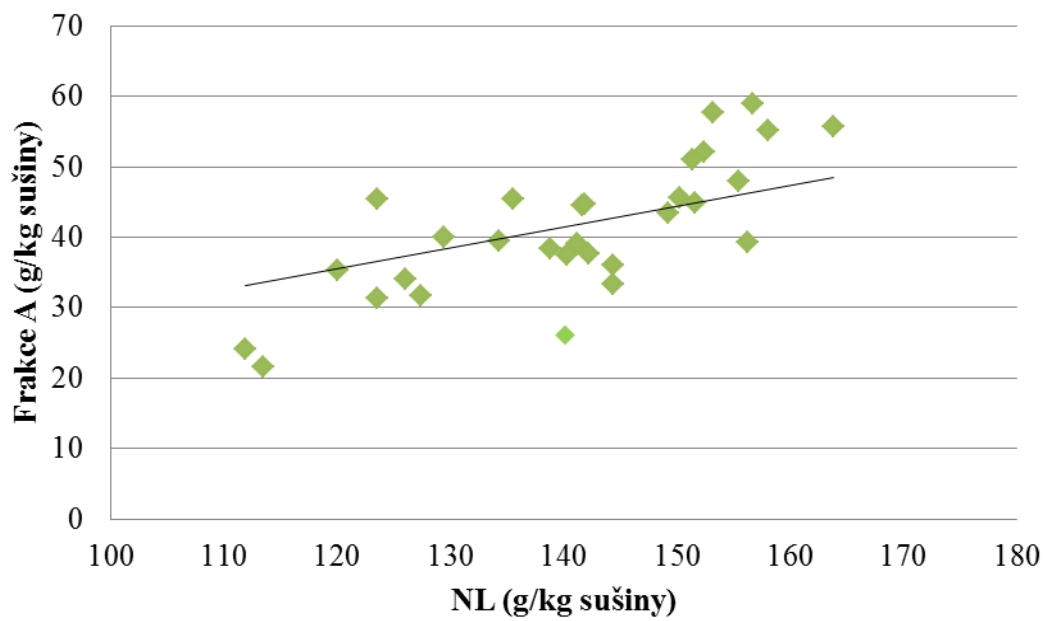
Dosažené výsledky potvrdily vliv faktoru lignifikace na jednotlivé frakce NL ($P < 0,001$). Koncentrace NDF a ADF negativně korelovaly s frakcí A ($r = -0,577$; $r = -0,511$, resp.), dále obsah ADL významně negativně koreloval s frakcí C ($r = -0,584$). Další velmi silné korelační závislosti byly nalezeny mezi CF a frakcí A ($r = -0,805$) (Graf 5), NL a frakcí A ($r = 0,724$) (Graf 6), IP a frakcí B1 ($r = -0,799$), SOLP a frakcí B1 ($r = 0,793$), SOLP a frakcí B2 ($r = -0,701$).

Graf 5. Vliv obsahu CF na obsah frakce A u sledovaného souboru krmiv II.



CF, hrubá vláknina; NL, dusíkaté látky.

Graf 6. Vliv obsahu NL na obsah frakce A u sledovaného souboru krmiv II.



NL, dusíkaté látky.

Tabulka 19. Korelační koeficienty vybraných proměnných všech hybridů sledovaného souboru krmiv II ($n = 30$).

| | NL | Tuk | CF | NDF | ADF | ADL | BNLV | Popel | OH | BE | NPN | IP | SOLP | ADIP | NDIP | A | B1 | B2 | B3 |
|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------|---------------|--------|-------|
| Tuk | 0,724 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CF | -0,655 | -0,849 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NDF | -0,450 | -0,643 | 0,871 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ADF | -0,492 | -0,711 | 0,657 | 0,568 | | | | | | | | | | | | | | | |
| ADL | -0,219 | -0,058 | -0,221 | -0,302 | 0,162 | | | | | | | | | | | | | | |
| BNLV | -0,358 | -0,026 | -0,374 | -0,578 | -0,100 | 0,638 | | | | | | | | | | | | | |
| Popel | 0,420 | 0,528 | -0,228 | 0,103 | -0,264 | -0,363 | -0,596 | | | | | | | | | | | | |
| OH | -0,420 | -0,528 | 0,228 | -0,103 | 0,264 | 0,363 | 0,596 | -1,000 | | | | | | | | | | | |
| BE | 0,244 | 0,006 | -0,348 | -0,538 | -0,081 | 0,405 | 0,526 | -0,648 | 0,648 | | | | | | | | | | |
| NPN | 0,724 | 0,757 | -0,805 | -0,577 | -0,511 | 0,088 | 0,085 | 0,344 | -0,344 | 0,296 | | | | | | | | | |
| IP | 0,440 | 0,368 | -0,353 | -0,182 | -0,099 | -0,235 | -0,219 | 0,379 | -0,379 | -0,193 | 0,237 | | | | | | | | |
| SOLP | 0,454 | 0,279 | -0,233 | -0,220 | -0,340 | 0,038 | -0,101 | -0,002 | 0,002 | 0,408 | 0,410 | -0,601 | | | | | | | |
| ADIP | 0,180 | 0,046 | 0,165 | 0,284 | -0,096 | -0,584 | -0,540 | 0,356 | -0,356 | -0,424 | -0,224 | 0,228 | -0,066 | | | | | | |
| NDIP | 0,516 | 0,360 | -0,217 | -0,146 | -0,402 | -0,165 | -0,305 | 0,133 | -0,133 | 0,048 | 0,087 | 0,270 | 0,191 | 0,433 | | | | | |
| A | 0,724 | 0,757 | -0,805 | -0,577 | -0,511 | 0,088 | 0,085 | 0,344 | -0,344 | 0,296 | 1,000 | 0,237 | 0,410 | -0,224 | 0,087 | | | | |
| B1 | 0,001 | -0,207 | 0,288 | 0,150 | -0,022 | -0,019 | -0,164 | -0,232 | 0,232 | 0,238 | -0,231 | -0,799 | 0,793 | 0,079 | 0,146 | -0,231 | | | |
| B2 | 0,106 | 0,134 | -0,207 | -0,085 | 0,154 | -0,125 | -0,023 | 0,285 | -0,285 | -0,217 | 0,176 | 0,802 | -0,701 | -0,047 | -0,359 | 0,176 | -0,865 | | |
| B3 | 0,507 | 0,380 | -0,294 | -0,255 | -0,410 | 0,013 | -0,155 | 0,027 | -0,027 | 0,194 | 0,170 | 0,220 | 0,232 | 0,143 | 0,954 | 0,170 | 0,134 | -0,378 | |
| C | 0,180 | 0,046 | 0,165 | 0,284 | -0,096 | -0,584 | -0,540 | 0,356 | -0,356 | -0,424 | -0,224 | 0,228 | -0,066 | 1,000 | 0,433 | -0,224 | 0,079 | -0,047 | 0,143 |

A, neproteinový dusík; ADF, acido detergentní vláknina; ADIP, protein nerozpustný v kyselém detergentu; ADL, acido detergentní lignin; B1, rychle rozložitelný protein; B2, středně rozložitelný protein; B3, pomalu rozložitelný protein; BE, brutto energie; BNLV, bezdusíkaté látky výtažkové; C, vázaný (nestravitelný) protein; CF, hrubá vláknina; IP, nerozpustný protein NDF, neutrálně detergentní vláknina; NDIP, protein nerozpustný v neutrálním detergentu; NL, dusíkaté látky; NPN, neproteinový dusík; OH, organická hmota; SOLP, rozpustný protein.

„Tučně“ zvýrazněné korelační koeficienty byly stanoveny na hladině statistické významnosti $P < 0,05$.

6. Závěr

Hodnocení dusíkatých látek na základě detergentních analýz zohledňuje požadavky zvířete na živinové složení krmiv. Tím umožňuje získat širší pohled na trávení přijatých krmiv v krmné dávce přežvýkavců. Vyvážený poměr jednotlivých živin v krmné dávce významně ovlivňuje nejen využitelnost celé předkládané krmné dávky, ale i zdravotní stav, pohodu a užitkovost zvířat.

Cornellský systém, který je v současné době považován za stěžejní systém v hodnocení živin a krmiv se zabývá komplexně výživou a trávením přežvýkavců a zohledňuje fyziologii a dynamiku trávicího traktu přežvýkavců a požadavky zvířat na výživu. Předkládaná disertační práce poskytuje podrobné informace o dusíkatých látkách, které se dostávají spolu s krmivem do trávicího traktu přežvýkavců a doplňuje/rozšiřuje již zaběhnuté systémy hodnocení dusíkatých látek. Znalost degradovatelnosti dusíkatých látek krmiv v batoru a jejich stravitelnosti v tenkém střevě umožňuje jejich správné vybalancování v krmné dávce tak, aby bator správně fungoval v průběhu celého mezidobí. Výsledky disertační práce jsou cenným zdrojem informací o krmivech běžně pěstovaných a zkrmovaných přežvýkavcům v České republice, čímž významně přispívají k rozšíření nutriční databáze vzorků krmiv.

U souboru I byla kromě jednotlivých frakcí dusíkatých látek zjišťována korelační závislost jednotlivých živin, energie, chemického složení dusíkatých látek a jednotlivých frakcí dusíkatých látek. Nejvýznamnější pozitivní korelace byla zjištěna mezi frakcí B3 a NDIP, což potvrzuje vazby mezi stanovením dusíku nerozpustného v neutrálním detergentu a frakcí B3 a dále byla vysoká korelační závislost zjištěna mezi NL a frakcí B2, NL a IP, NDIP a IP, frakcí B1 a SOLP a mezi frakcí B2 a IP.

U souboru II bylo potvrzeno, že pro predikci stravitelné organické hmoty a stravitelných dusíkatých látek je vhodné použít kombinace jak živin, tak také frakcí vlákniny i dusíkatých látek. Sestavením predikčních rovnic by bylo takto možné predikovat u píče stravitelnou organickou hmotu a stravitelné dusíkaté látky. Tím by se zjednodušil postup, jak tyto hodnoty stravitelnosti získat.

Zároveň tyto výsledky přispívají ke zlepšení laboratorních analýz a aktualizaci stávajících systémů a jsou také cenným zdrojem hodnot do databáze výživářských tabulek, které poskytují

informační základnu pro formulování krmných dávek odpovídající nutričním požadavkům hospodářských zvířat. Např. kolísající nutriční hodnota pasterních porostů by měla být brána v potaz při optimalizaci nejen v konvenčních pasterních systémech. Tyto poznatky pak lze aplikovat při sestavování krmných dávek pro hospodářská zvířata, ale i jako součást ochrany biodiverzity spásaných oblastí.

Předložená práce poskytuje ucelené informace o využívání a aplikaci Cornellského systému ve výživě přežvýkavců. A vzhledem současnému rozvoji využívání tohoto podrobného systému i u nás budou české zemědělské laboratoře častěji nuceny poskytovat tyto analýzy nejen pro zemědělské poradce a podniky, které se zabývají problematikou výživy hospodářských zvířat, ale i pro samotné chovatele těchto hospodářských zvířat.

V závěru zhodnocení tohoto systému nelze opominout ekonomické aspekty. Výhodou laboratorních analýz je nenáročnost na chov zvířat pro pokusné účely, čímž odpadají veškeré náklady spojené s jejich chovem (ustájení, zajištění welfare, krmení, potřeba pracovních sil apod.).

7. Seznam literatury

- Abbasi, D., Rouzbehan, Y., Rezaei, J. 2012. Effect of harvest date and nitrogen fertilization rate on the nutritive value of amaranth forage (*Amaranthus hypochondriacus*). *Anim. Feed Sci. Technol.* 171, 6–13.
- Agarwal, N., Kamra, D. N., Chaudhary, L. C. 2015. Rumen microbial ekosystem of domesticated ruminants. In: Puniya, A. K., Singh, R., Kamra, N. D. 2015. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. 1st ed. Springer India, New Delhi. ISBN 978-81-322-2400-6. 17–30.
- Alzueta, C., Caballero, R., Rebolé, A., Treviño, J., Gil, A. 2001. Crude protein fractions in common vetch (*Vicia sativa* L.) fresh forage during pod filling. *J. Anim. Sci.* 79, 2449–2455.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis*, AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, USA.
- ARC. 1980. *Agricultural Research Council. The nutrient requirements of ruminant livestock*. Agricultural Research Council. The Gresham Press, London.
- Bakshi, M. P. S., Wadhwa, M. 2013. Nutritional evaluation of cannery and fruit wastes as livestock feed. *Indian J. Anim. Sci.* 83, 1198–1202.
- Bannink, A. Introduction to rumen function. 2007b. In: Bannink, A. *Modelling volatile fatty acid, dynamics and rumen function in lactating cows*. Wageningen University (Netherlands): Ponsen & Looijen. ISBN: 978-90-8504-785-8. 1–14.
- Bannink, A., Kogut, J., Dijkstra, J., France, J., Kebreab, E., van Vuuren, A. M., Tamminga, S. 2007a. Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. In: Bannink, A. *Modelling volatile fatty acid, dynamics and rumen function in lactating cows*. Wageningen University (Netherlands): Ponsen & Looijen. ISBN: 978-90-8504-785-8. 133–163.
- Bertipaglia, L. M. A., de Melo, G. M. P., Sugohara, A., de Melo, W. J., Bertipaglia, L. A. 2008. Chemical changes in soybean and corn processed by extrusion. *R. Bras. Zootec.* 11, 2003–2010.

- Beyer, M., Chudy, A., Hoffman, H. L., Jentsch, W., Laube, W., Nehring, K., Schiermann, R. 2003. Rostock Feed Evaluation System; Reference numbers of feed value and requirement of the base of net energy. Gottlob Volkhardtsche Druckerei, Amorbach.
- Brade, W., Distl, O. 2015. Eukaryotic unicellular organisms-additional components of the ruminal microbiome. *Tierärztliche Umschau*. 70, 457–462.
- Broderick, G. A. 1987. Determination of protein degradation rates using a rumen *in vitro* system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. *British J. Nutri.* 58, 463–476.
- Broderick, G. A. 2007. Reduced crude protein rations for high producing cows: Production and environmental effects. In *Proc. Cornell Nutrition Conference*. Department of Animal Science. Cornell University, Syracuse, NY. 61–71.
- Brown, V. E., Rymer, C., Agnew, R. E., Givens, D. I. 2002. Relationship between *in vitro* gas production profiles of forages and *in vivo* rumen fermentation patterns in beef steers fed those forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 98, 13–24.
- Cameron, S. L. 2003. Taxonomy and phylogeny of endosymbiotic ciliates (Ciliophora: Litostomatea) associated with Australian herbivorous marsupials. *Int. J. Parasitol. Parasites.* 33, 347–355.
- Cannas, A. 2000. Sheep and cattle nutrient requirement systems, ruminal turnover, and adaptation of the Cornell Net Carbohydrate and Protein system to sheep. PhD dissertation, Cornell University, Ithaca, NY, USA. 337p.
- Carrera, R. A. B., Veloso, C. M., Knupp, L. S., Souza Júnior, A. H., Detmann, E., Lana, R. P. 2012. Protein co-products and by-products of the biodiesel industry for ruminants feeding. *R. Bras. Zootec.* 41, 1202–1211.
- Cassel, E. K. 1996. Using non-protein nitrogen to control feed costs. *Extension Extra*. South Dakota state university. 3p.
- Cazzato, E., Laudadio, V., Stellacci, A. M., Ceci, E., Tufarelli, V. 2012. Influence of sulphur application on protein quality, fatty acid composition and nitrogen fixation of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 5, 963–969.

- Clarke, R. T. J. 1977. Protozoa in the rumen ecosystem. In: Clarke, T. T. J., Bauchop, T. (Eds). Microbial ecology of the gut. New York: Academic Press. 251–275.
- CNCPS. 2014. Cornell University, Department of Animal Science: Cornell Net Carbohydrate and Protein System [online]. [cit. 2014-06-15]. Dostupné z: <http://www.cncps.cornell.edu/CNCPS>.
- Coblentz, W. K., Fritz, J. O., Fick, W. H., Cochran, R. C., Shirley, J. E. 1998. *In situ* dry matter, nitrogen, and fiber degradation of alfalfa, red clover, and eastern gamagrass at four maturities. J. Dairy Sci. 81, 150–161.
- CSIRO. 1990. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Feeding standards for Australian livestock Ruminants. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Melbourne, Australia.
- Čermák, B., Kodeš, A., Mudřík, Z., Lád, F. 1994. Výživa a krmení hospodářských zvířat II. díl. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 202p.
- Dagar, S. S., Kumar, S., Mudgil, P., Singh, R., Puniya, A. K. 2011. D1/D2 domain of large subunit rDNA for differentiation of *Orpinomyces* spp. Appl. Environ. Microbiol. 77, 6722–6725.
- Davies, D. R., Theodorou, M. K., Lawrence, M. I. G., Trinci, A. P. J. 1993. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. J. Gen. Microbiol. 139, 1395–1400.
- Dehority, B. A. 2005. Effect of pH on viability of *Entodinium caudatum*, *Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum*, and *Ophryoscolex purkynjei* *in vitro*. J. Eukaryot. Microbiol. 52, 339–342.
- Dinn, N. E., Shelford, J. A., Fisher, L. J. 1998. Use of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System and rumen-protected lysine and methionine to reduce nitrogen excretion from lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 81, 229–237.
- Drevjany, L., Kozel, V., Padrůněk, S. 2004. Holštýnský svět. Zea Sedmihorky. Vyd. 1. 344p.
- Dschaak, M. Ch. 2012. Use of rumen modifiers to manipulate ruminal fermentation and improve nutrient utilization and lactational performance of dairy cows. All Graduate Theses and Dissertations. Utah State University. 123p.

- Dvořák, R. 2005. Fyziologie a patologie trávení přežvýkavců. In: Dvořák, R. Výživa skotu z hledisek produkční a preventivní medicíny: sborník referátů odborného semináře. Brno: Česká buiatrická společnost. ISBN: 80-86542-08-4. 17–25.
- Ehsani, P. 2007. Evaluation and comparing of qualitative and quantitative yield of four amaranth varieties in different harvesting date. MSc Thesis. Islamic Azad University of Saveh, Saveh, Iran.
- Elghandour, M. M. Y., Kholif, A. E., Hernandez, J., Mariezcurrena, M. D., Lopez, S., Camacho, L. M., Marquez, O., Salem, A. Z. M. 2016. Influence of the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the *in vitro* ruminal fermentation of three fibrous feeds. Czech J. Anim. Sci. 61, 262–272.
- Elizalde, J. C., Merchen, N. R., Faulkner, D. B. 1999. *In situ* dry matter and crude protein degradation of fresh forages during the spring growth. J. Dairy Sci. 82, 1978–1990.
- Epifanio, P. S., de Pinho Costa, K. A., Teixeira, D. A. A., Fernandes, P. B., Okada, E. S. M., Peron, H. J. M. C. 2014. Protein and carbohydrate fractionation of Piata palisadegrass silage of brans from biodiesel industry. Acta Sci. Anim. Sci. 36, 271–278.
- Fijałkowska, M., Pysera, B., Lipiński, K., Strusińska, D. 2018. Changes of nitrogen compounds during ensiling of high protein herbages – a review. Ann. Anim. Sci. 15, 289–305.
- Fox, D. G., Sniffen, C. J., O'Connor, J. D., Russel, J. B., Van Soest, P. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. J. Anim. Sci. 70, 3578–3596.
- Fox, D. G., Tedeschi, L. O. 2003. Predicting dietary amino acid adequacy for ruminants. In: Amino acids in animal nutrition. D'Mello, J. P. F., ed. CABI Publishing, Cambridge, MA. 389–410.
- Fox, D. G., Tedeschi, L. O., Tylutki, T. P., Russell, J. B., Van Amburgh, M. E., Chase, L. E., Pell, A. N., Overton, T. R. 2004. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. Anim. Feed Sci. Technol. 112, 29–78.
- Franzolin, R., Dehority, B. A. 2010. The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. R. Bras. Zootec. [online]. 39, 2262–2267.

- Fuller, M. F. 2004. The encyclopedia of farm animal nutrition. CABI Publishing. ISBN 0-85199-369-9. 621p.
- Ghoorchi, T., Arbabi, A. 2010. Study of protein characteristic of five feeds by CNCPS model. Asian J. Anim. Vet. Advan. 5, 584–591.
- Givens, D. I., Rulquin, H. 2004. Utilisation by ruminants of nitrogen compounds in silage-based diets. Anim. Feed Sci. Tech. 114, 1–18.
- Grüninger, R. J., Puniya, A. K., Callaghanc, T. M., Edwardsc, J. E., Youssef, N., Dagar, S. S., Fliegerova, K., Griffith, G. W., Forster, R., Tsang, A., McAllister, T., Elshahed, M. S. 2014. Anaerobic fungi (Phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding of their taxonomy, life cycle, ecology, role, and biotechnological potential. FEMS Microbiol. Ecol. 90, 1–17.
- Gupta, A., Singh, S., Kundu, S. S., Jha, N. 2011. Evaluation of tropical feedstuffs for carbohydrate and protein fractions by CNCP system. Indian J. Anim. Sci. 81, 1154–1160.
- Harazim, J., Homolka, P. 2002. Stanovení degradovatelnosti a střevní stravitelnost dusíkatých látek krmiv u přežvýkavců. Farmář. 9, 30–31.
- Harazim, J., Pavelek, L., Čerešňáková, Z., Homolka, P., Třináctý, J., Jambor, V., Pozdíšek, J., Zeman, L. 1999. Metodika pro stanovení degradovatelnosti dusíkatých látek a aminokyselin krmiv v bachoru přežvýkavců (Metoda „*in situ*“, nylon bag“). Sborník mezinárodní vědecké konference „Stanovení využitelnosti živin u přežvýkavců“. Opava: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně. 115–118.
- Hausman, K., Hülsmann, N. 2003. Protozoologie. Z angl. 2. vyd. přel. RNDr. Jiří Lom, DrSc. 1. vyd. v ČR. Praha: Academia. 348p.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Kõljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S.,

- Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarde, L., Sampaio, J. P., Schüssler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., Zhang, N. 2007. A higher level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol. Res.* 111, 509–547.
- Higgs, R. J., Chase L. E., Ross, D. A., Van Amburgh, M. E. 2015. Updating the CNCPS feed library and analyzing model sensitivity to feed inputs. *J. Dairy Sci.* 98, 6340–6360.
- Hofírek, B., Dvořák, R. 2009. Netraumatické dysfunkce předžaludku. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležal, R., Pospíšil, Z. (ed.): *Nemoci skotu*. Brno: Česká buiatrická společnost. ISBN: 978-80-86542-19-5. 376–405.
- Homolka, P., Koukolová, V., Podsedníček, M., Hlaváčková, A. 2012. Nutritive value of red clover and lucerne forages for ruminants estimated by *in vitro* and *in vivo* digestibility methods. *Czech J. Anim. Sci.* 57, 454–468.
- Huhtanen, P., Nousiainen, J., Rinne, M. 2006. Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. *Agric. Food Sci.* 15, 293–323.
- Hvelplund, T., Weisbjerg, M. R. 2000. *In situ* techniques for the estimation of protein degradability and postrumen availability. In: *Forage evaluation in ruminant nutrition*. Eds: Givens D. I., Owen, E., Axford, R. F. E., Omed, H. M. CABI Publishing, Wallingford, UK. 233–258.
- Chalupa, W., Boston, R. 2003. Development of the CNCPS and CPM models: the Sniffen affect. In: *Proceedings of Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, Syracuse, NY: New York State College of Agriculture and Life Sciences, Cornell University. 15–24.
- Choi, C. W., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Toivonen, V., Huhtanen, P. 2002. Quantitation of the flow of soluble non-ammonia nitrogen entering the omasal canal of dairy cows fed grass silage based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 96, 203–220.
- Chrenková, M., Čerešňáková, Z., Weisbjerg, M. R., Formelová, Z., Poláčiková, M., Vondráková, M. 2014. Characterization of proteins in feeds according to the CNCPS and comparison to *in situ* parameters. *Czech J. Anim. Sci.* 59, 288–295.

- INRA. 1989. Institut National de la Recherche Agronomique. Ruminant nutrition. Recommended allowances and feed tables. Institut National de la Recherche Agronomique, John Lingey Eurotext, Montrouge, France.
- Ishler, V., Heinrichs, J., Varga, G. 1996. From Feed to Milk: Understanding Rumen Function. College of Agricultural Sciences, The Pennsylvania State University; University Park, PA, USA: Extension Circular. 422p.
- Jančík, F. 2007. Bachorová degradace buněčné stěny vybraných druhů trav sklízených v různých stádiích zralosti a konzervovaných sušením a silážováním. PhD dissertation, České Budějovice. 125p.
- Jelínek, P., Koudela, K., Doskočil, J., Illek, J., Kotrbáček, V., Kovářů, F., Kroupová, V., Kučera, M., Kudláč, E., Trávníček, J., Valent, M. 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 414p.
- Jeroch, H., Čermák, B., Kroupová, V. 2006. Základy výživy a krmení hospodářských zvířat. Vědecká monografie. České Budějovice, ISBN 80-7040-873-1. 290p.
- Kamra, D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Sci.* 89, 124–135.
- Kopecký, D., Loureiro, J., Zwierzykowski, Z., Ghesquiere, M., Doležel, J. 2006. Genome constitution and evolution in *Lolium* × *Festuca* hybrid cultivars (Festulolium). *Theor. App. Genet.* 113, 731–742.
- Kopecký, M., Moudrý, J., Berna, J., Suchý, K. 2017. The environmental aspects of energy crops growing in the condition of the Czech Republic. *Agric. Sci. (Crop Sci., Anim. Sci.)*. 7–12.
- Koukolová, V. 2005. Stanovení degradovatelnosti NDF u píce *in vitro* metodami a jejich ověření metodou *in situ* na kanylovaných kravách. PhD dissertation, České Budějovice. 125p.
- Krishnamoorthy, U., Sniffen, C. J., Stern, M. 1983. Evaluation of a mathematical model of rumen digestion and an *in vitro* simulation of rumen proteolysis to estimate the rumen undegraded nitrogen content of feedstuffs. *British J. Nutri.* 50, 555–568.
- Kubota, A., Akiyama, Y., Fujimori, M., Kiyoshi, T. 2015. No decrease in f ratio (ratio of *Festuca*-specific genome region to the whole genome) in maternally derived progeny of

- festulolium (*Festuca pratensis* × *Lolium* species) across generations. Japan. Soc. Grass. Sci. 62, 55–60.
- Kudrna, V., Čermák, B., Doležal, O., Frydrych, Z., Hermann, H., Homolka, P., Illek, J., Loučka, R., Machačová, E., Martínek, V., Mikyska, F., Mrkvička, J., Mudřík, Z., Pindík, J., Poděbradský, Z., Pulkrábek, J., Skřivanová, V., Šantrůček, J., Šimek, M., Veselá, M., Vrzal, J., Zelenka, J., Zemanová, D. 1998. Produkce krmiv a výživa skotu. Praha: Agrospoj. ISBN 80-239-4241-7. 362p.
- Kudrna, V., Homolka, P. 2009. Vliv diety, zejména obsahu dusíkatých látek, na množství a kvalitu mléčné bílkoviny a zdraví dojnic [online]. In: Praha [cit. 2016-03-02]. Dostupné z: <http://www.vuzv.cz/sites/Dojnice.pdf>.
- Lampeter, W. 1970. Eine neue Methode zur serienmässigen Untersuchung der Verdaulichkeit *in vitro* mittels „künstlichen Pansens“. Int. Zt. Landw. 6, 664–668.
- Lanzas, C., Broderick, G. A., Fox, D. G. 2008. Improved feed protein fractionation schemes for formulating rations with the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. J. Dairy Sci. 91, 4881–4891.
- Lee, S. S., Choi, C. K., Ahn, B. H., Moon, Y. H., Kim, C. H. 2004. *In vitro* stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobi fungi culture. Anim. Sci. and Tech. 115, 215–226.
- Licitra, G., Hernandez, T. M., Van Soest, P. J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. Anim. Feed Sci. Tech. 57, 347–358.
- Looper, M. L., Waldner, D. H. 2002. Water for Dairy Cattle. Guide D-107. New Mexico State University Cooperative Extension Service. 1–5.
- Loučka, R., Tyrolová, Y., Jančík, F., Kubelková, P., Homolka, P., Jambor, V. 2018. Variation for *in vitro* digestibility in two maize hybrid silages. Czech J. Anim. Sci. 63, 17–23.
- Lowe, S. E., Theodorou, M. K., Trinci, A. P. J. 1987. Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep. J. Gen. Microbiol. 133, 1829–1834.

- Mahmood, S., Ajmal Khan, M., Sarwar, M., Nisa, M., Lee, W. S., Kim, S. B., Hur, T. Y., Lee, H. J., Kim, H. S. 2007. Use of chemical treatments to reduce tannins and trypsin inhibitor contents in salseed (*Shorea robusta*) meal. *Asian-Aust. J. Anim.* 20, 1462–1467.
- Martin, N. P., Mertens, D. R., Weimer, P. J. 2004. Alfalfa: hay, haylage, baleage, and other novel products. In: *Proceedings of the Idaho Alfalfa and Forage Conference, February 24–25, Twin Falls, ID, USA, 2004*. Idaho Hay and Forage Association Inc., University of Idaho Cooperative Extension. 9–18.
- Marvan, F., Hampl, A., Kresan, J. 2003. *Morfologie hospodářských zvířat*. Vyd. 3. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze v nakl. Brázda. ISBN 80-213-1172-X. 328p.
- Mehrez, A. Z., Ørskov, E. R. 1977. A study of artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agric. Sci.* 88, 645–650.
- Meyer, J. H. F., Mackie, R. I. 1986. Microbiological evaluation of the intraruminal in sacculus digestion technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 622–629.
- Míka, V., Harazim, J., Kalač, P., Kohoutek, A., Komárek, P., Pavlů, V., Pozdíšek, J. 1997. *Kvalita píce. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha*. ISBN 80-96153-59-2. 227p.
- Mikolayunas-Sandroch, C., Armentano, L. E., Thomas, D. L., Berger, Y. M. 2009. Effect of protein degradability on milk production of dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 92, 4507–4513.
- Minato, H., Endo, A., Higuchi, M., Ootomo, Y., Uemura, T. 1966. Ecological treatise on the rumen fermentation. I. The fractionation of bacteria attached to the rumen digesta solids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 12, 39–52.
- Mišurcová, L. 2011. Seaweed digestibility and methods used for digestibility determination. In: KIM, Se-Kwon, ed. *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*. Chichester: John Wiley & Sons. ISBN 978-0-47-0979181. 285–301.
- Mudřík, Z., Doležal, P., Koukal, P. 2006. *Základy moderní výživy skotu*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. 270p.
- Nafikov, R. A., Beitz, D. C. 2007. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. *J. Nutr.* 137, 702–705.

- Nagaraja, T. G., Titgemeyer, E. C. 2007. Rumen acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90, E17–E38.
- Nandra, K. S., Dobos, R. C., Orchard, B. A., Neutze, S. A., Oddy, V. H., Cullis, B. R., Jones, A. W. 2000. The effect of animal species on *in sacco* degradation of dry matter and protein of feeds in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83, 273–285.
- Navrátil, P. Hodnocení kvality proteinu v bílkovinných silážích aneb Není protein jako protein. 2010. *Náš chov.* 4, 52–54.
- Naylor, J. M., Ralston, S. L. 1991. Large animal clinical nutrition. Vyd. 1. St. Louis: Mosby Year Book. ISBN 0801629020. 676p.
- Negrão, F. M., Zanine, A. M., Cabral, L. S., Souza, A. L., Alves, G. R., Ferreira, D. J., Dantas, C. C. O., Lehmkuhl, A. 2014. Fractionation of carbohydrates and protein and rumen degradation kinetic parameters of brachiaria grass silage enriched with rice bran. *R. Bras. Zootec.* 43, 105–113.
- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. National Research Council. Washington, USA. 381p.
- O'Connor, J. D., Sniffen, C. J., Fox, D. G., Chalupa, W. 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. IV. Predicting amino acid adequacy. *J. Anim. Sci.* 71, 1298–1311.
- Ørskov, E. R. 2000. The *in situ* technique for the estimation of forage degradability in ruminants. In: Givens, D. I., Owen, E., Axford, R. F. E., Omed, H. M. Forage evaluation in ruminant nutrition, Oxon, UK. 175–188.
- Ørskov, E. R., Macdonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agr. Sci.* 92, 499–503.
- Ørskov, E. R., Ryle, M. 1990. Energy nutrition in ruminants. UK: Springer. ISBN 978-94-010-6823-9. 157p.
- Pereira, E. S., Pimentel, P. G., Duarte, L. S., Mizubuti, I. Y., Araújo, G. G. L., de Souza Carneiro, M. S., Filho, J. G. L. R., Maia, I. S. G. 2010. Determination of the proteins and

- carbohydrates fractions and estimative of the energy value of forages and by-products in Brazilian Northeast. *Semina: Ciênc. Agrár.* 31, 1079–1094.
- Polat, M., Şayan, Y., Özelçam, H. 2014. Estimating *in situ* effective crude protein degradability with Cornell Net Carbohydrate and Protein System parameters in energy-rich feedstuffs for ruminants. *Kafkas Univ. Vet. Fak.* 20, 259–265.
- Puniya, A. K., Singh, R., Kamra, N. D. 2015. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. 1st ed. Springer India, New Delhi. ISBN 978-81-322-2400-6. 379p.
- Reece, W. O. 1997. *Physiology of domestic animals*. Vyd. 2. Baltimore: Williams & Wilkins. ISBN 978-0683072402. 464 p.
- Ricard, G., McEwan, N. R., Dutilh, B. E., Jouany, J. P., Macheboeuf, D., Mitsumori, M., Macintosh, F. M., Michalowski, T., Nagamine, T., Nelson, N., Newbold, Ch. J., Nsabimana, E., Takenaka, A., Thomas, N. A., Ushida, K., Hackstein, J. H. P., Huynen, M. A. 2006. Horizontal gene transfer from Bacteria to rumen Ciliates indicates adaptation to their anaerobic, carbohydrates-rich environment. *BMC Genomics*. 7.
- Richter, M., Třináctý, J. 2009. Použití systému NRC 2001 v oblasti hodnocení proteinu krmiv pro dojnice. *Raportín: Agrovýzkum Raportín s.r.o.* 34p.
- Rinne, M., Nykänen, A. 2000. Timing of primary growth harvest affects the yield and nutritive value of timothy-red clover mixtures. *Agri. Food Sci. Finland.* 9, 121–134.
- Rulquin, H. 1994. Protected lysine and methionine in dairy cows rations. *Feed Mix.* 4, 24–27.
- Russell, J. B., O'Connor, J. D., Fox, D. G., Van Soest, P. J., Sniffen, C. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I. Ruminant fermentation. *J. Anim. Sci.* 70, 3551–3561.
- Rymer, C. 2000. The measurement of forage digestibility *in vivo*. In: D. I. Givens et al., eds: *Forage evaluation in Ruminant Nutrition*. CAB International, Wallingford, UK, 2000. 113–134.
- Saha, U., Sonon, L., Hancock, D., Hill, N., Stewart, L., Heusner, G., Kissel, D. E. 2010. *Common Terms Used in Animal Feeding and Nutrition*. The University of Georgia. Cooperative Extension. Colleges of Agricultural and Environmental Sciences & Family and Consumer. 20p.

- Sahoo, A., Jena, B. 2014. Organic acids as rumen modifiers. *Inter. J. Sci. Res.* [online]. 3, 2262–2266.
- SAS. 2003. SAS Statistic: Version 9.4 edn. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
- Schiemann, R. 1981. Methodical directions for digestion experiments for the feed evaluation. *Archiv. Tierernahr.* 31, 1–19.
- Schwab, C. G., Tylutki, T. P., Ordway, R. S., Sheaffer, C., Stern, M. D. 2003. Characterization of proteins in feeds. *J. Dairy Sci.* 83, E88–E103.
- Sirohi, S. K., Chaudhary, P. P., Singh, N., Singh, D., Puniya, A. K. 2013. The 16S rRNA and *mcrA* gene based comparative diversity of methanogens in cattle fed on high fibre based diet. *Gene.* 523, 161–166.
- Sirohi, S. K., Singh, N., Dagar, S. S., Puniya, A. K. 2012. Molecular tools for deciphering the microbial community structure and diversity in rumen ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1135–1154.
- Sniffen, C. J., O'Connor, J. D., Van Soest, P. J., Fox, D. G., Russell, J. B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70, 3562–3577.
- Spann, B. 1993. *Fütterungsberater Rind: Kälber, Milchvieh, Mastrinder.* Verlagsunion AGRAR. 183p.
- Stern, M. D., Bach, A., Calsamiglia, S. 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J. Anim. Sci.* 75, 2256–2276.
- Straková, E., Suchý, P. 2005. *Výživa hospodářských zvířat.* Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita. ISBN 80-7305-543-0. 89p.
- Straková, E., Suchý, P., Večerek, V., Šerman, V., Mas, N., Jůzl, M. 2006. Nutritional composition of seeds of the genus *Lupinus*. *Acta Vet. Brno.* 75, 489–493.
- Swain, P. S., Rao, D. S., Nagalakshmi, D., Mahender, M., Ray, S. 2016. Nutritional evaluation of pulse screenings by *in vitro* gasproduction technique. *Indian J. Anim. Res.* 50, 705–710.

- Tedeschi, L. O., Boin, C., Fox, D. G., Leme, P. R., Alleoni, G. F., Lanna, D. P. D. 2002a. Energy requirement for maintenance and growth of Nellore bulls and steers fed high-forage diets. *J. Anim. Sci.* 80, 1671–1682.
- Tedeschi, L. O., Fox, D. G., Fonseca, M. A., Cavalcanti, L. F. L. 2015. Models of protein and amino acid requirements for cattle. *R. Bras. Zootec.* 44, 109–132.
- Tedeschi, L. O., Fox, D. G., Chase, L. E., Wang, S. J. 2000a. Whole-herd optimization with the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. I. Predicting feed biological values for diet optimization with linear programming. *J. Dairy. Sci.* 83, 2139–2148.
- Tedeschi, L. O., Fox, D. G., Pell, A. N., Lanna, D. P. D., Boin, C. 2002b. Development and evaluation of a tropical feed library for the Cornell Net Carbohydrate and Protein System model. *Sci. Agric.* 59, 1–18.
- Tedeschi, L. O., Fox, D. G., Russell, J. B. 2000b. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. *J. Anim. Sci.* 78, 1648–1658.
- Tedeschi, L. O., Chalupa, W., Janczewski, E., Fox, D. G., Sniffen, C. J., Munson, R., Kononoff, P. J., Boston, R. C. 2008. Evaluation and application of the CPM Dairy nutrition model. *J. Agric. Sci.* 146, 171–182.
- Tedeschi, L. O., Pell, A. N., Fox, D. G., Llamas, C. R. 2001. The amino acid profiles of the whole plant and of four residues from temperate and tropical forages. *J. Anim. Sci.* 79, 525–532.
- Tilley, J. M. A., Terry, R. A. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Brit. Grass. Soc.* 18, 104–111.
- Tinnimit, P., Thomas, J. W. 1976. Forage evaluation using various laboratory techniques. *J. Anim. Sci.* 43, 1058–1065.
- Tománková, O., Kopečný, J. 1995. Prediction of feed protein degradation in the rumen with bromelain. *Anim. Feed Sci. Technol.* 53, 71–80.
- Třináctý, J., Nedělník, J., Richter, M. 2016. Hodnocení krmiv na bázi řepky a jejich zařazení do krmných dávek pro dojnice. *Zemědělský výzkum, spol. s r.o. Troubsko. Certifikovaná metodika.* ISBN 78-80-88000-14-3. 64p.

- Tylutki, T. P., Fox, D. G., Anrique, R. G. 1994. Predicting net energy and protein requirements for growth of implanted and nonimplanted heifers and steers and nonimplanted bulls varying in body size. *J. Anim. Sci.* 72, 1806–1813.
- Urban, F., Bouška, J., Čermák, V., Doležal, O., Fulka, J., Fulka, J., jr., Futerová, J., Homolka, P., Jílek, F., Kudrna, V., Marounek, M., Váchal, J., Loučka, R., Macháčová, E., Mikšík, J., Mudřík, Z., Petr, J., Poděbradský, Z., Šereda, L., Skřivanová, V., Vetýška, J., Žižlavský, J. 1997. *Chov dojeného skotu*. Praha: Apros. ISBN: 80-901100-7-X. 288p.
- Valderrama, X., Anrique, R. 2011. *In situ* rumen degradation kinetics of high-protein forage crops in temperate climates. *Chil. J. Agr. Res.* 71, 572–577.
- Valiente, O. L., Andueza, D., de Vega, A., Olmos, G., Munoz, F. 2004. The use of NIRS for prediction of intake, digestibility and diet composition in sheep fed mixed grain: roughage diets. *J. Anim. Feed Sci.* 13, 227–230.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd edition. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA. 488p.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Vanzant, E. S., Cochran, R. C., Titgemeyer, E. C. 1998. Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. *J. Anim. Sci.* 76, 2717–2729.
- Vencl, B. 1985. Metodické zásady pro provádění bilančních a skupinových pokusů na přežvýkavcích. VÚŽV Uhřetěves. 36p.
- Villamide, M. J., Fraga, M. J. 1998. Prediction of the digestible crude protein and protein digestibility of feed ingredients for rabbits from chemical analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 70, 211–224.
- Wang, S. P., Wang, W. J., Yang, D. S., Zhao, X. L., Luo, D. M., Guo, Y. B. 2017. Growth, carcass, and physiological traits of growing male China Micro-ducks fed various levels of dietary crude fibre. *Czech J. Anim. Sci.* 62, 347–356.

- Wattiaux, M. A. 1998. Protein metabolism in dairy cows. In: Technical Dairy Guide-Nutrition, 2nd edition. The Babcock Institute for International Dairy Research and Development. The University of Wisconsin, USA. 17–20.
- Wattiaux, M. A., Armentano, L. E. 2006. Carbohydrate metabolism of the dairy cows. The Babcock Institute for International Dairy Research and Development. The University of Wisconsin, USA. 9–12.
- Wattiaux, M. A., Grummer, R. R. 2004. Lipid metabolism in dairy cows. In: Dairy Essentials, Babcock Institute for International Dairy Research and Development, University of Wisconsin-Madison. 13–16.
- Weakley, D. C., Stern, M. D., Satter, L. D. 1983. Factors affecting disappearance of feedstuffs from bags suspended in the rumen. *J. Anim. Sci.* 56, 493–507.
- Williams, A. G., Coleman, G. S. 1992. The rumen protozoa. New York: Springer-Verlag. 423p.
- Xia, N., Wang, J. M., Gong, Q., Yang, X. Q., Yin, S. W., Qi, J. R. 2012. Characterization and *in vitro* digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted microfluidization: comparison to alkaline extraction. *J. Cereal Sci.* 56, 482–489.
- Xiao, J. X., Alugongo, G. M., Chung, R., Dong, S. Z., Li, S. L., Yoon, I., Wu, Z. H., Cao, Z. J. 2016. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Ruminal fermentation, gastrointestinal morphology, and microbial community. *J. Dairy Sci.* 99, 5401–5412.
- Yamada, T., Forster, J. W., Humphreys, M. W., Takamizo, T. 2005. Genetics and molecular breeding in *Lolium/Festuca* grass species complex. *Japan. Soc. Grass. Sci.* 51, 89–106.
- Yu, P., Christensen, D. A., Mckinnon, J. J., Markert, J. D. 2003. Effect of variety and maturity stage on chemical composition, carbohydrate and protein subfractions, *in vitro* rumen degradability and energy values of timothy and alfalfa. *Can. J. Anim. Sci.* 83, 279–290.
- Zadeh, J. B., Moradi kor, Z., Moradi kor, N. 2013. Synchronization of energy and protein on supply synthesis microbial protein. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.* 1, 594–600.

Zeman, L., Doležal, P., Kopřiva, A., Mrkvicová, E., Procházková, J., Ryant, P., Skládanka, J., Straková, E., Suchý, P., Veselý, P., Zelenka, J. 2006. Výživa a krmení hospodářských zvířat. Praha: Profi Press, s.r.o. 360p.

8. Přílohy

8.1. Obrázky

Obrázek 1. Navažování vzorků na analytických vahách.



Foto, Vendulka Sobotková.

Obrázek 2. Stanovení rozpustného dusíku a proteinu.



Foto, Vendulka Sobotková.

Obrázek 3. Příklad Kjeltec (Kjeltec_{TM} 2400) na stanovení obsahu dusíkatých látek.



Foto, Vendulka Sobotková.

Obrázek 4. Příklad Fibertec na stanovení obsahu hrubé vlákniny a frakcí vlákniny.



Foto, Marie Koukolová.

8.2. Seznam zkratk

| | |
|-------|--|
| A | frakce A; neproteinový dusík |
| AD | kyselý detergent |
| ADF | acido detergentní vláknina |
| ADIP | protein nerozpustný v kyselém detergentu |
| ADL | acido detergentní lignin |
| AMK | aminokyseliny |
| ARC | Agricultural Research Council |
| B1 | frakce B1; rychle rozložitelný protein |
| B2 | frakce B2; středně rozložitelný protein |
| B3 | frakce B3; pomalu rozložitelný protein |
| BE | brutto energie |
| BNLV | bezdušikaté látky výtažkové |
| BSP | v pufru rozpustný protein |
| C | frakce C; vázaný (nestravitelný) protein |
| CF | hrubá vláknina |
| CNCPS | Cornell Net Carbohydrate and Protein System |
| CPD | stravitelné dusíkaté látky |
| CSIRO | Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization |
| DM | sušina |
| DMI | denní příjem sušiny |
| INRA | Institut National de la Recherche Agronomique |
| IP | nerozpustný dusík |
| MK | mastné kyseliny |
| ND | neutrální detergent |
| NDF | neutrálně detergentní vláknina |
| NDIP | protein nerozpustný v neutrálním detergentu |
| NL | dusíkaté látky |
| NPN | neproteinový dusík |

| | |
|------|--|
| NSC | nestrukturální sacharidy |
| OH | organická hmota |
| PDI | protein skutečně stravitelný v tenkém střevě |
| SNL | stravitelné dusíkaté látky |
| SOH | stravitelná organická hmota |
| SOLP | rozpuštěný protein |
| TMK | těkavé mastné kyseliny |

8.3. Seznam tabulek

- Tabulka 1. Fyziologická, chemická a mikrobiální charakteristika bachorového prostředí (Puniya *et al.*, 2015).
- Tabulka 2. Zástupci některých bachorových mikrobuů u domácích a volně žijících zvířat (Kamra, 2005).
- Tabulka 3. Zástupci některých prvoků bachorového mikrobiálního ekosystému domácích a volně žijících zvířat (Kamra, 2005).
- Tabulka 4. Zástupci některých hub bachorového mikrobiálního ekosystému domácích a volně žijících zvířat (Kamra, 2005).
- Tabulka 5. Složení (%) a intestinální stravitelnost dusíku (%) bachorovými mikroorganismy (Wattiaux, 1998).
- Tabulka 6. Rozdělení aminokyselin podle esenciality (Kudrna *et al.*, 1998).
- Tabulka 7. Rozdělení frakcí dusíkatých látek v krmivech (Van Soest, 1994; Licitra *et al.*, 1996).
- Tabulka 8. Přehled pokusných vzorků krmiv.
- Tabulka 9. Živinové složení (g/kg sušiny) a energie (MJ/kg sušiny) krmiv u souboru I.
- Tabulka 10. Chemické složení NL (g/kg NL) sledovaného souboru krmiv I.
- Tabulka 11. Frakce NL (g/kg NL) sledovaného souboru krmiv I.
- Tabulka 12. Korelační koeficienty vybraných proměnných sledovaného souboru krmiv I ($n = 15$).
- Tabulka 13. Živinové složení (g/kg sušiny) a energie (MJ/kg sušiny) sledovaného souboru krmiv II.
- Tabulka 14. Chemické složení NL (g/kg sušiny) sledovaného souboru krmiv II.
- Tabulka 15. Frakce NL (g/kg NL) sledovaného souboru krmiv II.
- Tabulka 16. SOH a SNL (g/kg sušiny) sledovaného souboru krmiv II.
- Tabulka 17. Regresní rovnice pro zjištění SOH (y) (g/kg sušiny) na základě chemického složení a frakcí NL (g/kg sušiny) sledovaného souboru krmiv II.
- Tabulka 18. Regresní rovnice pro zjištění SNL (y) (g/kg sušiny) na základě chemického složení a frakcí NL (g/kg sušiny) sledovaného souboru souboru krmiv II.
- Tabulka 19. Korelační koeficienty vybraných proměnných všechny hybridů sledovaného souboru krmiv II ($n = 30$).

8.4. Seznam grafů

- Graf 1. Vliv obsahu NL na obsah frakce B2 u sledovaného souboru krmiv I.
- Graf 2. Vliv obsahu IP na obsah frakce B3 u sledovaného souboru krmiv I.
- Graf 3. Obsah NL (g/kg sušiny) s vyjádřením podílu frakcí NL ve 100% NL sledovaného souboru krmiv I.
- Graf 4. Obsah NL (g/kg sušiny) s vyjádřením podílu frakcí NL ve 100% NL sledovaného souboru krmiv II.
- Graf 5. Vliv obsahu CF na obsah frakce A u sledovaného souboru krmiv II.
- Graf 6. Vliv obsahu NL na obsah frakce A u sledovaného souboru krmiv II.

8.5. Seznam schémat

Schéma 1. Živinové schéma živin v krmivu (Saha *et al.*, 2010).

Schéma 2. Frakce dusíkatých látek dle CNCPS (Fijałkowska *et al.*, 2015).